

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SIMONA POKOVEC
DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SIMONA POKOVEC

**UPORABA MEHANSKIH VIBRACIJ ZA POSPEŠENO TESTIRANJE
FIZIKALNE STABILNOSTI GROBO DISPERZNIH SISTEMOV
APPLICATION OF MECHANICAL VIBRATIONS AS ACCELERATED
TESTING METHOD OF COARSE DISPERSE SYSTEMS PHYSICAL
STABILITY**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2018

Diplomsko nalogo sem opravljala na Univerzi v Ljubljani, na Fakulteti za farmacijo, v laboratorijih Katedre za farmacevtsko tehnologijo, pod mentorstvom prof. dr. Stanka Srčiča, mag. farm., ter v podjetju Ilirija d.o.o., pod somentorstvom mag. Zdenke Koren.

Posebej bi se rada zahvalila mentorju prof. dr. Stanku Srčiču, mag. farm., ki me je tekom izdelave diplomske naloge usmerjal in mi svetoval, prav tako somentorici mag. Zdenki Koren, za vse koristne napotke, nasvete in priložnost za sodelovanje s podjetjem Ilirija d.o.o.

Izdelke, ki smo jih testirali, smo izdelali v laboratorijih Oddelka za kakovost in razvoj v podjetju Ilirija d.o.o. Za pomoč pri izdelavi se zahvaljujem Damjani Stražišar, Damjani Mihelič, Urški Racman in Evi Ogrin. Eksperimentalno delo diplomske naloge je potekalo na Fakulteti za farmacijo. Za vse nasvete in velikodušno pomoč bi se rada zahvalila Tatjani Hrovatič, ing. kem. teh., Mojci Keržan, ing. kem. teh., dipl. kozmet. Tii Kristian Tajnšek in asist. Janji Mirtič, mag. farm.

Zahvaljujem se tudi svoji družini za vse nasvete ter podporo v času študija in tekom izdelave diplomske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Stanka Srčiča, mag. farm. in somentorice mag. Zdenke Koren.

Simona Pokovec

Vsebina

POVZETEK.....	V
ABSTRACT	VI
SEZNAM OKRAJŠAV	VII
1 UVOD.....	1
1.1 Stabilnost kozmetičnih izdelkov	1
1.2 Znaki nestabilnosti kozmetičnega izdelka	2
1.3 Stabilnostne študije	2
1.3.1 Načrtovanje stabilnostnih študij	2
1.3.2 Potek stabilnostnih študij.....	3
1.3.3 Obremenilnostni test.....	4
1.3.4 Preliminarno testiranje.....	4
1.3.5 Pospešeno testiranje.....	4
1.3.6 Posebne metode pospešenega testiranja	5
1.3.7 Dolgoročno testiranje	7
1.4 Interpretacija rezultatov	7
1.5 Stabilnost industrijsko proizvedenih kozmetičnih izdelkov	7
1.6 Fizikalna nestabilnost emulzijskih sistemov	8
2 NAMEN DELA.....	13
3 MATERIALI IN METODE	14
3.1 Vibracijsko testiranje	14
3.2 Organoleptično vrednotenje.....	16
3.3 Reološke meritve.....	17
3.4 Stereomikroskopija	19

3.5	Polarizacijska mikroskopija	20
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	22
4.1	Vibracijsko testiranje	22
4.2	Organoleptično vrednotenje stabilnosti	22
4.3	Reološke meritve.....	24
4.4	Stereomikroskopija	35
4.5	Polarizacijska mikroskopija	35
5	SKLEP	37
6	VIRI.....	38
7	Priloga I: Recepture testiranih izdelkov	41
8	Priloga II: Rezultati diferenčne dinamične kalorimetrije	44
9	Priloga III: Organoleptično vrednotenje vzorcev	45
10	Priloga IV: Rezultati stereomikroskopije	47
11	Priloga V: Rezultati polarizacijske mikroskopije	48

Kazalo grafov

Graf 1:	Viskoznostni diagram GLS stabilna in nestabilna, pred in po stresanju 6 ur	24
Graf 2:	Amplitudni test GLS stabilne in nestabilne, pred in po stresanju 6 ur	26
Graf 3:	Frekvenčni test GLS stabilne in nestabilne, pred in po stresanju 6 ur	27
Graf 4:	Viskoznostni diagram Matt kreme stabilne in nestabilne, pred in po stresanju 6 ur.....	29
Graf 5:	Amplitudno testiranje Matt kreme stabilne in nestabilne, pred in po stresanju 6 ur	30
Graf 6:	Frekvenčni test Matt kreme stabilne in nestabilne, pred in po stresanju 6 ur	31
Graf 7:	Viskoznostni diagram Barve stabilne in nestabilne, pred in po stresanju 6 ur.....	32
Graf 8:	Amplitudno testiranje Barve stabilne in nestabilne, pred in po stresanju 6 ur.....	33
Graf 9:	Frekvenčni test Barve stabilne in nestabilne, pred in po stresanju 6 ur	34

Graf 10: Termogram vzorcev GLS stabilna in Barva stabilna, (20 °C-50 °C, 5K/min)	44
--	----

Kazalo preglednic

Preglednica I: Metode in naprave s katerimi običajno merimo in vrednotimo lastnosti emulzij med in po stabilnostnih študijah	12
Preglednica II: Sestava stabilne in nestabilne čistilne emulzije O/V za občutljivo kožo	41
Preglednica III: Sestava stabilne in nestabilne emulzije O/V	42
Preglednica IV: Sestava stabilne in nestabilne emulzijske, trajno obstojne barve za lase tipa O/V	43

Kazalo slik

Slika 1: Stokes-ova enačba	9
Slika 2: Shematski prikaz oblik fizikalne nestabilnosti emulzijskih sistemov	11
Slika 3: Vibracijski stresalnik	15
Slika 4: Modularni reometer Anton Paar, Physica MCR 301	18
Slika 5: GLS stabilna (levo) in nestabilna (desno), pred stresanjem	45
Slika 6: GLS stabilna (levo) in nestabilna (desno), po stresanju 6 ur	45
Slika 7: Matt krema stabilna (levo) in nestabilna (desno), pred stresanjem	45
Slika 8: Matt krema stabilna (levo) in nestabilna (desno), po stresanju 6 ur	45
Slika 9: Barva nestabilna (levo) in stabilna (desno), pred stresanjem	46
Slika 10: Barva nestabilna (levo) in stabilna (desno), po stresanju 6 ur	46
Slika 11: GLS stabilna, pred stresanjem (72x)	47
Slika 12: GLS nestabilna, pred stresanjem (72x)	47
Slika 13: GLS stabilna, pred stresanjem (40x)	48
Slika 14: GLS stabilna, po stresanju 6 ur (40x)	48
Slika 15: GLS nestabilna, pred stresanjem (40x)	48
Slika 16: GLS nestabilna, po stresanju 6 ur (40x)	48
Slika 17: GLS stabilna, pred stresanjem (100x)	49

Slika 18: GLS stabilna, po stresanju 6 ur (100x).....	49
Slika 19: GLS nestabilna, pred stresanjem (100x)	49
Slika 20: GLS nestabilna, po stresanju 6 ur (100x)	49
Slika 21: Matt krema stabilna, pred stresanjem (4x)	49
Slika 22: Matt krema stabilna, po stresanju 6 ur (4x).....	49
Slika 23: Matt krema nestabilna, pred stresanjem (4x)	49
Slika 24: Matt krema nestabilna, po stresanju 6 ur (4x).....	49
Slika 25: Matt krema stabilna, pred stresanjem (40x)	49
Slika 26: Matt krema stabilna, po stresanju 6 ur (40x).....	49
Slika 27: Matt krema nestabilna, po stresanju 6 ur (40x)	49
Slika 28: Matt krema nestabilna, pred stresanjem (40x)	49
Slika 29: Barva stabilna, pred stresanjem (40x)	49
Slika 30: Barva stabilna, po stresanju 6 ur (40x).....	49
Slika 31: Barva nestabilna, pred stresanjem (40x)	49
Slika 32: Barva nestabilna, po stresanju 6 ur (40x)	49
Slika 33: Barva stabilna, pred stresanjem (100x, polarizacija)	49
Slika 34: Barva stabilna, po stresanju 6 ur (100x, polarizacija).....	49
Slika 35: Barva nestabilna, pred stresanjem (100x, polarizacija).....	49
Slika 36: Barva nestabilna, po stresanju 6 ur (100x, polarizacija)	49

POVZETEK

Na uporabnost in varnost kozmetičnih izdelkov pomembno vpliva njihova stabilnost, ki mora biti zagotovljena skozi celoten rok uporabe, med shranjevanjem in transportom le-tega od proizvajalca do potrošnika. S pomočjo stabilnostnih študij zagotavljamo njihovo fizikalno, kemijsko in mikrobiološko kakovost, funkcionalnost in estetske lastnosti pri normalnih pogojih shranjevanja. Zaradi raznolikosti in kompleksnosti kozmetičnih izdelkov ni na voljo standardnih testov. Proizvajalec jih mora praviloma, po lastni strokovni presoji in ob upoštevanju značilnosti izdelkov, načrtovati sam. Fizikalna nestabilnost povzroča težave med načrtovanjem in izdelavo kozmetičnih izdelkov, kot tudi med transportom, shranjevanjem in uporabo le-teh. Vzrok zanjo so lahko različni dejavniki, kot so neustrezno načrtovanje, proizvodnja, distribucija, uporaba in neprimerno shranjevanje izdelka. V okviru diplomske naloge smo uporabili metodo za pospešeno testiranje fizikalne stabilnosti grobo disperznih sistemov z uporabo mehanskih vibracij, ki bi lahko v krajšem času pokazala znake nestabilnosti izdelka ter tako zmanjšala obseg nadaljnjih testiranj. Testirali smo emulzijske sisteme izbranih izdelkov podjetja Ilirija d.o.o. Stresnim pogojem vibriranja smo izpostavili stabilne in nestabilne formulacije enakih izdelkov, ki so jih v podjetju predhodno sicer že testirali s pomočjo pospešenih in dolgoročnih testiranj. Metoda se je izkazala kot primerna, saj smo po šesturnem vibracijskem stresanju pri 25 °C in amplitudi 80% (nastavitve na vibratorju) z rotacijsko viskozimetrijo in polarizacijsko mikroskopijo dobili primerljive rezultate že obstoječim rezultatom testiranja v Ilirija d.o.o. Stereomikroskopija, oscilatorno testiranje in organoleptično vrednotenje so se kot testne metode v tem primeru izkazale za neustrezne, saj niso dale dovolj natančnih oziroma enotnih in reprezentativnih podatkov. Vzorcev nismo izpostavili stresanju pri povišani temperaturi (temperaturni komori), saj smo s pomočjo diferenčne dinamične kalorimetrije (DSC) ugotovili, da se pri dvigu temperature na okrog 40 °C sistemi že ireverzibilno spremenijo. Načrtovano testiranje pri zvišani temperaturi bi zato lahko uporabili za stabilnostno testiranje le takšnih disperznih sistemov, katerih komponente se pri teh temperaturah fizikalno ne spreminjajo.

Ključne besede: stabilnostno testiranje, fizikalna stabilnost, mehanske vibracije, reologija, polarizacijska optična mikroskopija

ABSTRACT

The usage and safety of cosmetic products are significantly influenced by their stability, which must be ensured throughout the entire shelf life, during storage and transport from the manufacturer to the consumer. With stability studies we ensure their physical, chemical and microbiological quality, functionality and aesthetic properties under normal storage conditions. Because of diversity and complexity of cosmetics, standard tests are not available. The manufacturer has to design them himself, with consideration of products characteristics and his professional judgment. Physical instability often causes problems during design development and manufacture of cosmetics, as well as during the transport, storage and their usage. The causes can be various factors, such as unsuitable design development, manufacturing design, distribution, usage and inappropriate storage of the product. In the diploma thesis, we used a method for accelerated stability testing of disperse systems physical stability by application of mechanical vibrations, which could show signs of instability in a short period of time and could also reduce the scope of further testing. We tested the emulsion systems of selected products, manufactured by the company Ilirija d.o.o. Stable and unstable formulations of the same products, which had already been tested with different accelerated and long-term tests by the company, were put under stressful vibrating conditions. After 6 hours of exposure to mechanical vibrations at 25 °C and the amplitude of 80%, comparable results were obtained with rotational testing and polarization microscopy, therefore the method proved to be suitable. Stereomicroscopy, oscillatory testing and organoleptic evaluation have proved to be unsuitable as test methods in this case, because the obtained data was not uniform and representative enough. Samples were not exposed to vibrations in the heat chamber, as they were found to be hypersensitive to elevated temperatures, such as 40 °C, by means of differential dynamic calorimetry (DSC). Testing could be used for the stability testing of only such disperse systems whose components do not physically change at elevated temperatures.

Key words: stability testing, physical stability, mechanical vibration, rheology, polarized optical microscopy

SEZNAM OKRAJŠAV

AFM	Mikroskopija na atomsko silo
DSC	Diferenčna dinamična kalorimetrija
GLS	Green line sensitive
O/O	Olje v olju
O/V	Olje v vodi
PAS	Površinsko aktivna snov
SEM	Vrstična elektronska mikroskopija
TEM	Presevna elektronska mikroskopija
V/O	Voda v olju

1 UVOD

1.1 Stabilnost kozmetičnih izdelkov

Kozmetični izdelki, ki so dostopni na trgu, morajo biti varni za zdravje ljudi, v kolikor so uporabljeni pod normalnimi in razumno predvidljivimi pogoji uporabe. Na varnost izdelkov pomembno vpliva tudi njihova stabilnost. Le-ta mora biti zagotovljena skozi celoten rok uporabe, med shranjevanjem in skozi čas, ki je potreben za transport izdelka od proizvajalca do potrošnika. Odgovorna oseba mora zagotoviti, da je bil izdelek proizveden v skladu z dobro proizvodno prakso, pred dajanjem na trg pa mora biti opravljena ocena varnosti ter sestavljeno poročilo o varnosti kozmetičnega izdelka (1, 2). Poročilo o varnosti kozmetičnega izdelka je sestavljeno iz dela A (informacije o varnosti) in dela B (ocena varnosti). Del A vsebuje informacije o kvantitativni in kvalitativni sestavi izdelka, fizikalnih in kemijskih značilnostih snovi kozmetičnega izdelka, njegovi stabilnosti v razumno predvidljivih pogojih shranjevanja, mikrobiološki kakovosti, nečistotah in podatke o embalažnem materialu. Vsi ti podatki so pomembni pri vrednotenju in zagotavljanju stabilnosti ter kakovosti kozmetičnega izdelka. Informacije o stabilnosti potrebujemo tudi za določitev minimalnega roka trajanja v originalno zaprti ovojnini in obdobja uporabnosti po odprtju. Minimalni datum uporabe je datum, do katerega je najbolje, da se izdelek uporabi, saj še opravlja svojo prvotno nalogo, je stabilen in varen za uporabo. Ta rok uporabnosti mora biti natančno in jasno naveden pri vseh kozmetičnih izdelkih. Kadar je minimalni rok trajanja daljši od 30 mesecev, moramo potrošnika seznaniti s tem, koliko časa po odprtju kozmetičnega izdelka ga lahko brez škode še uporablja. Izjema so izdelki, pri katerih pojem trajnosti izdelka po odprtju ni pomemben, na primer izdelki za enkratno uporabo, izdelki, ki se ne pokvarijo ali pa se ne odpirajo. Del A mora vsebovati tudi opis metodologije, s katero smo določili minimalni rok trajanja izdelka ter vse razpoložljive podatke za njegovo utemeljitev. Za preverjanje navedenega roka mora vsebovati opis posebnih preizkusov za študijo stabilnosti in njihove rezultate. Dokazati moramo, da je sestava izdelka, katerega stabilnost preizkušamo, enaka izdelku na trgu, podati moramo rezultate študij učinkovitosti konzervansov, kadar je to potrebno ter kjer je ustrezno, tudi obdobje po odprtju in njegovo utemeljitev. V delu B so navedene informacije, kot je

ocena medsebojnih vplivanj snovi, ki jih izdelek vsebuje ter ocena vplivov stabilnosti na varnost kozmetičnega izdelka (1, 3).

1.2 Znaki nestabilnosti kozmetičnega izdelka

Znaki nestabilnosti so posledica fizikalnih, kemijskih in mikrobioloških sprememb v izdelku, ki jih kdaj lahko zaznamo že z organoleptičnim vrednotenjem. Fizikalna nestabilnost je lahko posledica kompleksnih vplivov sestave in proizvodnje, distribucije, uporabe ter nepravilnega shranjevanja izdelka. Pojavijo se spremembe, kot so ločitev faz, sedimentacija, agregiranje, geliranje, heterogenost zmesi, hlapenje, kristalizacija, mehčanje, pokanje, itd. Kemična nestabilnost je posledica vplivov dejavnikov okolja kot tudi okolja v izdelku (pH, ionska moč, pomožne snovi, ovojnina, itd.). Lahko pride do spremembe barve in vonja, itd. Posledice kemične nestabilnosti lahko vplivajo tudi na fizikalno ter mikrobiološko stabilnost izdelka (4). Slednja je lahko slabša zaradi kontaminacije surovin ali samega izdelka med shranjevanjem, transportom ali uporabo ter neustrezne ovojnine in konzerviranja. Kontaminacija izdelka vpliva na toksikološko stabilnost ter vodi do kemičnih in fizikalnih sprememb. Fizikalne, kemijske in mikrobiološke spremembe odvrnejo potrošnika tudi zaradi neestetskih lastnosti oz. videza. Posledica nestabilnosti je tudi izguba učinkovitosti ali vsebnosti aktivnih komponent, kar lahko tudi ugotovljamo z ustreznimi kemijskimi analiznimi metodami (2). Pri zagotavljanju stabilnosti govorimo o razumno predvidljivih pogojih shranjevanja izdelka, zato je pomembno, v kolikor ti pogoji vplivajo na stabilnost, slednje zagotavljati skozi celotno dobavno verigo in jih tudi navesti na izdelku (3).

1.3 Stabilnostne študije

Namen stabilnostnih študij je zagotoviti fizikalno, kemijsko in mikrobiološko kakovost kozmetičnih izdelkov v skladu s predpisano zakonodajo in standardi ter njihovo funkcionalnost in estetske lastnosti pri normalnih pogojih shranjevanja (5).

1.3.1 Načrtovanje stabilnostnih študij

Za kozmetične izdelke je značilna njihova raznolikost in kompleksnost, raznolikost v obojnini ter znakih in vrsti nestabilnosti, lastniška narava testnih metod, hiter razvoj novih formulacij velikega števila izdelkov ter s tem večji stroški glede testiranj. Morda tudi zaradi naštetih

dejavnikov ni standardnih testov stabilnosti. Proizvajalec stabilnostne teste načrtuje sam, po lastni strokovni presoji, pri tem pa mora upoštevati specifičnost izdelka, proizvodnega procesa, procesa distribucije, izkušnje ter učinkovitost in namen testiranja (5).

Cilj načrtovanja stabilnostnih študij je zasnovanje postopkov, ki bodo skozi celoten čas izvajanja omogočala pridobivanje informacij o ustreznosti in stabilnosti izdelka. Poznati moramo sestavo in karakteristiko formulacije izdelka, saj le tako lahko ustrezno vrednotimo parametre stabilnosti, pri določanju ustreznih vrednosti le-teh pa moramo upoštevati tudi zakonodajo. Vrednosti se razlikujejo pri različnih vrstah izdelkov in proizvajalcih glede na različne postopke proizvodnje in izkušnje. Zaželeno je, da poznamo že obstoječe informacije o posameznih sestavinah, materialih ovojnine in postopkih izdelave podobnih izdelkov, saj tako lažje načrtujemo študije, ki omogočajo vrednotenje pravih parametrov in pridobivanje kakovostnih in zadovoljivih rezultatov. Pogoji, v katerih potekajo testiranja, morajo ustrezati pogojem, ki jim je izdelek lahko izpostavljen med transportom, skladiščenjem, shranjevanjem in uporabo. Pomemben je tudi izbor serije izdelkov (laboratorijska, pilotna, proizvodna), saj morajo le-te ustrezati in biti enaki izdelkom, ki se tržijo. Zagotoviti moramo zadostno količino vzorcev, ki jih testiramo, da lahko vzorčimo v več točkah oziroma, da je mogoče ponovno testiranje. Izbrane izdelke, ki jih testiramo, uporabljen material, metodologijo izvedbe testiranja, pogoje, v katerih testiramo izdelek in osebo, ki testiranja izvaja, moramo ustrezno dokumentirati v poročilu (5). Stabilnostne študije izvajamo, kadar načrtujemo in razvijamo nov izdelek, kadar spremenimo formulacijo izdelka, ki je že dostopen na trgu, po spremembi postopka izdelave ali lokacije proizvodnje ter kadar spremenimo ovojnino (6).

1.3.2 Potek stabilnostnih študij

Stabilnostne študije potekajo tako, da vzorce kozmetičnih izdelkov izpostavimo različnim okoljskim pogojem oziroma pogojem shranjevanja, za določen čas. Tako lahko opazujemo in kasneje vrednotimo stanje formulacij pri oziroma po izpostavitvi omenjenim pogojem, ki so jim lahko izpostavljene tudi med uporabo. Pomembno je, da je vzorec posamezne formulacije, ki jo testiramo, enak tistemu, ki je dostopen na tržišču. Posamezne parametre vzorcev merimo in vrednotimo v izbranih časovnih intervalih in jih primerjamo z vrednostmi kontrolnih vzorcev. Vse spremembe dokumentiramo. Za vrednotenje istih parametrov lahko uporabimo

več metod testiranja, za določene izdelke pa lahko uporabimo tudi edinstvene metode, s katerimi dobimo zadovoljive rezultate. Stabilnost izdelka v ovojnini testiramo v najmanjši ovojnini, ki je enaka tisti, ki se nahaja na tržišču. Vzorec tehtamo, preverimo ustrezno zapiranje, funkcionalnost ter spremembe formulacije in ovojnine. Kontrolne vzorce polnimo v stekleno, inertno ovojnino. Kadar je potrebno spremljanje deleža aktivnih komponent, vrednotimo tudi t.i. parametre kakovosti in učinkovitosti (2, 7, 8).

V okviru stabilnostnih študij vrednotimo parametre, kot so:

- Organoleptične lastnosti (barva, vonj, izgled, tekstura)
- Fizikalno-kemijske lastnosti (pH, viskoznost, gostota)
- Mikrobiološka stabilnost (mikrobiološka analiza, »izzivni test«)
- Stabilnost v ovojnini/kompatibilnostni test (adsorpcija izdelka na ovojnino, korozija, prepustnost ovojnine za vlago, kisik, mikroorganizme, itd.)
- Drugo (analitske metode za specifične parametre, itd.)

1.3.3 Obremenilnostni test

Pred izvedbo stabilnostnih študij naredimo t.i. obremenilnostni ali centrifugalni test. Vzorec izpostavimo visoki temperaturi (npr. 50 °C) in centrifugiranju (3000 rpm, 30 minut). V primeru kakršnih koli znakov nestabilnosti je potrebna sprememba formulacije. S pomočjo tega testa zmanjšamo obseg nadaljnjih stabilnostnih testov (8).

1.3.4 Preliminarno testiranje

Testi zajemajo testiranje formulacij v razvoju. Običajno trajajo do 15 dni, vzorci pa so izpostavljeni visoki in nizki temperaturi ali cikličnemu spreminjanju temperature. Temperaturo in časovni potek prilagodimo tipu formulacije. Vrednotimo organoleptične in fizikalno-kemijske lastnosti (8).

1.3.5 Pospešeno testiranje

Pospešeni testi so bili razviti predvsem zaradi kratkega razvojnega cikla kozmetičnih izdelkov. Omogočajo napoved stabilnosti in roka uporabe ter kasnejše izboljšave formulacij in metodologije izvedbe testiranj. S tovrstnimi testi bistveno zmanjšamo obseg in ceno

dolgoročnega testiranja. Običajno rezultate teh testiranj potrdimo z rezultati dolgoročnih testiranj. Testiranje temelji na pospešitvi nestabilnostnih procesov ter na ekstrapolaciji rezultatov na normalne pogoje shranjevanja. Prav tako lahko dobimo podatke o stabilnosti izdelka v primeru nenadne izpostavitve pogojem, ki se razlikujejo od predvidenih normalnih pogojev shranjevanja. Potek študije se razlikuje glede na tip izdelka, najpogosteje pa gre za izpostavitve nizkim ali visokim temperaturam oziroma cikličnemu spreminjanju temperature. Traja najmanj 90 dni. Termično pospešeno testiranje je ustrezno le za vrednotenje stabilnosti, kjer gre za termično pogojene reakcije. S tovrstnim testiranjem ne moremo zaznati znakov nestabilnosti izdelka, ki so posledica fizikalnih dejavnikov (stresanje med transportiranjem, sprememba agregatnih stanj in fizikalnega stanja pripravka, itd.) ter mikrobiološke kontaminacije, vplivov svetlobe ali prisotnosti katalizatorjev. Pri pospešenem testiranju je možna tudi uporaba različnih matematičnih modelov za napovedovanje stabilnosti izdelka. Poleg fizikalno-kemijskih in organoleptičnih lastnosti, vrednotimo tudi mikrobiološke lastnosti izdelka, v okviru katerih je potrebna mikrobiološka analiza in t.i. izzivni test, s katerim vrednotimo učinkovitost konzerviranja izdelka. Zanj ni predpisanih standardnih postopkov, potrebno pa je upoštevanje zakonodaje (2, 5, 8, 9).

1.3.6 Posebne metode pospešenega testiranja

Tovrstni testi so namenjeni vrednotenju funkcionalnosti in stabilnosti kozmetičnih izdelkov po izpostavitvi stresnim pogojem, ki so enaki tistim med transportom, shranjevanjem ter specifičnim pogojem uporabe. Proizvajalec se odloči za tovrstna testiranja predvsem kadar gre za občutljive formulacije v omenjenih pogojih. Vzorce izdelkov izpostavimo svetlobi, vlagi, neobičajno visoki ali nizki temperaturi in mehaničnemu stresu (2, 5, 7, 9).

I Temperaturni testi

Izdelke izpostavimo cikličnemu temperaturnemu programu ali “freeze-thaw” programu, kjer jih zaporedno zamrzujemo in odtajamo. Testiranje je primerno le za nekatere specifične vrste izdelkov. Zaznamo lahko spremembe, ki so značilne za nestabilnost suspenzij in emulzij, oziroma tiste, ki so posledica uporabe neustrezne ovojnine.

II Izpostavitev vlagi

Testi omogočajo vrednotenje ustreznosti ovojnine izdelka. Ta naj bi namreč preprečevala vstop vlage v izdelek in s tem nadaljnje reakcije, ki vodijo do nestabilnosti.

III Izpostavitev vlagi in temperaturi

Testi so namenjeni vrednotenju stabilnosti izdelka pri pogojih, kjer kombiniramo različne temperature in stopnje relativne vlažnosti.

IV Izpostavitev svetlobi

Testiramo izdelke, ki so običajno izpostavljeni svetlobi pri uporabi in shranjevanju, njihova ovojna pa svetlobo prepušča. Intenziteta in valovna dolžina svetlobe morata biti primerljivi z realnimi pogoji izpostavitve, pogosto testiramo izdelek na sončni svetlobi ali s pomočjo umetnih virov svetlobe v posebnih komorah. Vzorec mora ohraniti prvotne lastnosti vsaj 15 dni.

V Stresno testiranje

Testi so namenjeni vrednotenju fizikalne stabilnosti izdelkov. Pri obremenitvah izdelka lahko pride do znakov nestabilnosti, kot so ločitev faz, sprememba velikosti delcev/kapljič emulzij, suspenzij in praškov. Z običajnimi stabilnostnimi testi nekaterih tovrstnih sprememb ne moremo zaznati.

- Vibracijski test je namenjen vrednotenju stabilnosti praškov, emulzij, suspenzij in pen. Test lahko traja nekaj ur, glede na tip izdelka pa prilagodimo amplitudo, frekvenco in čas delovanja vibracijskega stresalnika.
- Testiranje mehničnega šoka omogoča vrednotenje vplivov premikanja in tresenja med transportom na kozmetični izdelek in njegovo ovojno.
- Centrifugalna separacijska metoda je primerna za testiranje stabilnosti emulzij. Na izdelek deluje centrifugalna sila pri konstantni hitrosti vrtenja. Vrednotimo ločevanje faz.

- Test padanja je metoda vrednotenja stabilnosti praškastih izdelkov. Izdelek zaporedno spuščamo iz znane višine in nato ocenimo število spustov, ki so potrebni za porušitev ustrezne oblike formulacije.
- Test obremenitve je test, s katerim ocenimo stabilnost oblike izdelkov, kot so šminke in svinčniki, ki jih obremenimo z upogibanjem. Merimo silo, ki je potrebna za izgubo oblike oziroma fizikalne stabilnosti izdelka.
- Test trenja je test, pri katerem ocenimo trajnost mil in obrabe lakov za nohte s pomočjo delovanja sile trenja.

1.3.7 Dolgoročno testiranje

Testi potekajo pri sobni temperaturi, okvirni čas trajanja pa je predvideni rok uporabe, ki smo ga predhodno določili s pomočjo pospešenega testiranja. V primeru trženja izdelka na geografskih področjih z višjo ali nižjo temperaturo in vlažnostjo zraka, temu primerno prilagodimo pogoje testiranja. V določenih, običajno daljših, časovnih intervalih vrednotimo lastnosti izdelka, rezultate pa lahko nadgradimo s pomočjo rezultatov tržnih raziskav in povratnih informacij potrošnikov. Testi so časovno in finančno zelo zahtevni (5, 9).

1.4 Interpretacija rezultatov

Vzorci po testiranju primerjamo s kontrolnim vzorcem, ki je bil hranjen v pogojih, ki ustrezajo normalnim pogojem shranjevanja in uporabe ter je stabilen znotraj roka uporabe. Formulacija kozmetičnega izdelka je sprejemljiva, kadar so parametri, ki jih vrednotimo po izvedbi testiranja, nespremenjeni oziroma minimalno spremenjeni. Sprejemljive vrednosti parametrov definira proizvajalec sam. Za pridobitev omenjenih podatkov uporabljamo različne analize in eksperimentalne metode (5, 8).

1.5 Stabilnost industrijsko proizvedenih kozmetičnih izdelkov

Vrednotenju stabilnosti kozmetičnih izdelkov v fazi razvoja sledijo postopki in metode, s katerimi vrednotimo stabilnost na ravni industrijske proizvodnje. Pogosto se srečamo s težavami, kot so spremembe viskoznosti, barve izdelka ter ločevanje faz, kljub temu, da se izdelki, v prej omenjenih testiranjih izkažejo za stabilne. Zagotoviti moramo, da sta sestava in kakovost surovin enotna, poleg tega moramo vzdrževati konstantne pogoje med proizvodnjo.

Problematične so spremembe v temperaturi, strižnih obremenitvah, trajanju proizvodnje, spremembe v zaporedju in načinu vgrajevanja surovin med proizvodnjo, itd. Do raznolikosti v končnih proizvodih lahko pride tudi zaradi sprememb v fazi polnjenja izdelka v primarno ovojnino ter zaradi povečanja obsega proizvodnje. Omenjeni dejavniki ne vplivajo le na stabilnost, vendar tudi na ponovljivost in s tem na kakovost kozmetičnih izdelkov, zato je pomembno, da že v fazi razvoja načrtujemo in predvidimo možne vplive sestavin in procesov proizvodnje.

Doseganje stabilnosti kozmetičnega izdelka je zahteven in dolgotrajen proces, enako pa velja za reševanje težav, povezanih z nestabilnostjo izdelka. Nepravilnosti lahko odpravimo s pristopom, pri katerem korak za korakom spremljamo posamezne stopnje proizvodnje. Pomembno je, da vzrok za težave odkrijemo in razumemo, zakaj je do le-teh prišlo, saj nam to omogoča širjenje znanja in lažje načrtovanje proizvodnje ostalih izdelkov. Pogosto je potrebna prilagoditev formulacije izdelka z dodatkom antioksidantov, kelirajočih sredstev, uravnavanjem pH ter količine vgrajenih sestavin, odstranjevanjem nečistot, itd. Spremenimo lahko tudi postopke in pogoje proizvodnje. Z izbiro ustrežnejše ovojnine preprečimo vstop kisika, mikroorganizmov in vlage v izdelek, ustrežnejši material pa onemogoči adsorpcijo sestavin in izgubo vlage. Zagotoviti moramo tudi primerno shranjevanje vhodnih sestavin in proizvodov (običajno v temnih prostorih, pri nizki temperaturi) (2).

1.6 Fizikalna nestabilnost emulzijskih sistemov

Emulzija je zmes dveh tekočih faz, ki se med seboj ne mešata. Notranja faza je dispergirana v zunanji, disperzni fazi v obliki kapljic, velikosti od 0,1 μm -50,0 μm . Poznamo emulzije tipa O/V (olje v vodi), V/O (voda v olju) ter O/O (olje v olju), kjer se oljni fazi razlikujeta v polarosti in se zato ne mešata. Za nastanek stabilne emulzije določenega tipa je potreben ustrezen emulgator. Emulzije so termodinamsko nestabilne, motne in večinoma spadajo med grobo disperzne sisteme. Vzrok za nestabilnost je velika medfazna energija, ki je odvisna od medfazne napetosti obeh faz in površine med fazama (10). Fizikalne značilnosti so odvisne od velikosti kapljic, deleža dispergirane faze in medija disperzne faze ter načina izdelave. K povečanju stabilnosti emulzij prispeva manjša velikost kapljic dispergirane faze, zaželeno je tudi, da imajo te čim manj medsebojnih interakcij in čim manjšo gostoto, prav tako pogosto velja, da je emulzija bolj stabilna, kadar sta gostota in viskoznost medija večji (11, 12).

a) Flotacija in sedimentacija

Običajno pride do tovrstnih oblik nestabilnosti zaradi delovanja zunanjih sil, kot sta gravitacijska in centrifugalna sila. Ko sili presežeta termično oziroma Brownovo gibanje, nastali koncentracijski gradient povzroči hitrejše gibanje večjih kapljic proti vrhu, v primeru, da imajo le-te manjšo gostoto kot medij. Pojav imenujemo flotacija (ang. creaming). V nasprotnem primeru pa se večje kapljice hitreje pomikajo proti dnu reakcijske posode in sedimentirajo. Na hitrost obeh pojavov vpliva premer kapljic, viskoznost medija in razlika v gostoti obeh faz, kar opisuje Stokes-ova enačba na sliki 1. Kapljice se lahko gosto pakirajo na vrhu ali dnu sistema, preostanek pa sestavlja kontinuirana tekoča faza (10, 11, 12).

$$v = \frac{2r^2(\rho_1 - \rho_2)g}{9\eta}$$

Slika 1: Stokes-ova enačba

V Stokes-ovi enačbi, kjer je v -hitrost flotacije ali sedimentacije, r -polmer kapljice, ρ_1 -gostota kapljice, ρ_2 -gostota disperznega medija, g -sila gravitacije, η -viskoznost disperznega medija (13).

b) Flokulacija

Kapljice pri procesu flokulacije agregirajo v večje skupke, pri tem pa se njihova primarna velikost ne spremeni. Proces je posledica delovanja privlačnih van der Waalsovih sil na krajših razdaljah, zaradi nezadostnega odboja kapljic. Nezadostni odboj je lahko posledica uporabe neustrezne količine emulgatorja oziroma velike prostornine notranje faze. Medfazni film ostane intakten. Glede na magnitudo privlačne energije ločimo "močno" in "šibko" obliko flokulacije. T.i. flokuli se redispergirajo, če emulzijo pretresemo (10, 11, 12).

c) Ostwaldova rast

Pojav je posledica t.i. končne topnosti tekočih faz. Faze, za katere pravimo, da se med seboj ne mešajo, imajo namreč topnost, ki ni zanemarljiva. V emulzijah, ki so običajno polidisperzne, imajo manjše kapljice večjo topnost v primerjavi z večjimi. Po določenem

času, manjše kapljice izginejo, njihove molekule difundirajo v večje kapljice. Tako se s časom porazdelitev velikosti kapljic nagiba k večjim vrednostim (10, 11, 12).

d) Koalescenca

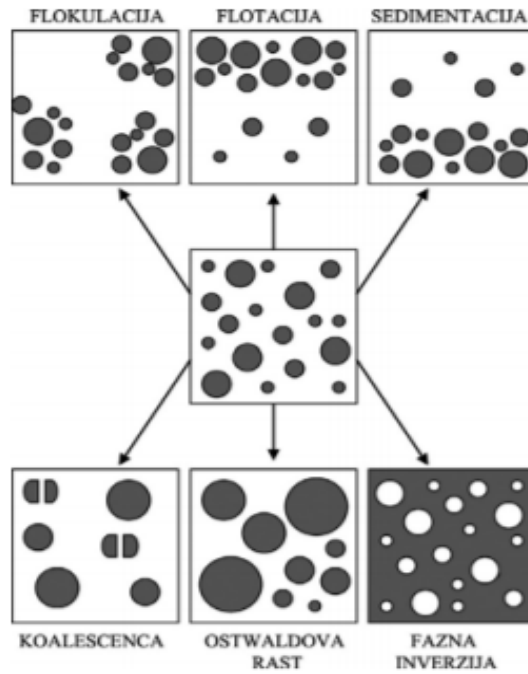
Izraz se nanaša na proces tanjšanja in prekinitve tekočega filma med kapljicami, zaradi česar pride do združevanja manjših v večje kapljice. Pojav je ireverzibilen. Fluktuacija filma na površini kapljic omogoči približanje le-teh, privlačne van der Waals-ove sile pa preprečujejo njihovo ločitev. Vzrok za neustreznost medfaznega filma je pogosto nezadostna količina ali neprimerni emulgatorji (10, 11, 12).

e) Ločitev faz

Običajno koalescenci dispergiranih kapljic sledi ločitev faz. Pojav je ireverzibilen. Nastali sistem nima več ugodnih lastnosti emulzij, prav tako moti pravilno odmerjanje in uporabo izdelka. Vzrok za ločitev faz je lahko fizikalnega, kemijskega ali biološkega izvora, ki vpliva na naravo medfaznega filma emulgatorja. Primer fizikalnega dejavnika je npr. uporaba neustreznega tipa emulgatorja (O/V namesto V/O), dodatek topila, ki ustreza obema fazama; neustrezna temperatura (koagulacija proteinskega emulgatorja, spodbujanje združevanja kapljic), zamrzovanje, presežna količina notranje faze, nezadostna količina emulgatorja, itd. (10, 11, 12).

f) Fazna inverzija

Fazna inverzija ali fazni obrat je termin, ki se nanaša na zamenjavo dispergirane in disperzne faze. Na primer O/V emulzija lahko s časom ali zaradi sprememb v pogojih, postane emulzija tipa V/O in obratno. Do fazne inverzije pride preko vmesnih prehodnih faz. Običajno je posledica kemijske degradacije, lahko pa je posledica fizikalnih dejavnikov, kot je sprememba v razmerju med notranjo in zunanjo fazo ter ohlajanje emulzij, ki nastanejo s pomočjo mešanja dveh faz in sočasnega segrevanja. Na proces bistveno vpliva tudi narava emulgatorskega dela sistema. Fazna inverzija in druge oblike fizikalne nestabilnosti emulzij so prikazane na sliki 2. (10, 11, 12).



Slika 2: Shematski prikaz oblik fizikalne nestabilnosti emulzijskih sistemov

Preglednica I: Metode in naprave s katerimi običajno merimo in vrednotimo lastnosti emulzij med in po stabilnostnih študijah

Lastnost	Metoda/naprava za merjenje
Viskoznost, pretočne lastnosti	Rotacijski viskozimeter stožec-plošča, kapilarni, oscilacijski, navorni, medfazni viskozimetri, Hoeplerjev viskozimeter
Tekstura	Določanje natezne in tlačne deformacije
Barva, motnost, izgled	Kolorimeter; UV-VIS spektrofotometer, organoleptično vrednotenje
Specifična gostota	Piknometer
Ločevanje faz	Vizualno ali instrumentalno določanje t.i. "creaming value"
Prevodnost	Merilnik prevodnosti
Porazdelitev velikosti kapljic, koncentracija in velikost kapljic	Mikroskopiranje (optični, elektronski (TEM, SEM), AFM, fluorescentna konfokalna mikroskopija; slikovna analiza), instrumentalne meritve (PCS, Coulterjev števec, itd.)
Čas fazne separacije	-
Električni naboj, porazdelitev el. naboja	Mikroelektroforeza, elektroakustična spektroskopija

Med in po stabilnostnih študijah vrednotimo več različnih lastnosti emulzij, ki lahko nakazujejo na stabilnost / nestabilnost sistema. Pri tem so nam lahko v pomoč različne metode in najpogosteje uporabljene so navedene v preglednici I (12, 13).

Spremenjene lastnosti emulzij lahko poleg že omenjenih posledic nestabilnosti kozmetičnih izdelkov, neželjeno vplivajo na konsistenco, s tem pa na ustrezen nanos in razmaz ter teksturo izdelka, kot tudi na ustrezno dostavo kozmetično aktivnih učinkovin (14).

2 NAMEN DELA

Da bi ustrezno opredelili stabilnost ter s tem rok uporabe kozmetičnega izdelka, moramo opraviti stabilnostne študije, ki so tako časovno kot cenovno zelo zahtevne. Namen diplomske naloge je načrtovati stabilnostni test, ki bi v krajšem času in z dostopnejšimi postopki pokazal znake nestabilnosti izdelka ter tako zmanjšal obseg nadaljnjih testiranj in skrajšal tudi razvoj kozmetičnega izdelka.

S pomočjo pregleda literature in na podlagi izkušenj podjetja Ilirija d.o.o. smo ugotovili, da fizikalna nestabilnost pogosto povzroča nevšečnosti med načrtovanjem in izdelavo kozmetičnih izdelkov, kot tudi med transportom, shranjevanjem in uporabo le-teh. Vzroki zanjo so lahko zelo raznoliki, med njimi tudi kemična in mikrobiološka nestabilnost formulacije, ki ju tekom naših študij ne bomo posebej vrednotili.

Kot potencialno uporaben test smo izbrali vibracijsko obremenitev sistemov. Pri tem bomo določili stresne pogoje, kot sta amplituda in čas vibriranja ter temperaturo pri kateri bomo vzorce stresali/vibrirali. Testirali in vrednotili bomo emulzijske sisteme izbranih izdelkov podjetja Ilirija d.o.o. Stresnim pogojem bomo izpostavili nestabilne in stabilne formulacije skoraj enakih izdelkov (glede na sestavine), ki so jih predhodno v podjetju že testirali s pomočjo drugih pospešenih in dolgoročnih stabilnostnih študij. Tako bomo poskusili ugotoviti ali vibracijski test omogoča pridobitev primerljivih rezultatov v krajšem času. Parametre, ki jih bomo primerjali in vrednotili, bomo pridobili s pomočjo različnih analiznih metod (organoleptično vrednotenje, reologija in optična mikroskopija). Rezultate bomo uredili in obdelali s pomočjo ustrezne programske opreme ter jih nato ustrezno interpretirali.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Vibracijsko testiranje

I Opis metode

Vibracijsko testiranje smo izvajali s pomočjo vibracijskega stresalnika (Retsch GmbH, Nemčija). Aparatura se uporablja v razvojno raziskovalnih oddelkih, pri nadzoru kakovosti vhodnih materialov, vrednotenju polizdelkov in končnih izdelkov ter pri spremljanju proizvodnje. Opremljena je z elektromagnetnim pogonom, ki omogoča 3-dimenzionalno “metalno gibanje” vzorcev, ki jih testiramo. Prilagodimo lahko čas in amplitudo stresanja (1-100 %; 0-3 mm). Najpogosteje se uporablja za sejanje praškov, pri čemur se na stresalnik namestijo sita. Omogoča separacijo, frakcioniranje in določitev velikosti delcev (15). V našem primeru sit nismo uporabili, ampak smo na aparaturo namestili centrifugirke z vzorci, ki smo jih stabilizirali s pomočjo kartonskih plošč, s tem pa smo preprečili tudi neprijeten hrup. Možne vplive ublažitve stresanja smo zaradi tanke plasti kartona zanemarili. Za tovrstno metodo smo se odločili, saj naj bi vibracijsko stresanje pospešilo porušitev viskoelastične strukture ter koalescenco kapljic dispergirane faze v emulzijskem sistemu (16).

I Eksperimentalno delo

Vzorci:

- GLS stabilna in nestabilna varianta, 2 x 45 ml; (Ilirija d.o.o., Priloga I, Preglednica II)
- Matt krema stabilna in nestabilna varianta, 2x 45 ml; (Ilirija d.o.o., Priloga I, Preglednica III)
- Barva stabilna in nestabilna varianta, 2x 45 ml; (Ilirija d.o.o., Priloga I, Preglednica IV)

Materiali:

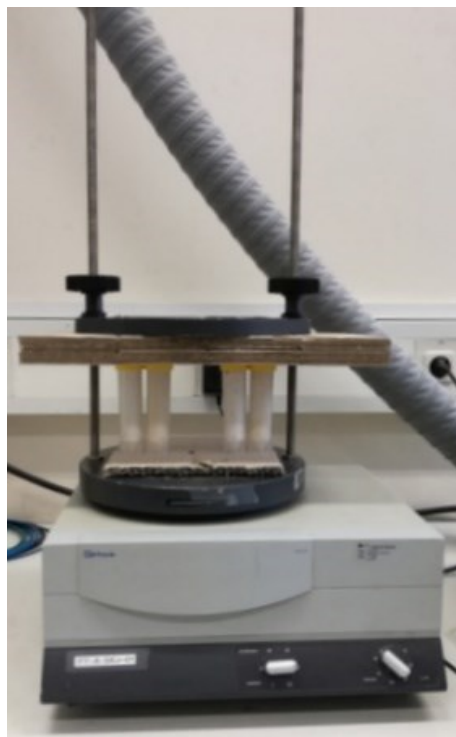
- Centrifugirke, 4x 50 ml (TPP Techno Plastic Products AG, Švica)
- Analitska tehtnica AX205 DR (Mettler Toledo, ZDA)

- Aluminijski lončki za termično analizo, 2x

Aparature:

- Vibracijski stresalnik Retsch AS 200 basic (Retsch GmbH, Nemčija)
- DSC 1, Star System (Mettler Toledo, ZDA)

Sprva smo vibracijskemu stresanju izpostavili vzorce 'GLS stabilna' in 'GLS nestabilna'. S pomočjo vibracijskega stresalnika (Slika 3) smo stresali 60 minut, z amplitudo 80%, pri sobni temperaturi (25 °C).



Slika 3: Vibracijski stresalnik

Po stresanju smo vzorec organoleptično vrednotili in opravili reološke meritve. Zaznali smo minimalne spremembe, zato smo v želji, da bi pridobili še bolj nazorne in očitne spremembe, stresali še nadaljnjih 5 ur. Po skupno šestih urah stresanja, smo zopet opravili reološke meritve in pri tem zaznali večje spremembe. S slednjim preizkusom smo določili minimalni čas stresanja vzorcev pri določeni amplitudi, ko pri sobnih pogojih že lahko zaznamo reološke spremembe, ki so posledica delovanja mehanskega stresa nanje.

Enakim pogojem smo nato izpostavili še ostale vzorce ('Matt krema stabilna' in 'Matt krema nestabilna', 'Barva stabilna' in 'Barva nestabilna').

Po šesturnem stresanju vzorcev pri sobnih pogojih, smo želeli vzorce izpostaviti še ostrejšim pogojem, kot je povišana temperatura, saj bi le-ta procese, ki vodijo k destabilizaciji sistemov, pospešila. Pri tem bi lahko uporabili temperaturno komoro, v katero bi ustrezno namestili vibracijski stresalnik ter nastavili ustrezne pogoje. Za določitev temperature, pri kateri bi vzorce lahko stresali, ne da bi pri tem vplivali na njihovo notranjo strukturo, smo uporabili metodo diferenčne dinamične kalorimetrije (DSC). Metoda torej omogoča, da merimo in opazujemo, kaj se dogaja z materialom pri določeni temperaturi, ohlajanju ali segrevanju. Opazujemo lahko morebitne toplotne prehode v proučevanem materialu, ki nakazujejo na spremembo v njegovih fizikalnih in mehanskih lastnostih (17). Vzorca 'GLS stabilna' (13,87 mg) in 'Barva stabilna' (14,49 mg) smo natehtali s pomočjo analitske tehtnice, nato pa ju vstavili vsakega posebej v lončka za termično analizo in ju dobro zaprli. Posamezen lonček z vzorcem in referenčni lonček smo hkrati segrevali po istem temperaturnem programu (25 °C-50 °C, 5K/min), instrument pa je izmeril razliko v toplotnem toku, ki ga je bilo potrebno dovesti posameznemu vzorcu, da sta sledila le-temu. S pomočjo instrumentalne meritve in računalnika z ustrezno programsko opremo, smo dobili izpis rezultatov v obliki termograma (Priloga II, Graf 10).

3.2 Organoleptično vrednotenje

I Opis metode

Organoleptično vrednotenje je ena najenostavnejših, najcenejših in najhitrejših metod za vrednotenje stabilnosti emulzijskih sistemov. Zajema vrednotenje teksture, izgleda, barve in vonja izdelka, katerih spremembe so lahko posredno ali neposredno posledica fizikalne nestabilnosti. Običajno lahko že s prostim očesom opazimo pojave, kot so flotacija ali sedimentacija ter končno ločitev faz, stopnjo nestabilnosti pa ocenimo s pomočjo širine pasu omenjenih pojavov. Fizikalno nestabilnost emulzijskih sistemov običajno opazimo, ko je ta že precejšnja. Opažanja dodatno potrdimo in natančneje vrednotimo s pomočjo

drugih analitskih metod. S pomočjo vizualnega opazovanja emulzij pa ne moremo vrednotiti pojavov kot so flokulacija, koalescenca in Ostwald-ova rast (12).

II Eksperimentalno delo

Vzorci:

- GLS stabilna in nestabilna varianta, 2 x 45 ml; (Ilirija d.o.o., Priloga I, Preglednica II)
- Matt krema stabilna in nestabilna varianta, 2 x 45 ml; (Ilirija d.o.o., Priloga I, Preglednica III)
- Barva stabilna in nestabilna varianta, 2 x 45 ml; (Ilirija d.o.o., Priloga I, Preglednica IV)

Stabilne in nestabilne vzorce vseh treh emulzij smo organoleptično vrednotili pred in po šesturnem vibracijskemu stresanju. Primerjali smo barvo, izgled, teksturo in vonj vzorcev.

3.3 Reološke meritve

I Opis metode

Viskoznost in pretočne lastnosti stabilnih in nestabilnih vzorcev smo izmerili s pomočjo reometra (Anton Paar Physica MCR 301, Avstrija) s sistemom stožec-plošča, ki omogoča meritve pod različnimi pogoji enostavnega striga. Omogoča kvantitativno in kvalitativno vrednotenje reoloških parametrov tekočih in poltrdnih sistemov v razvoju ali v okviru stabilnosti formulacij. Omogoča tudi posnemanje različnih tehnoloških procesov in spremljanje reoloških parametrov pri tem. Reometer je opremljen z različnimi moduli, ki omogočajo merjenje reoloških lastnosti na medfazah, nastavitev polarizacijskega mikroskopa, itd. Naprava deluje v temperaturnem območju od -40 do 200 °C, frekvenčnem območju od 10^{-5} do 10^2 Hz, območju strižne hitrosti od 10^{-5} do 10^4 s⁻¹, omogoča modularni način izvajanja meritev in uporabo kot rotacijski ali oscilacijski reometer (18, 19). Prednost reometra s sistemom stožec-plošča je ta, da omogoča hitro pridobitev rezultatov merjenja, enostavno čiščenje, potrebna pa je tudi majhna količina testiranega vzorca (20).

II Eksperimentalno delo

Vzorci:

- GLS stabilna in nestabilna varianta (Ilirija d.o.o., Priloga I, Preglednica II)
- Matt krema stabilna in nestabilna varianta (Ilirija d.o.o., Priloga I, Preglednica III)
- Barva stabilna in nestabilna varianta (Ilirija d.o.o., Priloga I, Preglednica IV)

Aparature:

- Modularni reometer Anton Paar, Physica MCR 301; merilni sistem stožec-plošča CP50-2 (Anton Paar, Avstrija)

Vzorcem smo pred in po posameznih izpostavitvah vibracijskemu stresanju izmerili reološke parametre s pomočjo modularnega reometra (Slika 4).



*Slika 4: Modularni reometer
Anton Paar, Physica MCR 301*

Pri tem smo uporabili merilni sistem stožec-plošča CP50-2, ki ga proizvajalec priporoča za izbrani poltrdni sistem. Približno 5 ml posameznega vzorca smo nanegli na ploščo ter nato s pomočjo nastavitve na računalniškem programu spustili stožec. Odvečno količino vzorca, ki se je iztisnila iz reže med stožcem in ploščo, smo odstranili s pomočjo spatule, nato pa s pomočjo programske opreme izbrali ustrezne pogoje in želene parametre, ki smo

jih merili. Reološke lastnosti vzorcev smo merili pod različnimi strižnimi pogoji, kot so stacionarni ali kontinuirani tokovni pogoji ter dinamični ali oscilatorni strižni pogoji. Meritve pri kontinuiranih tokovnih pogojih oziroma t.i. rotacijskem testiranju, smo izvajali tako, da smo strižno hitrost zvezno spreminjali in pri tem izmerili viskoznost, pri oscilatornih pogojih pa smo strižno obremenitev sinusno spreminjali z določeno frekvenco in amplitudo in pri tem merili delež viskoznega ter elastičnega prispevka k viskoelastičnemu odzivu emulzijskih vzorcev. Enostavne meritve reoloških količin smo dosegli tako, da smo meritve izvajali pri pogojih majhnih strižnih obremenitev, saj smo tako zagotovili, da se je snov na strižno silo odzvala v območju linearnega viskoelastičnega odziva, torej pri t.i. nedestruktivnih strižnih pogojih (21). Na reološke parametre pomembno vpliva temperatura, ki je bila konstantna skozi vsa merjenja, t.j. sobna temperatura, 25 °C. Rezultate meritev smo uredili in obdelali s pomočjo programske opreme Excel (Microsoft Office 365).

3.4 Stereomikroskopija

I Opis metode

Pri tej metodi smo uporabili stereomikroskop (Olympus SZX 12, Nemčija), ki omogoča do 120-kratno povečavo opazovanega vzorca ter pridobitev visokoločljivih posnetkov le-tega, in ki jih lahko opazujemo s pomočjo računalnika ter ustrezne programske opreme (22). Prednost metode je, da lahko vzorce opazujemo brez predhodne priprave ter jih pri tem ne poškodujemo. Opazujemo lahko njihovo površinsko strukturo in morebitne poškodbe. Omogoča tudi delo z materialom med opazovanjem in ima dve optični poti, ki omogočata pogled na opazovani vzorec z dveh strani. Tako lahko dobimo 3-dimenzionalno sliko vzorca. Programska oprema Olympus DP-Soft omogoča, da delcem ali kapljicam tudi izmerimo velikost (23).

II Eksperimentalno delo

Vzorci:

- GLS stabilna in nestabilna varianta (Ilirija d.o.o., Priloga I, Preglednica II)

Materiali:

- Objektno in krovno stekelce, 2x (Deltalab, Španija)
- Spatula

Aparature:

- Stereomikroskop Olympus SZX 12 (Olympus, Nemčija)
- Programska oprema cellSens Dimension (Olympus, Nemčija)

Vzorca 'GLS stabilna' in 'GLS nestabilna', ki nista bila izpostavljena mehanskemu stresu, smo vsakega posebej nanegli na objektno stekelce, nato pa nanju položili krovno stekelce. Pri postopku smo pazili, da je bilo v vzorcih čim manj zračnih mehurčkov, ki bi lahko motili kasnejše vrednotenje rezultatov. Prav tako sta morali biti stekelci dobro očiščeni. Pripravljeni vzorca smo nato opazovali s pomočjo stereomikroskopa, pri tem pa smo si pomagali z računalnikom in ustrezno programsko opremo. Vzorcju 'GLS nestabilna' smo izmerili kapljice. Posnetke emulzij smo shranili in vrednotili.

3.5 Polarizacijska mikroskopija

I Opis metode

Izbrani polarizacijski mikroskop (Olympus CX41, Nemčija) omogoča, da vzorce opazujemo brez ali z načinom polarizacije, pri čemur nanj namestimo polarizator in analizator. Osvetlitev vzorca s polarizirano svetlobo omogoča, da opazujemo in razlikujemo tiste komponente, ki so optično anizotropne (npr. tekoči kristali). Vidno polje je temno, osvetljeni pa so deli vzorca, v katerih se smer širjenja polarizirane svetlobe spremeni zaradi strukturne urejenosti (24, 25). Objektivni omogočajo 4-, 10-, 40- ali 100-kratno povečavo, slednji pa je imerzijski in zahteva uporabo imerzijskega olja.

II Eksperimentalno delo

Vzorci:

- GLS stabilna in nestabilna varianta (Ilirija d.o.o., Priloga I, Preglednica II)

- Matt krema stabilna in nestabilna varianta (Ilirija d.o.o., Priloga I, Preglednica III)
- Barva stabilna in nestabilna varianta (Ilirija d.o.o., Priloga I, Preglednica IV)

Materiali:

- Objektna in krovna stekelca (Deltalab, Španija)
- Kapalke
- Optična filtra za način polarizacije (polarizator in analizator)

Aparature:

- Polarizacijski mikroskop Olympus CX41 (Olympus, Nemčija)
- Fotoaparat Canon EOS 1100D (Canon, Japonska)
- Programska oprema QuickPHOTO CAMERA (Promicra, Češka)

Mikroskopirali smo stabilne in nestabilne vzorce, pred in po šesturnem stresanju na vibracijskem stresalniku, pri tem pa smo uporabili objektivne s 4-, 10-, 40- in 100-kratno povečavo. Pred tem smo posamezen vzorec nanegli v zelo majhni, mikrolitrski količini na objektno stekelce, nanj pa položili krovno stekelce. Pri tem smo pazili, da sta bili stekelci dobro očiščeni. Mikroskopirali smo od najmanjše proti največji povečavi, ustrezno osvetlili vzorec ter ga primerno izostrili. V primeru 40- in 100-kratne povečave smo uporabili optična filtra, ki sta posebej prilagojena polarizacijskemu načinu opazovanja vzorca, med samim opazovanjem vzorca pa smo ju ustrezno vrteli, s čimer smo prilagodili osvetlitev le-tega. Nato smo vzorec opazovali na ekranu računalnika, ga ponovno izostrili ter zajeli sliko s pomočjo fotoaparata. Slikam smo dodali merilo ter jih shranili. Sledilo je opazovanje slik ter analiza le-teh s primerjalno metodo.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Vibracijsko testiranje

a) Testiranje pri sobni temperaturi (25 °C)

S pomočjo reoloških meritev smo ugotovili, da je bilo enurno stresanje pri sobnih pogojih prekratko, saj so bile opazne le minimalne spremembe, ki so bile lahko tudi posledica prenašanja in rokovanja z vzorci ter morebitnih napak pri meritvah. V primeru šesturnega vibracijskega stresanja pri sobnih pogojih, pa smo zaznali večje spremembe, zato smo slednje izbrali kot minimalni in optimalni čas stresanja vzorcev izbranih emulzijskih sistemov.

b) Testiranje pri povišani temperaturi

S pomočjo DSC meritev smo dobili izpis rezultatov v obliki termograma (Priloga II, Graf 10), ki prikazuje, da je prišlo do termičnih prehodov, oziroma do sprememb v strukturah vzorcev, pri temperaturah nižjih od 40 °C. Segrevati bi torej morali do največ 30 °C, saj bi se le tako lahko izognili morebitnim vplivom visoke temperature na strukturo vzorcev. Temperatura bi bila za komaj 5 °C višja od sobne (25 °C), kar pa ne bi predstavljalo bistvene obremenitve vzorcev, kot smo to sprva želeli doseči. Odločili smo se, da izbranih vzorcev zato ne bomo izpostavili vibracijskemu testiranju pri povišanih temperaturah.

4.2 Organoleptično vrednotenje stabilnosti

a) GLS stabilna in nestabilna varianta

Oba vzorca sta bila pred stresanjem bele barve, na izgled homogena in brez vonja. Tekstura je bila primerno mazljiva (Priloga III, Slika 5).

Po šesturnem stresanju nismo zaznali sprememb (Priloga III, Slika 6).

b) Matt krema stabilna in nestabilna varianta

'Matt krema stabilna' je bila pred stresanjem bele barve z bisernim sijajem in prijetnega, odišavljenega vonja. Tekstura je bila mazljiva in zelo viskozna, na videz pa je bila homogena. Po šesturnem stresanju nismo zaznali sprememb (Priloga III, Slika 7).

'Matt krema nestabilna' je bila pred stresanjem rumenkasto-bež barve ter manj viskozna kot vzorec 'Matt krema stabilna'. Prav tako je imela drugačen in bolj neprijeten vonj kakor stabilna varianta, dišava pa je bila komaj zaznavna. Imela je tudi veliko zračnih mehurčkov.

Po šesturnem stresanju smo opazili še več zračnih mehurčkov v vzorcu, kar je nezaželeno, saj lahko vodi v fizikalno, kemično in biološko nestabilnost sistema (26). Drugih sprememb nismo zaznali (Priloga III, Slika 8).

c) Barva stabilna in nestabilna varianta

'Barva stabilna' je bila pred vibracijskem stresanjem bež barve, na videz homogena ter ustrezne, mazljive teksture. Vonj je bil rahlo neprijeten.

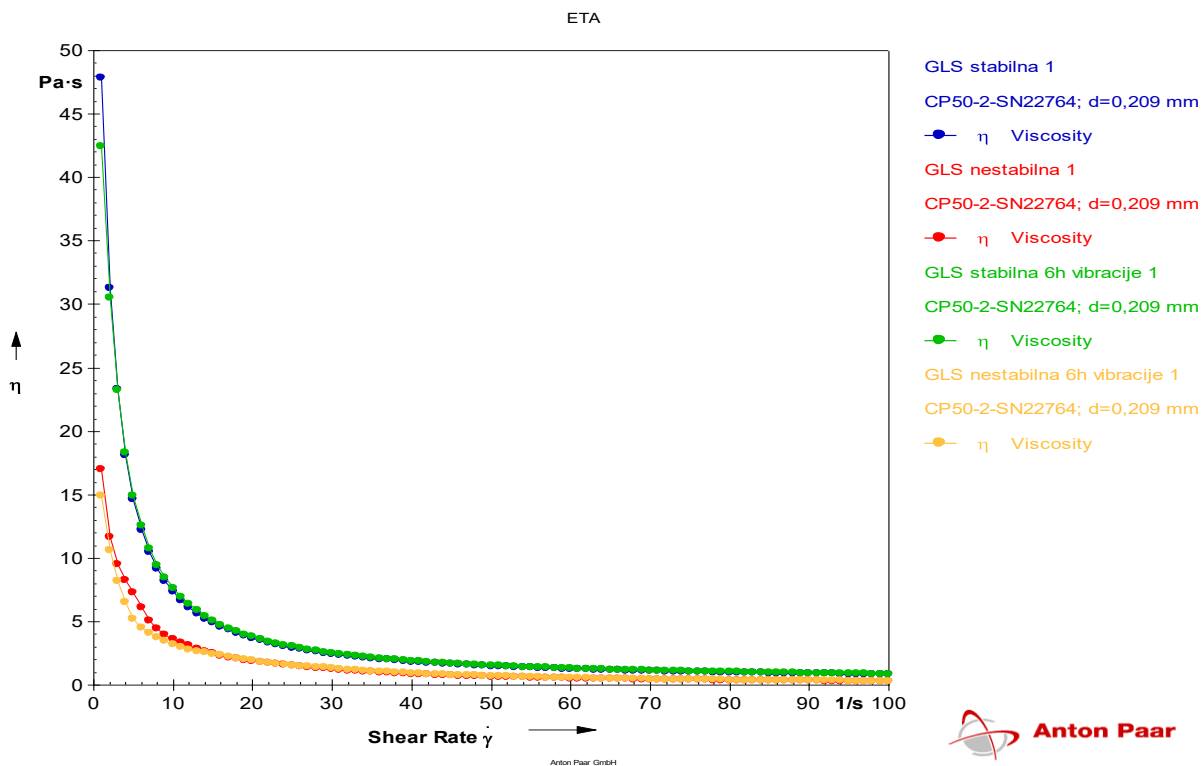
Po šestih urah stresanja je prišlo do spremembe barve emulzije. Vonj je bil bolj neprijeten kot pred stresanjem, tekstura pa je ostala nespremenjena (Priloga III, Slika 9).

'Barva nestabilna' je bila pred stresanjem neenakomerno rjave barve ter nekoliko slabše mazljivosti in bolj grobe teksture kot stabilna varianta. Vonj je bil neprijeten, na videz pa je bila nehomogena, s sledmi ločitve faz na meji z zračnimi mehurčki. Fizikalna in kemična nestabilnost sta bili torej zelo dobro opazni.

Po šesturnem stresanju je prišlo do spremembe barve v temnejši odtenek rjave ter do še bolj neprijetnega vonja emulzije. Omenjeni napredovalni znaki nestabilnosti so najverjetneje posledica občutljivosti formulacije na prisotnost zraka, katerega vključevanje v sistem povzroči vibracijsko stresanje pri sobnih pogojih. Zrak pospeši potek oksidativnih procesov, s tem pa tudi kemično nestabilnost sistema. Opazili smo tudi ločitev faz na meji z zrakom, kar je pomeni, da je emulzija fizikalno nestabilna. To je lahko posledica mnogih dejavnikov, med katerimi je tudi kemična nestabilnost (26). Mazljivost in nehomogenost strukture sta ostali nespremenjeni (Priloga III, Slika 10).

4.3 Reološke meritve

a) GLS stabilna in nestabilna varianta



Graf 1: Viskoznostni diagram GLS stabilna in nestabilna, pred in po stresanju 6 ur

Graf 1 prikazuje viskoznost (η) vzorcev 'GLS stabilna' in 'GLS nestabilna', pred in po stresanju 6 ur, v odvisnosti od strižne hitrosti ($\dot{\gamma}$.)

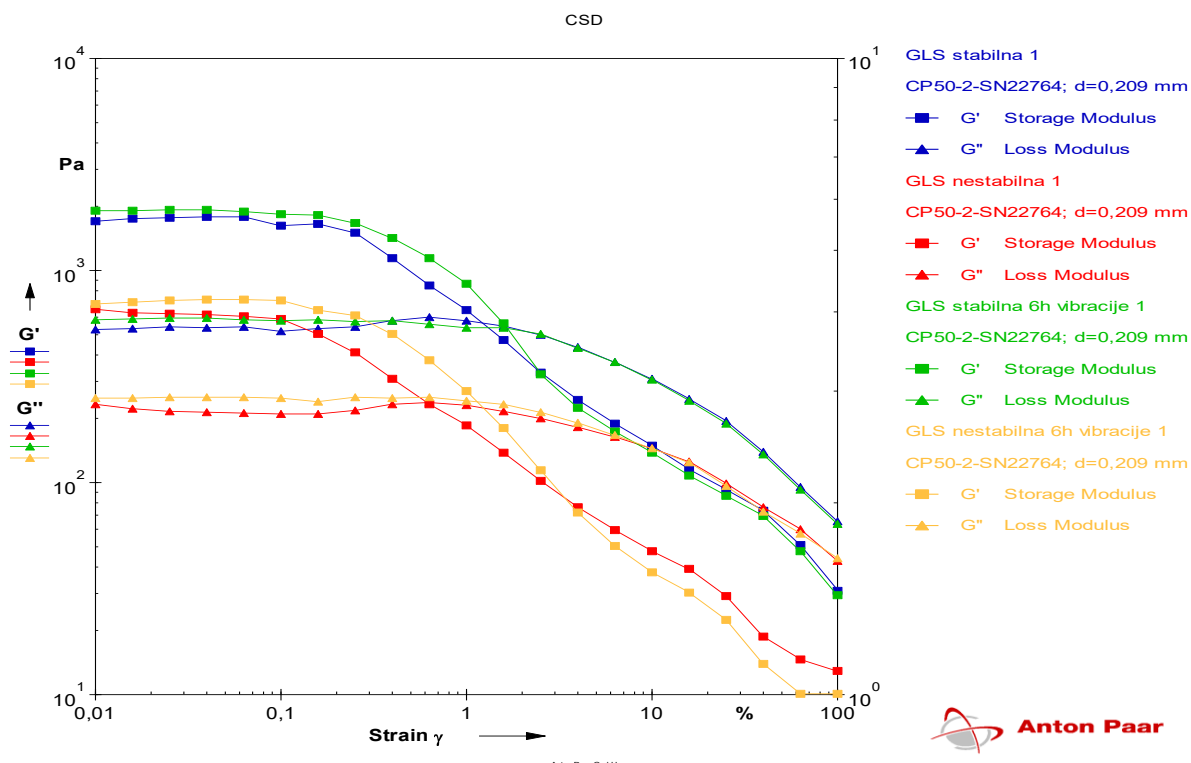
S pomočjo rotacijskega testiranja vzorcev smo dobili viskoznostne krivulje, značilne za psevdoplastične sisteme. Viskoznost podaja notranje trenje tekočin ali upor le-teh, da tečejo, in je določena kot razmerje med strižno napetostjo in strižno hitrostjo. Vzorec smo izpostavili strigu pri določeni strižni hitrosti, izmerili pa smo odgovarjajočo strižno napetost. Slednja je sorazmerna izmerjenemu navoru, ki je posledica upora vzorca proti strigu. Strižna hitrost je sorazmerna nastavljeni obodni hitrosti. Viskoznost testiranih emulzij je v območju zelo nizkih strižnih hitrosti konstantna, zaradi naključne porazdelitve osnovnih elementov sistema (viskoznost prvega newtonskega območja), pri večjih pa enakomerno upada, zaradi urejanja notranje strukture v smeri strižnega toka, in doseže neko konstantno vrednost pri visokih

strižnih hitrostih (viskoznost drugega newtonskega območja). Viskoznost emulzij je torej po permanentni deformaciji kapljic v smeri toka pri zelo velikih strižnih hitrostih nižja, kot v fazi mirovanja, vendar neodvisna od nadaljnjega povečevanja le-teh. Strižni pogoji, pri katerih emulzija izkazuje konstantno viskoznost prvega in drugega newtonskega območja, so odvisni od notranje strukture emulzije in zmožnosti prilagajanja le-te na strižni tok. Konstantne viskoznosti prvega newtonskega območja nismo mogli določiti, saj so vzorci emulzij izkazovali strižno odvisno upadanje le-te že pri nižjih strižnih hitrostih. Ta pojav opisuje Siskov reološki model (20).

'GLS stabilna' je v nasprotju z 'GLS nestabilna' bolj viskozna, saj vsebuje zgoščevala, ki delujejo kot reološki modifikatorji. Dodatek zgoščeval je namreč ena izmed metod za nadzor konsistence emulzijskega sistema in običajno pripomore k doseganju fizikalne stabilnosti le-tega. Na povečano viskoznost ima pomemben vpliv tudi homogenost emulzije (10, 27).

V primeru vzorca 'GLS stabilna', po stresanju 6 ur, ni prišlo do bistvene spremembe viskoznosti, le-ta se je povečala za 0,3%, kar je najverjetneje posledica homogenizacije zaradi vibracijskega stresanja. V primeru vzorca 'GLS nestabilna', se je viskoznost zmanjšala za 7,0%, kar pa je lahko posledica koalescence, ki smo jo zaznali tudi pri mikroskopiranju (Priloga V, Sliki 16 in 20). Posledica le-te je povečanje kapljic dispergirane faze, ki je v primeru tovrstnih emulzij oljna faza. Le-ta ima manjšo viskoznost, kot zunanja vodna faza. Pazljivost pri interpretaciji rezultatov in pridobitev le-teh z različnimi analiznimi metodami je še posebej pomembna zato, ker lahko pride do sočasne prisotnosti več različnih znakov fizikalne nestabilnosti. Tako lahko na primer pride do povečanja viskoznosti emulzijskega sistema, ki je običajno posledica sočasno prisotne koalescence in flokulacije. Kljub temu, da smo pri mikroskopiranju vzorca 'GLS nestabilna' po stresanju 6 ur opazili prisotnost flokulacije in koalescence, pa je glede na reološke meritve slednja prevladujoča. Pogosto povzroča težave pri interpretaciji reoloških meritev tudi Ostwald-ova rast. Zaradi omenjenih pojavov fizikalne nestabilnosti je pomembno, da določimo neko mejno vrednost viskoznosti, do katere je formulacija emulzije še zadovoljiva, s tem pa zagotovimo tudi ustreznost izdelka za nanos in uporabo (14).

Celokupno odstopanje izmerjenih vrednosti viskoznosti od začetnega stanja je po šestih urah vibracijskega stresanja v primeru vzorca 'GLS nestabilna' kar 9,1-krat večje v primerjavi z celokupnim odstopanjem vrednosti v primeru vzorca 'GLS stabilna'. Slednje opažanje smo preverili tudi s parnim t-testom. Razlike so statistično značilne pri 0,95 stopnji zaupanja. S tem smo dokazali, da je 'GLS nestabilna' bistveno bolj labilna na mehanski stres kot 'GLS stabilna' in potrdili njeno neustreznost oziroma fizikalno nestabilnost. Vzrok za to so lahko številni dejavniki, kot so kemijska sestava in viskoznost disperznega medija, viskoznost in volumski delež oziroma koncentracija dispergirane faze, strižna hitrost in strižna napetost, ki delujeta na sistem, lastnosti kapljic, kot so porazdelitev velikosti, deformabilnost in medsebojne interakcije, ter elastičnost emulgatorskega filma, ki je odvisna od koncentracije in narave le-tega (12, 28).

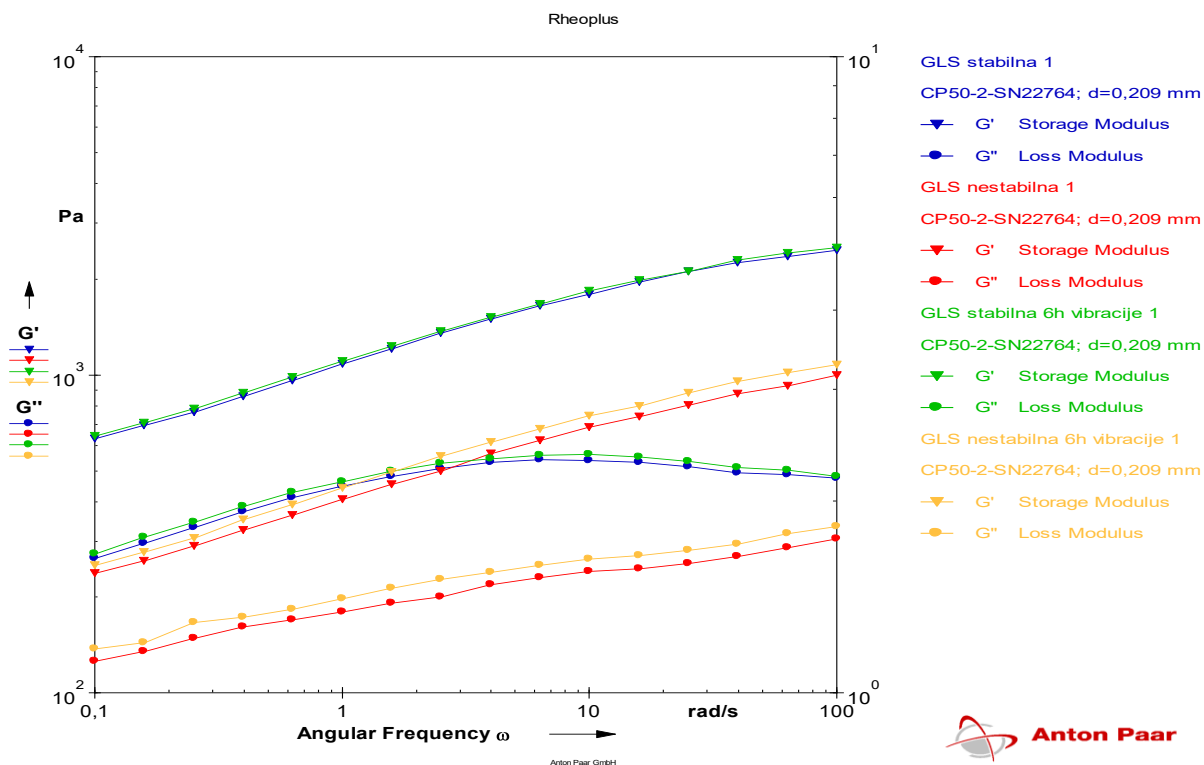


Graf 2: Amplitudni test GLS stabilne in nestabilne, pred in po stresanju 6 ur

Graf 2 prikazuje rezultate amplitudnega testiranja vzorcev 'GLS stabilna' in 'GLS nestabilna', pred in po stresanju 6 ur, pri konstantni frekvenci oscilacije, kjer narašča strižna obremenitev (γ), spreminjata pa se elastični (G') in viskozni (G'') modul.

Mejna vrednost amplitude strižne obremenitve, pri kateri je viskoelastični odziv vzorcev še v linearnem območju, znaša 0,05%. Le-ta je odvisna predvsem od mehanskih lastnosti testirane snovi. Ko odziv preide v nelinearno območje, notranja struktura testiranega vzorca popusti, pri tem pa prično vrednosti dinamičnih količin, kot sta G' in G'' , z naraščajočo amplitudo padati (21). S pomočjo grafa nismo opazili večjih sprememb v mejnih vrednostih amplitude za 'GLS stabilno' in 'GLS nestabilno' pred in po šesturnem stresanju.

Opazili smo, da je prišlo do prekrižanja krivulj G' in G'' v primeru 'GLS nestabilne', pred in po stresanju 6 ur, pri nekoliko nižjih vrednostih obremenitve, kar običajno pomeni, da se formulacija pri uporabi lažje razmaže, saj struktura prej dobi bolj viskozne kot elastične značilnosti, hkrati pa to pomeni, da je formulacija manj prožna in odporna na obremenitev. Prekrižanje krivulj pri višjih vrednostih pa običajno pomeni bolj odporno in prožno strukturo formulacije, ki je bolj »bogata« na otip, vendar se hkrati težje razmaže. (27) Vpliva vibracijskega stresanja na omenjene vrednosti nismo opazili.



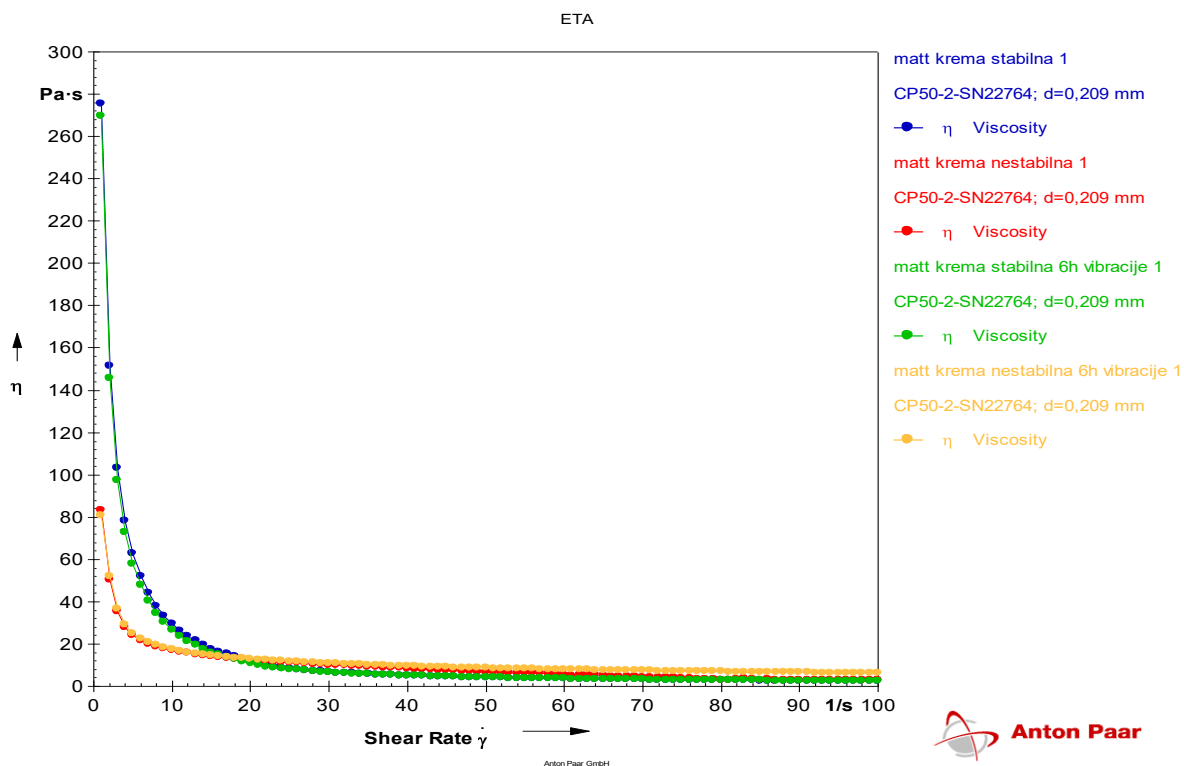
Graf 3: Frekvenčni test GLS stabilne in nestabilne, pred in po stresanju 6 ur

Graf 3 prikazuje frekvenčno odvisnost elastičnega (G') in viskoznega modula (G'') vzorcev 'GLS stabilna' in 'GLS nestabilna', pred in po stresanju 6 ur, oziroma predstavlja viskoelastični odziv emulzije na periodično delovanje strižne obremenitve s konstantno amplitudo.

Teste, pri katerih spreminjamo frekvenco oscilacije, izvajamo v območju nižjih amplitud strižne obremenitve, kot je zgornja meja linearnega viskoelastičnega odziva pri konstantni frekvenci oscilacije, saj to programski opremi omogoča enolični izračun dinamičnih količin G' in G'' . Oscilacijske meritve nam omogočajo sklepati na tip mikrostrukture snovi, jakost vezi med strukturnimi elementi, premreženost polimerov ter natančnejše poznavanje mehanskega odziva snovi na strižno napetost. Zanje smo se odločili tudi zato, ker omogočajo prikaz večjih odstopanj v lastnostih struktur, v primerjavi z meritvami viskoznosti. Na vzorce smo delovali s silo in jih s tem deformirali, termodinamske sile pa so pri tem težile k povrnitvi mikrostruktur v stanje, katerega le-te zavzamejo v mirovanju, ko je stanje energetsko najugodnejše. Del v sistem vstopajoče energije torej emulzijski sistemi lahko shranijo, po odvzemu napetosti pa lahko tako del deformacije tudi povrnejo. Preostali del energije se izgubi in se pretvori v toploto zaradi viskoznega trenja. Območja odziva pri katerih se snov obnaša »viskoelastično trdno« in prevladuje G' , ali »viskoelastično tekoče«, kjer prevladuje G'' , so odvisna od lastnosti emulzije (20). V obeh primerih ('GLS stabilna' in 'GLS nestabilna') prevladuje G' , torej viskoelastično trdno obnašanje.

Po stresanju smo opazili primerljivo povečanje vrednosti parametrov G' in G'' v primeru 'GLS stabilne' (1,7%), kot tudi 'GLS nestabilne' (1,2%), kar nakazuje na to, da so se lastnosti obeh emulzij nekoliko, a ne bistveno, spremenile. Omenjeno opažanje smo preverili tudi s parnim t-testom, s katerim smo ugotovili, da pri 0,95 stopnji zaupanja ne moremo trditi, da so razlike statistično značilne. S polarizacijsko mikroskopijo smo v primeru 'GLS nestabilna' po šestih urah stresanja opazili pojav koalescence, s stopnjo katere običajno korelira hitrost padca vrednosti G' , česar pa v našem primeru nismo zaznali (14).

b) Matt krema stabilna in nestabilna varianta



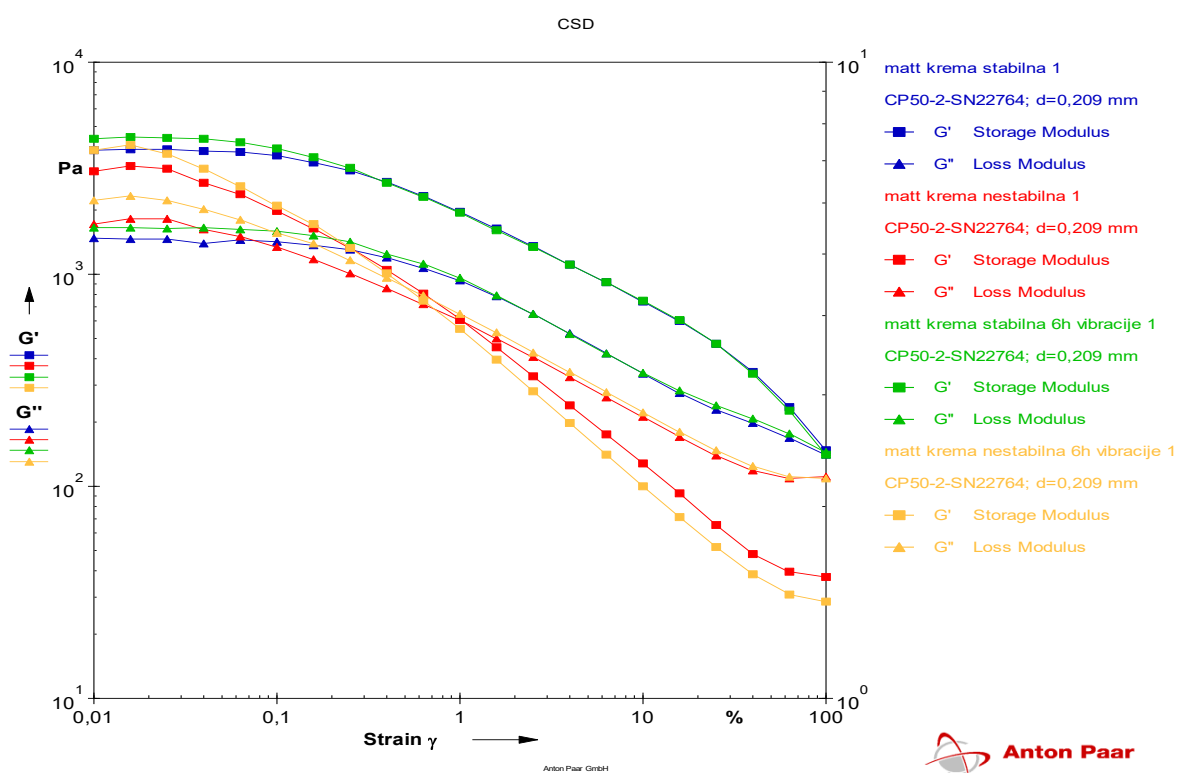
Graf 4: Viskoznostni diagram Matt kreme stabilne in nestabilne, pred in po stresanju 6 ur

Graf 4 prikazuje viskoznost (η) vzorcev 'Matt krema stabilna' in 'Matt krema nestabilna', pred in po stresanju 6 ur, v odvisnosti od strižne hitrosti ($\dot{\gamma}$).

Viskoznostne krivulje vzorcev ustrezajo krivuljam pseudoplastičnih sistemov. Vzorec 'Matt krema nestabilna' je bil že pred stresanjem manj viskozen kot vzorec 'Matt krema stabilna', kar je tudi značilno za nehomogen emulzijski sistem.

Po šestih urah vibracijskega stresanja, se je viskoznost vzorca 'Matt krema stabilna' zmanjšala za 4,6 %, kar je verjetno posledica blage koalescence, ki smo jo opazili pri mikroskopiranju (Priloga V, Sliki 22 in 26). V primeru vzorca 'Matt krema nestabilna' smo zaradi veliko bolj izrazite koalescence pričakovali zmanjšanje viskoznosti, vendar se je le-ta povečala za kar 20,4%. V vzorcu smo opazili tudi povečano vsebnost zračnih mehurčkov, ki so bili posledica vibracijskega stresanja pri sobnih pogojih, njihovo izhajanje v atmosfero pa je bilo zaradi povečane viskoznosti formulacije močno oteženo in upočasnjeno. Prisotnost velike količine

zračnih mehurčkov v kozmetičnih in farmacevtskih izdelkih ni zaželena, saj vodi do neustreznega izgleda in teksture izdelka, kot tudi do fizikalnih, kemičnih in bioloških znakov nestabilnosti. Fizikalne znake nestabilnosti običajno povzroči adsorpcija molekul emulgatorja na medfazo zrak-tekočina, kemične in biološke pa proces oksidacije in mikrobiološka rast (26). V primeru, da v formulaciji ne bi bilo prisotne velike količine zraka, bi povečanje viskoznosti seveda ugodno vplivalo na stabilizacijo sistema. Ugotovili smo, da je prišlo v primeru nestabilne formulacije do 4-krat večjih odstopanj meritev po stresanju v primerjavi z začetnim stanjem, kot v primeru odstopanj stabilne formulacije. Slednje opažanje smo preverili tudi s parnim t-testom. Razlike so statistično značilne pri 0,95 stopnji zaupanja. Vzorec 'Matt krema nestabilna' je torej manj odporen na mehanski stres v primerjavi s stabilnim, to pa potrjuje neustreznost in fizikalno nestabilnost le-tega.

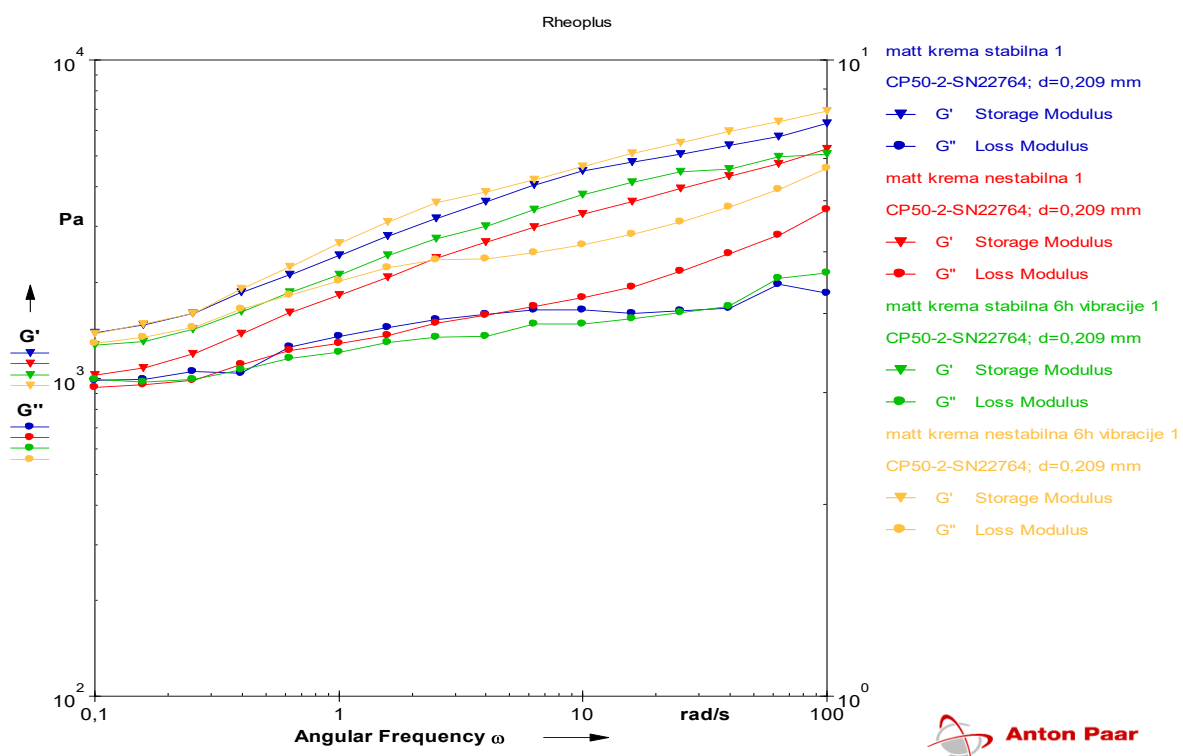


Graf 5: Amplitudno testiranje Matt kreme stabilne in nestabilne, pred in po stresanju 6 ur

Graf 5 prikazuje rezultate amplitudnega testiranja vzorcev 'Matt krema stabilna' in 'Matt krema nestabilna', pred in po stresanju 6 ur, pri konstantni frekvenci oscilacije.

Mejna vrednost amplitude strižne obremenitve, pri kateri je viskoelastični odziv vzorcev še v linearnem območju, znaša 0,02%. Opazili smo, da je prišlo v primeru vzorca 'Matt krema nestabilna', pred in po stresanju 6 ur, do porušitve notranje strukture pri nižjih vrednostih mejnih amplitud, kot v primeru vzorcev 'Matt krema stabilna', pred in po stresanju 6 ur, kar nakazuje na večjo labilnost formulacije na strižno obremenitev. Sprememb v omenjenih vrednostih po vibracijskem stresanju nismo opazili.

Opazili smo tudi, da je prišlo v primeru vzorca 'Matt krema nestabilna', pred in po stresanju 6 ur, do prekrivanja krivulj G' in G'' pri nižjih vrednostih, v primerjavi z krivuljami vzorcev 'Matt krema stabilna', pred in po stresanju 6 ur, kar nakazuje na manj prožno in odporno strukturo ter lažji razmaz formulacije. Vpliva vibracijskega stresanja na omenjene vrednosti nismo opazili.

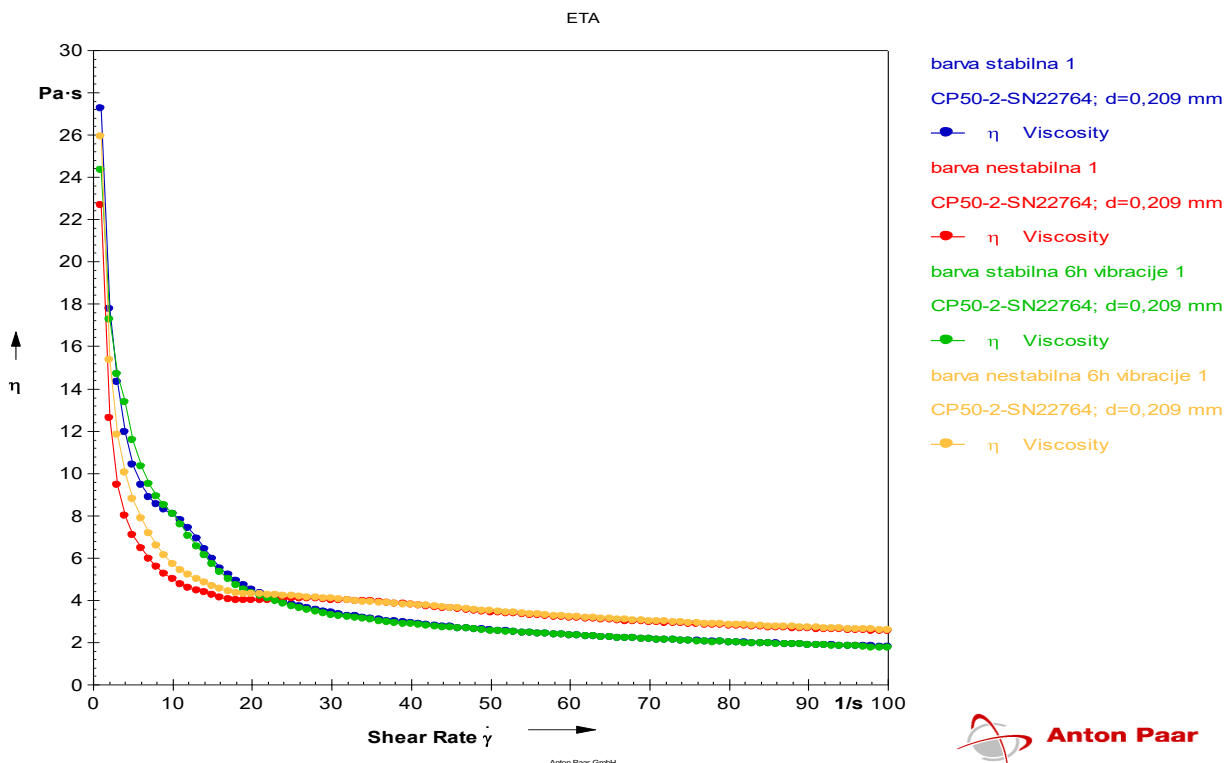


Graf 6: Frekvenčni test Matt kreme stabilne in nestabilne, pred in po stresanju 6 ur

Graf 6 prikazuje frekvenčno odvisnost elastičnega (G') in viskoznega modula (G'') vzorcev 'Matt krema stabilna' in 'Matt krema nestabilna', pred in po stresanju 6 ur, pri konstantni amplitudi strižne deformacije.

Ugotovili smo, da tudi ti vzorci izkazujejo prevladujoče viskoelastično trdno obnašanje. V primeru vzorca 'Matt krema stabilna' je prišlo po šesturnem stresanju do zmanjšanja izmerjenih vrednosti G' in G'' za 10,9% v primerjavi z začetnim stanjem, nasprotno pa je prišlo v primeru 'Matt krema nestabilna' po stresanju do povečanja le-teh za 4,4%. Nasprotno od pričakovanj je torej prišlo do 0,7-krat večjih odstopanj od začetnih meritev v primeru stabilne formulacije, kar nakazuje, da je le-ta bolj labilna na mehansko obremenitev kot nestabilna varianta. Slednje opažanje smo preverili tudi s parnim t-testom. Razlike so statistično značilne pri 0,95 stopnji zaupanja.

c) Barva stabilna in nestabilna varianta

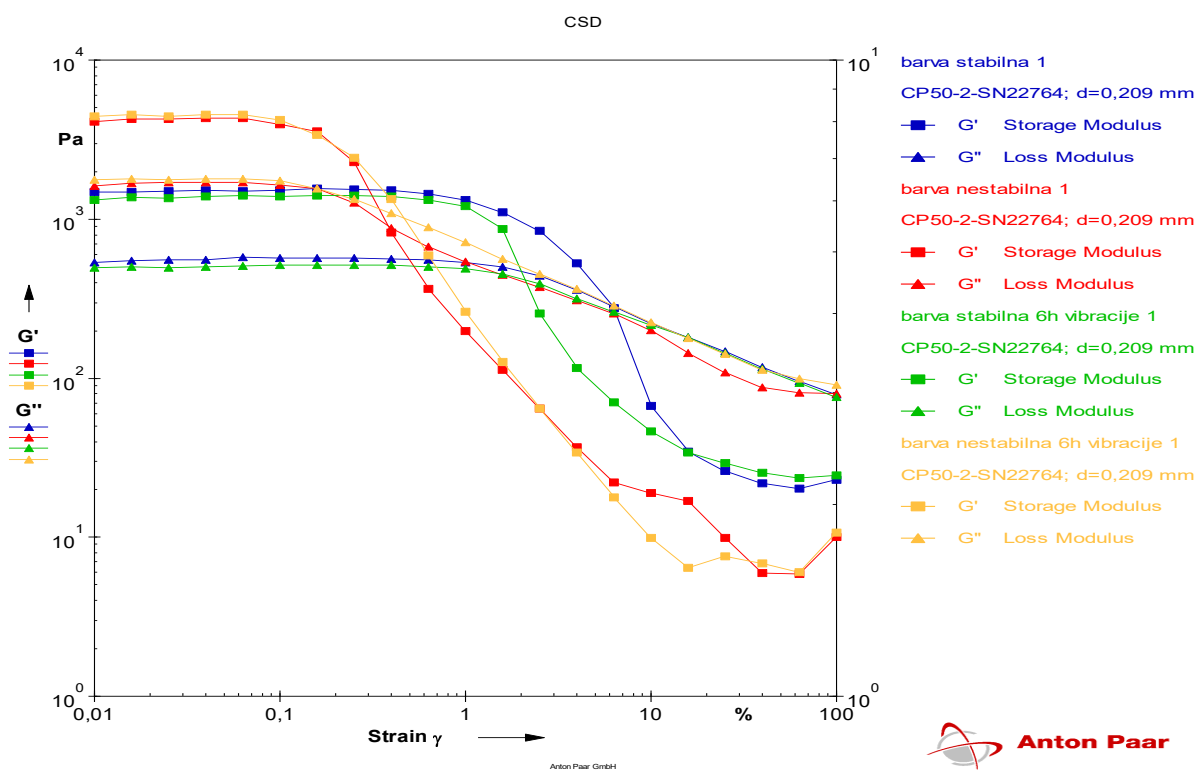


Graf 7: Viskoznostni diagram Barve stabilne in nestabilne, pred in po stresanju 6 ur

Graf 7 prikazuje viskoznost (η) vzorcev 'Barva stabilna' in 'Barva nestabilna', pred in po stresanju 6 ur, v odvisnosti od strižne hitrosti ($\dot{\gamma}$)

Vzorec 'Barva stabilna' je bil že pred stresanjem nekoliko bolj viskozen v primerjavi z nestabilnim, kar je tudi značilno za homogen in stabiliziran emulzijski sistem.

V primeru vzorca 'Barva stabilna', je prišlo po šestih urah stresanja do 0,8% zmanjšanja viskoznosti sistema v primerjavi z začetnim stanjem. Nasprotno se je po izpostavitvi mehanskemu stresu viskoznost vzorca 'Barva nestabilna' povečala za 6,5%. Pričakovali smo, da se bo viskoznost stabilne formulacije zaradi homogenizacije med stresanjem povečala, nestabilne pa zmanjšala, zaradi pojava koalescence, ki smo jo opazili s pomočjo mikroskopiranja (Priloga V, Sliki 32 in 36). Kljub nepričakovanim rezultatom je prišlo v primeru nestabilne formulacije do 7,4-krat večjih odstopanj vrednosti meritev glede na začetno stanje, v primerjavi z odstopanji stabilne. Slednje opažanje smo preverili tudi s parnim t-testom. Razlike so statistično značilne pri 0,95 stopnji zaupanja.



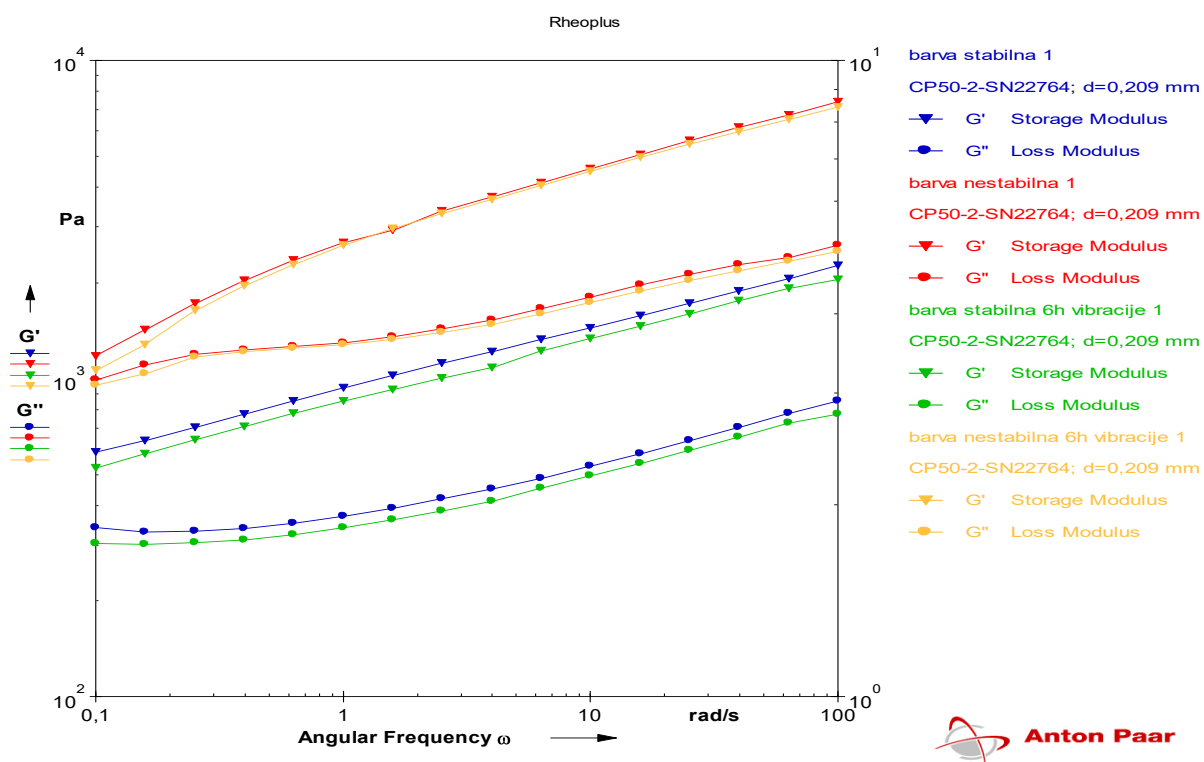
Graf 8: Amplitudno testiranje Barve stabilne in nestabilne, pred in po stresanju 6 ur

Graf 8 prikazuje rezultate amplitudnega testiranja vzorcev 'Barva stabilna' in 'Barva nestabilna', pred in po stresanju 6 ur, pri konstantni frekvenci oscilacije.

Mejna vrednost amplitude strižne obremenitve, pri kateri je viskoelastični odziv obeh vzorcev še v linearnem območju, znaša 0,05%. Na grafu lahko opazimo, da je prišlo do porušitve

notranje strukture formulacij vzorcev 'Barva nestabilna', pred in po stresanju 6 ur, pri nižjih vrednostih, v primerjavi z vzorci 'Barva stabilna', pred in po stresanju 6 ur, kar nakazuje na večjo labilnost formulacije na strižno obremenitev. Sprememb v mejnih vrednostih amplitude po vibracijskem stresanju nismo zaznali.

V primeru vzorca 'Barva nestabilna', pred in po stresanju 6 ur, je prišlo do prekrivanja krivulj G' in G'' pri veliko nižjih vrednostih obremenitve, kar ponovno nakazuje na manj prožno in odporno strukturo, vendar boljši razmaz formulacije. Bistvenega vpliva vibracijskega stresanja na spremembo teh vrednosti nismo opazili.



Graf 9: Frekvenčni test Barve stabilne in nestabilne, pred in po stresanju 6 ur

Graf 9 prikazuje frekvenčno odvisnost elastičnega (G') in viskoznega modula (G'') vzorcev 'Barva stabilna' in 'Barva nestabilna', pred in po stresanju 6 ur, pri konstantni amplitudi obremenitve.

Pri vseh vzorcih prevladuje viskoelastično trdno obnašanje. Ponovno smo, nasprotno od pričakovanj, izmerili malenkost večje vrednosti odstopanja od začetnega stanja v primeru vzorca 'Barva stabilna' (0,9%) v primerjavi z nestabilno (0,2%). Omenjeno opažanje smo

preverili tudi s parnim t-testom, s katerim smo ugotovili, da pri 0,95 stopnji zaupanja ne moremo trditi, da so razlike statistično značilne.

4.4 Stereomikroskopija

Slika 11 (Priloga IV) prikazuje homogeno strukturo vzorca 'GLS stabilna'. Slika 12 (Priloga IV) pa prikazuje strukturo vzorca 'GLS nestabilna', kjer je prisotnih nekaj večjih kapljic, katerim smo s pomočjo računalniškega programa tudi izmerili velikost. Kljub ugotovljenim razlikam smo sklenili, da stereomikroskop ni primeren za opazovanje izbranih vzorcev. Za natančnejše in ustrežnejše rezultate smo se odločili, da pri nadaljnjem proučevanju vzorcev uporabimo polarizacijski mikroskop.

4.5 Polarizacijska mikroskopija

a) GLS stabilna in nestabilna varianta

Sliki 13 in 17 (Priloga V) prikazujeta strukturo vzorca 'GLS stabilna' pred stresanjem, pod 40- in 100-kratno povečavo. Opazili smo prisotnost kapljic enakomernih velikosti, kar potrjuje homogenost in stabilnost emulzije. Po šestih urah vibracijskega stresanja ni prišlo do vidnih znakov fizikalne nestabilnosti, opazili smo namreč, da je prišlo do nastanka še manjših kapljic enakomernih velikosti, kar kaže na stabilnost emulzije tudi po izpostavitvi mehanskemu stresu (Priloga V, Sliki 14 in 18).

V primeru vzorca 'GLS nestabilna' (Priloga V, Sliki 15 in 19) smo opazili prisotnost kapljic neenakomernih velikosti, kar potrjuje nestabilnost emulzije. Po šestih urah stresanja le-te, sta na Slikah 16 in 20 (Priloga V) dobro vidni flokulacija in koalescenca, kar kaže na to, da je formulacija nestabilna in zelo labilna na vplive mehanskega stresa.

b) Matt krema stabilna in nestabilna varianta

Sliki 21 in 25 (Priloga V) prikazujeta strukturo vzorca 'Matt krema stabilna' pred stresanjem, pod 4- in 40-kratno povečavo. Vzorec je homogen in na videz stabilen. Opazili smo, da je prišlo po šestih urah stresanja do znakov nestabilnosti, saj so prisotne večje kapljice, kar je najverjetneje posledica koalescence (Priloga V, sliki 22 in 26).

V primeru vzorca 'Matt krema nestabilna' (Priloga V, sliki 23 in 27) smo že pred stresanjem opazili nehomogeno strukturo formulacije. Po šestih urah stresa je prišlo do veliko bolj očitnih znakov nestabilnosti v primerjavi s stabilno, saj so vidne kapljice precej večjih velikosti (Priloga V, sliki 24 in 28). 'Matt krema nestabilna' se je torej izkazala za precej bolj labilno na vplive mehanskega stresa v primerjavi s stabilno.

c) Barva stabilna in nestabilna varianta

V primeru vzorca 'Barva stabilna' po šestih urah stresa (Priloga V, sliki 30 in 34) nismo opazili spremembe v strukturi emulzije v primerjavi z začetnim stanjem (Priloga V, sliki 29 in 33). Pred in po stresanju smo namreč opazili prisotnost tekočih kristalov ter homogenost strukture sistema, s čimer smo potrdili ustreznost in stabilnost formulacije.

Pri opazovanju strukture vzorca 'Barva nestabilna' po šestih urah stresa pa je prišlo do očitnega združevanja in povečanja velikosti kapljic, kar potrjuje fizikalno nestabilnost sistema (Priloga V, sliki 32 in 36). Neustreznost formulacije 'Barva nestabilna' smo s pomočjo polarizacijskega načina mikroskopiranja lahko opazili že pred stresanjem (Priloga V, sliki 31 in 35), saj le-ta ni vsebovala tekočih kristalov v nasprotju s stabilno emulzijo. Prisotnost lamelarnih tekočih kristalov na medfazi emulzij tipa O/V je namreč ena od metod za stabilizacijo, poleg tega pa omogočajo tudi nadzorovano sproščanje vgrajenih sestavin (npr. amonijak), ustrezno teksturo in prijeten občutek pri nanosu izdelka ter zadrževanje vlage (29). PAS ali kombinacija le-teh tvori več dvoplasti, ki »objamejo« kapljice dispergirane faze. Posledica tega je večja razdalja med njimi, s tem pa tudi manjši van der Waals-ov privlak in velika energijska bariera, ki preprečuje nastanek koalescence (10).

5 SKLEP

Po izvedenem eksperimentalnem delu diplomskega dela lahko zaključimo, da je metoda za pospešeno testiranje fizikalne stabilnosti grobo disperznih sistemov z uporabo mehanskih vibracij pogojno ustrezna ter omogoča v krajšem času in z dostopnejšimi postopki pridobitev zadovoljivih rezultatov ter zmanjšanje obsega nadaljnjih testiranj.

Z optimizacijo vibracijskega testiranja smo ugotovili, da je primeren čas stresanja izbranih vzorcev pri sobni temperaturi (25 °C) in amplitudi 80%, že 6 ur. S pomočjo analize in vrednotenja posameznih parametrov po stresanju smo namreč dobili nazorne in statistično značilne rezultate. Z namenom, da bi vzorce izpostavili še ostrejšim pogojem in s tem pridobili še bolj nazorne rezultate testiranja, smo le-te želeli izpostaviti stresanju v temperaturni komori. Tega nismo storili, saj smo s pomočjo rezultatov diferenčne dinamične kalorimetrije ugotovili, da so formulacije preobčutljive na vplive izpostavitve povišanim temperaturam.

Z organoleptičnem vrednotenjem smo po šesturnem stresanju zaznali spremembe glede na začetno stanje le v primeru vzorcev 'Matt krema nestabilna' in 'Barva nestabilna'. Le-te pa verjetno niso bile neposredno posledice zgolj fizikalne, temveč primarno kemične nestabilnosti. S pomočjo meritev viskoznosti posameznih vzorcev pred in po šesturnem stresanju smo največja in statistično značilna odstopanja od začetnega stanja izmerili v primeru vseh treh nestabilnih vzorcev, v primerjavi z odstopanji stabilnih formulacij. S pomočjo oscilatornega testiranja nismo dobili enotnih, reprezentativnih podatkov. Opazovanje vzorcev s stereomikroskopom se je izkazalo za neustrezno, zato smo se odločili le za uporabo polarizacijskega mikroskopa. S pomočjo vrednotenja posnetkov mikroskopiranja posameznih vzorcev smo v primeru vseh treh nestabilnih emulzij po šesturnem stresanju lahko zelo jasno in nazorno opazili pojav znakov fizikalne nestabilnosti, kot sta flokulacija in koalescenca. Vzorci stabilnih emulzij so glede na začetno stanje ostali nespremenjeni.

Glede na slednje ugotovitve lahko sklepamo, da je za določitev optimalnih pogojev vibracijskega testiranja (čas, amplituda, temperatura, itd.) potrebno dobro poznavanje izbranega disperznega sistema ter empirično preizkušanje. Za pridobitev reprezentativnih podatkov bi bilo za analizo parametrov po stresanju vzorcev smiselno izvesti tako rotacijske teste kot polarizacijsko mikroskopiranje.

6 VIRI

1. Uredba (ES) št. 1223/2009 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 30. novembra 2009 o kozmetičnih izdelkih, Uradni list Evropske unije: 59-69.
2. Mitsui T: *New Cosmetic Science*, Elsevier Science B V, The Netherlands, 1997: 191-198.
3. Izvedbeni sklep Komisije z dne 25. novembra 2013 o Smernicah v zvezi s Prilogo I k Uredbi (ES) št. 1223/2009 Evropskega parlamenta in Sveta o kozmetičnih izdelkih, Uradni list Evropske unije: 82-86.
4. Yoshioka S, Stella V J: *Stability of Drugs and Dosage Forms*, Kluwer Academic Publishers, New York, 2002: 34.
5. https://www.cosmeticseurope.eu/files/5914/6407/8121/Guidelines_on_Stability_Testing_of_Cosmetics_CE-CTFA_-_2004.pdf. Dostopano: 1. 3. 2018
6. <http://www.qacslab.com/stability-testing-cosmetics.php>. Dostopano: 1. 3. 2018
7. Cannell J S: Fundamentals of stability testing. *Int J Cosmet Sci* 1985; 7: 291-303.
8. <https://oxfordbiosciences.com/stability-testing/>. Dostopano: 1. 3. 2018.
9. http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/homedirs/11/Predmeti/Stabilnost_zdravil/Vaje/Stabilnost_zdravil_EM%C5%A0F_skripta.pdf. Dostopano 20. 3. 2018.
10. Tadros T F: *Emulsion Formation and Stability*, Wiley-VCH, Weinheim, 2013: 15-19, 48.
11. <https://www.scribd.com/doc/77101094/Stability-Problems-of-Emulsion-and-Suspension>. Dostopano: 15. 3. 2018
12. Hu Y, Ting Y, Hu J, Hsieh S: Techniques and Methods to Study Functional Characteristics of Emulsion Systems. *JFDA* 2016; 1: 17-22
13. http://www.particlesciences.com/docs/technical_briefs/TB_2011_2.pdf. Dostopano 9. 3. 2018.
14. Tadros T: *Advances in Colloid and Interface Science-Application of Rheology for Assessment and Prediction of the Long-term Physical Stability of Emulsions*. Elsevier B V 2004: 227-257.

15. https://www.retsch.com/api/?action=product_pdf&productId=22&id=2296508&L=0&userId=&site=retsched&print_language=0&print_info=1&print_image=1&print_examples=1&print_advantages=1&print_features=1&print_videolink=1&print_principle=1. Dostopano 4. 4. 2018.
16. Kuroda M: Vibrational Test for Evaluation of Creams. I. The Effect of Vertical Vibration Imposed on O/W Creams. *Chem Pharm Bull*, 1984; 32: 2780.
17. <http://www.tainstruments.com/products/thermal-analysis/differential-scanning-calorimeters/>. Dostopano 23. 5. 2018.
18. <http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/FT/Oprema/reometer.pdf>. Dostopano 28. 3. 2018.
19. https://www.helmholtz-berlin.de/pubbin/igama_output?modus=einzel&sprache=en&gid=1910&typoid=40762. Dostopano 19. 4. 2018.
20. Broughton G, Squires L: The Viscosity of Oil-water Emulsions. *J Phys Chem* 1938; 42: 253-254.
21. Zupančič V A: Uvod v reologijo: Opis osnovnih reoloških pojmov in reološka klasifikacija tekočin, reološki modeli, reometrija in slovarček reoloških izrazov, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, 2007: 17-65.
22. https://www.igp.fraunhofer.de/content/dam/agp/en/documents/equipment/Testing_technology/OLYMPUS_SZX12.pdf. Dostopano 7. 4. 2018.
23. <http://web.bf.uni-lj.si/bi/mikroskopija/mikroskop-stereo.php#more>. Dostopano 7. 4. 2018.
24. <http://projekti.gimvic.org/2002/2e/mikroskop/tipi%20mikroskopov.html>. Dostopano 20. 4. 2018.
25. <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/techniques/polarized/polarizedhome/>. Dostopano 20. 4. 2018.
26. Tong J L: Mechanisms and Control of Gas Bubble Formation in Cosmetics. *J Soc Cosmet Chem*, 1971; 22: 323-324.
27. Harrison V G W: Rheology of Emulsions. *Nature*, 1950; 165: 183.

28. Elezović A, Kostić S, Hadžiabdić J, Rahić O, Vranić E, Vehabović M: Dependence of Viscoelastic Properties of Two Emulsion Formulations on Preparation Process. *Glas Hem Tehnol Bosne Herceg*, 2015; 44: 23-28.
29. Zhang W, Liu L: Study on the Formation and Properties of Liquid Crystal Emulsion in Cosmetics. *JCDSA*, 2013; 3: 141.

7 Priloga I: Recepture testiranih izdelkov

Preglednica II: Sestava stabilne in nestabilne čistilne emulzije O/V za občutljivo kožo

Oznaka v besedilu	Sestava		Sprememba
GLS stabilna	Aqua, Isohexadecane, Polysorbate 60, Cetearyl alcohol, Glycerin, Butylene glycol, Poloxamer 184, Sorbitan stearate, Hydrogenated polyisobutene, Octyldodecanol, Niacinamide, Ribes Nigrum Seed Oil, Helianthus Annuus Seed Oil Unsaponifiables, Cardiospermum Halicacabum Flower/Leaf/Vine Extract, Tocopherol, Helianthus Annuus Seed Oil, Rosmarinus Officinalis Leaf Extract, Tocopheryl acetate, Xanthan gum, Ammonium Acryloyldimethyltaurate/VP Copolymer, Phenoxyethanol, Benzoic acid, Dehydroacetic acid	Stabilno	Dodatek zgoščeval
GLS nestabilna	Aqua, Isohexadecane, Polysorbate 60, Cetearyl alcohol, Glycerin, Butylene glycol, Poloxamer 184, Sorbitan stearate, Hydrogenated polyisobutene, Octyldodecanol, Niacinamide, Ribes Nigrum Seed Oil, Helianthus Annuus Seed Oil Unsaponifiables, Cardiospermum Halicacabum Flower/Leaf/Vine Extract, Tocopherol, Helianthus Annuus Seed Oil, Rosmarinus Officinalis Leaf Extract, Tocopheryl acetate, Phenoxyethanol, Benzoic acid, Dehydroacetic acid	Nestabilno	

Preglednica II prikazuje sestavo stabilne in nestabilne emulzije tipa O/V. Izdelek je namenjen čiščenju občutljive kože obraza.

Preglednica III: Sestava stabilne in nestabilne emulzije O/V

Oznaka v besedilu	Sestava		Sprememba
Matt krema stabilna	Aqua, VP/VA copolymer, Ozokerite, Kaolin, Cera alba, Trilaureth-4 phosphate, Parfum, Cetearyl alcohol, Ceteareth-20, Propylene glycol, Glyceryl stearate, PEG-100 stearate, PEG-40 hydrogenated castor oil, Diazolidinyl urea, Methylparaben, Propylparaben, Triethanolamine, Acrylates/C10-30 alkyl acrylate crosspolymer, Disodium EDTA, Limonene, Linalool, Butylphenyl methylpropional, Coumarin, Citral, Geraniol	Stabilno	Zamenjava lipofilnih sestavin dispergirane faze, zamenjava zgoščevala, zmanjšana vsebnost kaolina, zamenjava konzervansa
Matt krema nestabilna	Aqua, VP/VA copolymer, Paraffinum liquidum, Petrolatum, Kaolin, Cetearyl alcohol, Cera alba, Parfum, Hydroxypropyl starch phosphate, Triethanolamine, Phenoxyethanol, Benzoic acid, Dehydroacetic acid, Limonene, Linalool, Butylphenyl methylpropional, Coumarin, Citral, Geraniol	Nestabilno (ločitev faz)	

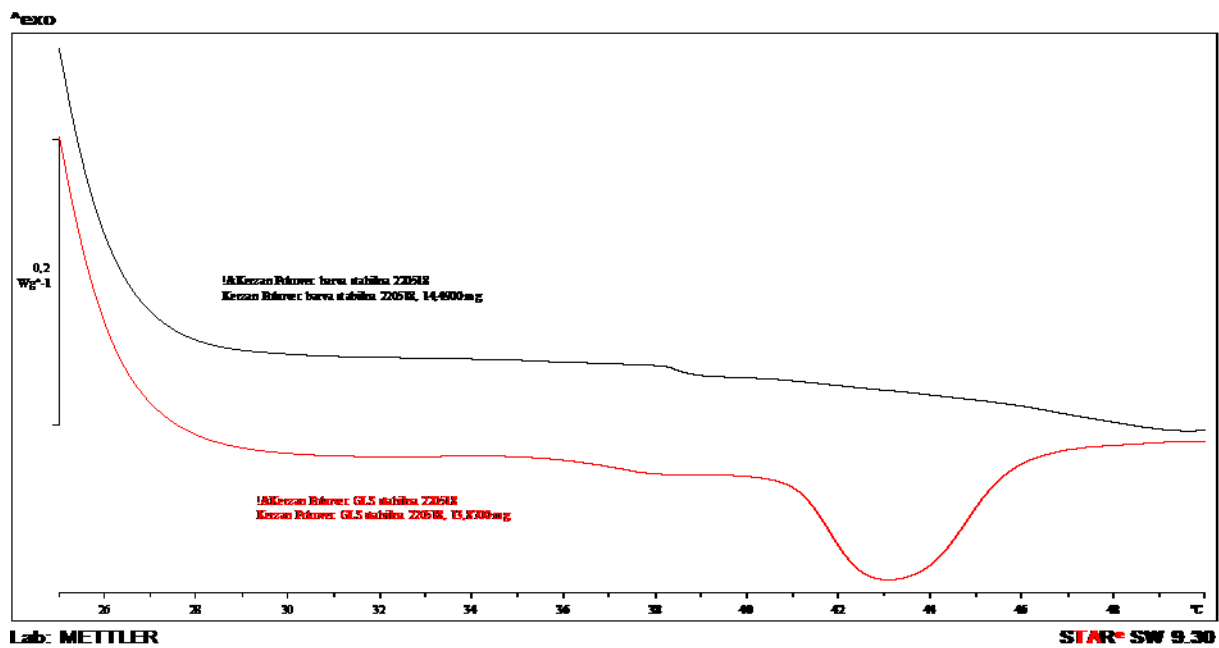
Preglednica III prikazuje sestavo stabilne in nestabilne emulzije O/V. Izdelek je »matt« krema, ki vsebuje kaolin in je namenjen oblikovanju pričeske. Kaolin je bela glina, ki absorbira maščobe in tako lasem da »matt videz«.

Preglednica IV: Sestava stabilne in nestabilne emulzijske, trajno obstojne barve za lase tipa O/V

Oznaka v besedilu	Sestava		Sprememba
Barva stabilna	Aqua, Ammonium hydroxide, Cetearyl alcohol, Dicaprylyl phosphate, Ceteth-10 phosphate, Propylene glycol, Toluene-2,5-diamine sulfate, Steareth-100, Oleyl alcohol, Argania Spinosa Kernel oil, Potassium hydroxide, Sodium sulfite, Ascorbic acid, Parfum, Tetrasodium glutamate diacetate, 2-methyl resorcinol, Resorcinol, M-aminophenol, 2,4-diaminophenoxyethanol	Stabilno	Izločitev, znižanje koncentracij oziroma spremenjeno razmerje uporabljenih emolientov
Barva nestabilna	Aqua, Cetearyl alcohol, Propylene glycol, Ammonium hydroxide, Dicaprylyl phosphate, Ceteth-10 phosphate, Toluene-2,5-diamine sulfate, Oleyl alcohol, Polyquaternium-22, Steareth-100, Potassium hydroxide, Octyldodecanol, Dicaprylyl ether, Argania Spinosa Kernel oil, Sodium sulfite, Sodium sulfate, Ascorbic acid, Parfum, Tetrasodium glutamate diacetate, 2-methyl resorcinol, Resorcinol, M-aminophenol, 2,4-diaminophenoxyethanol	Nestabilno	

Preglednica IV prikazuje sestavo stabilne in nestabilne emulzijske, trajno obstojne barve za lase tipa O/V, ki je namenjena profesionalni uporabi v frizerskih salonih. Posebnost barve je ta, da jo sestavljajo lamelarni tekoči kristali, zaradi česar ima gelu podobno strukturo. Nanos je enostavnejši, poleg tega pa barva ne kaplja. Amonijak je vgrajen med tekoče kristale, zaradi česar barva nima neprijetnega vonja.

8 Priloga II: Rezultati diferenčne dinamične kalorimetrije



Graf 10: Termogram vzorcev GLS stabilna in Barva stabilna, (20 °C-50 °C, 5K/min)

9 Priloga III: Organoleptično vrednotenje vzorcev

a) GLS stabilna in nestabilna varianta



Slika 5: GLS stabilna (levo) in nestabilna (desno), pred stresanjem



Slika 6: GLS stabilna (levo) in nestabilna (desno), po stresanju 6 ur

b) Matt krema stabilna in nestabilna varianta



Slika 7: Matt krema stabilna (levo) in nestabilna (desno), pred stresanjem



Slika 8: Matt krema stabilna (levo) in nestabilna (desno), po stresanju 6 ur

c) Barva stabilna in nestabilna varianta



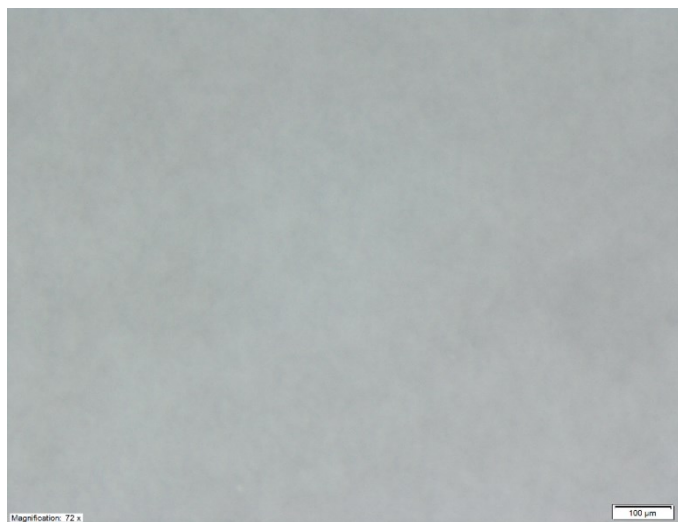
Slika 9: Barva nestabilna (levo) in stabilna (desno), pred stresanjem



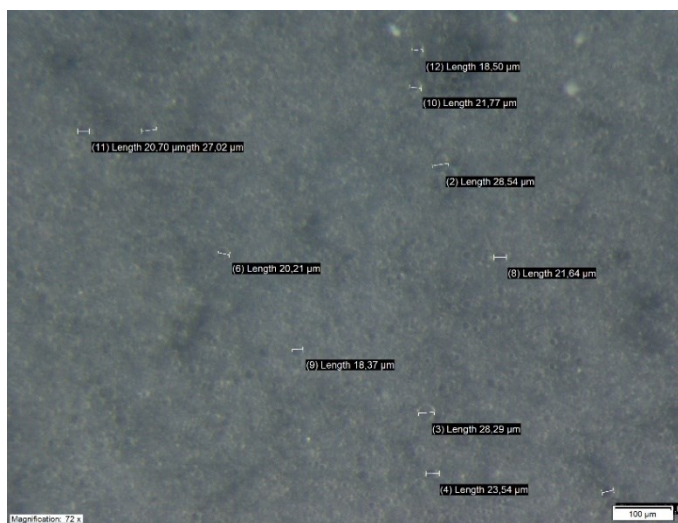
Slika 10: Barva nestabilna (levo) in stabilna (desno), po stresanju 6 ur

10 Priloga IV: Rezultati stereomikroskopije

a) GLS stabilna in nestabilna varianta



Slika 11: GLS stabilna, pred stresanjem (72x)



Slika 12: GLS nestabilna, pred stresanjem (72x)

11 Priloga V: Rezultati polarizacijske mikroskopije

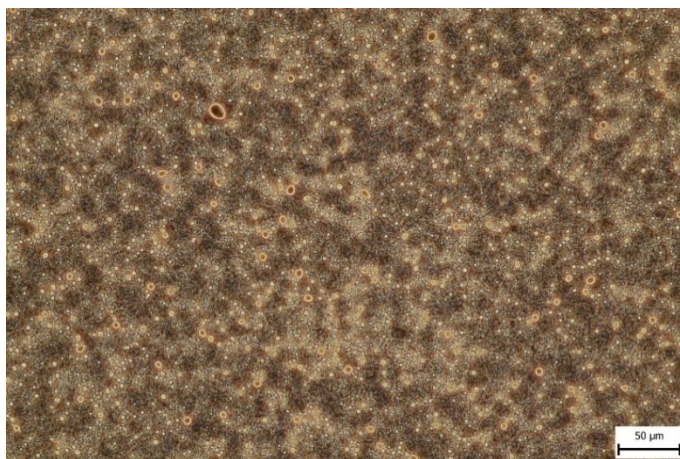
a) GLS stabilna in nestabilna varianta



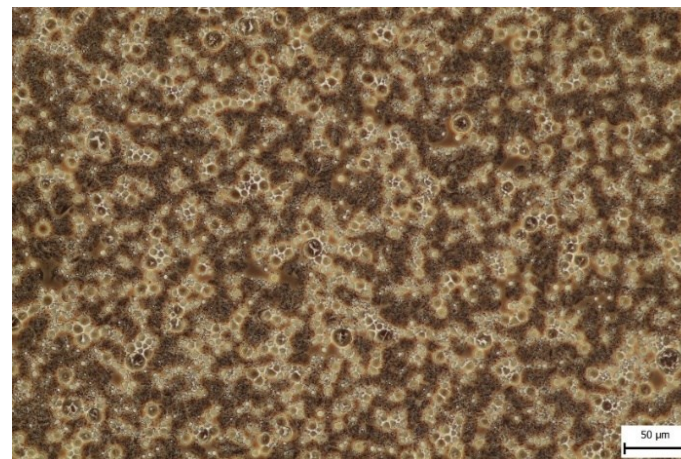
Slika 13: GLS stabilna, pred stresanjem (40x)



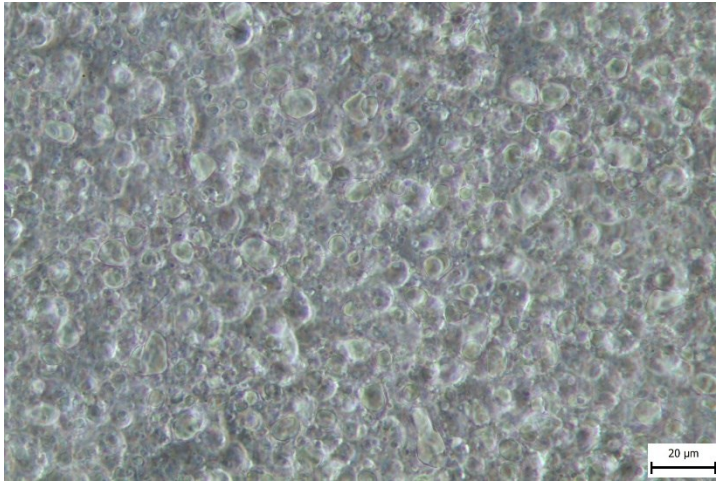
Slika 14: GLS stabilna, po stresanju 6 ur (40x)



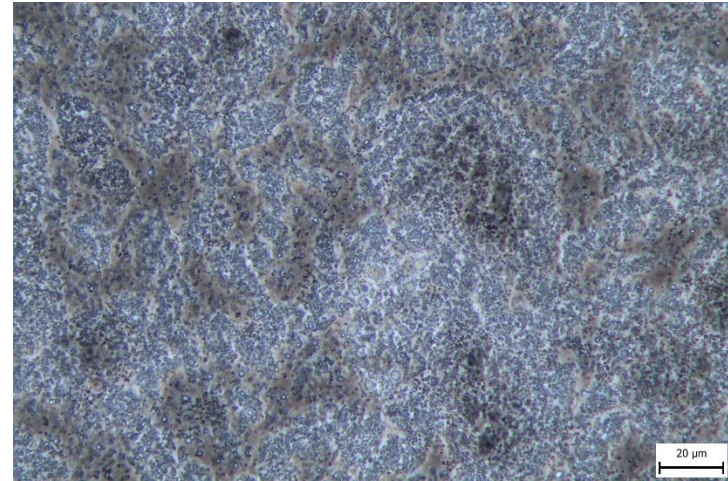
Slika 15: GLS nestabilna, pred stresanjem (40x)



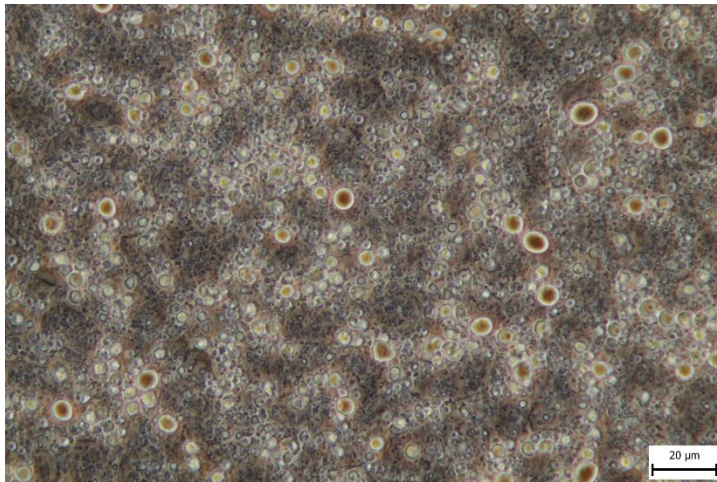
Slika 16: GLS nestabilna, po stresanju 6 ur (40x)



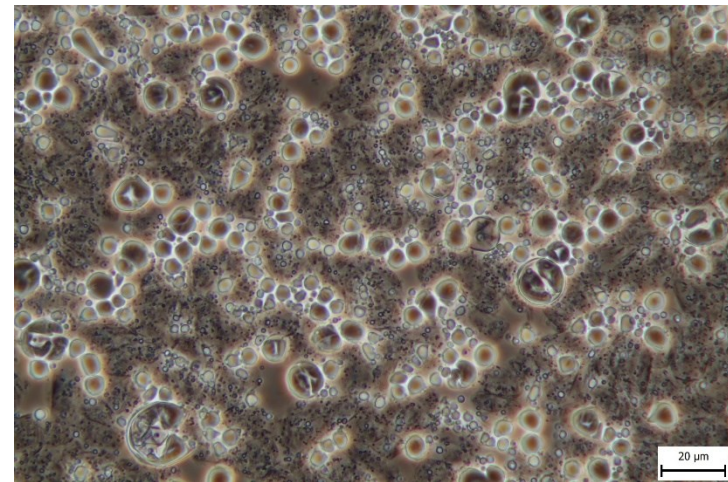
Slika 17: GLS stabilna, pred stresanjem (100x)



Slika 18: GLS stabilna, po stresanju 6 ur (100x)

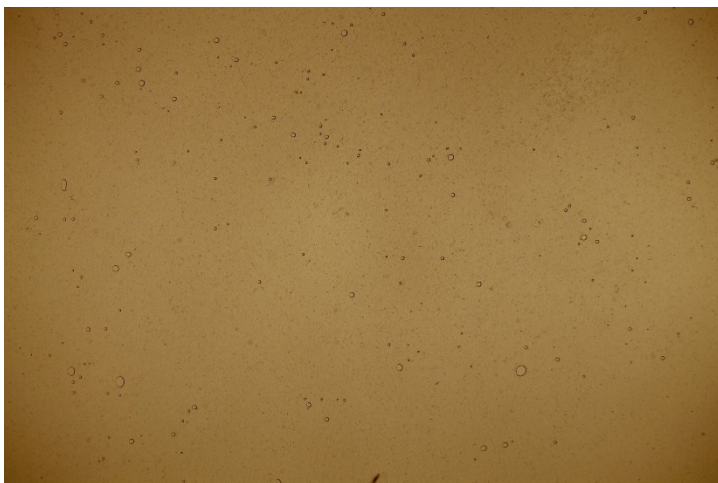


Slika 19: GLS nestabilna, pred stresanjem (100x)

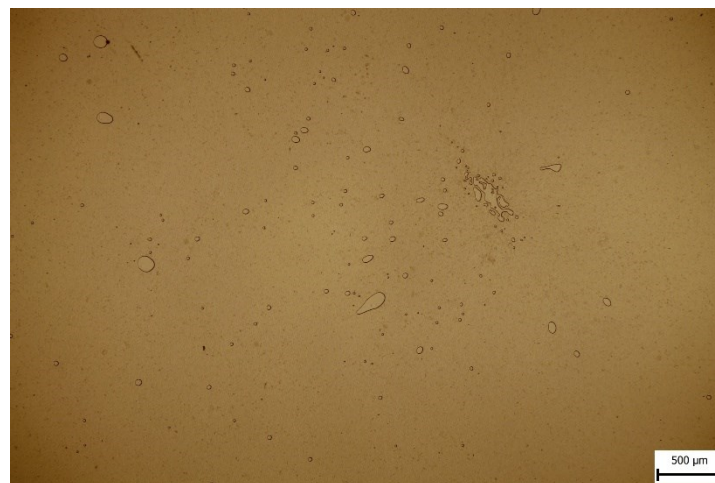


Slika 20: GLS nestabilna, po stresanju 6 ur (100x)

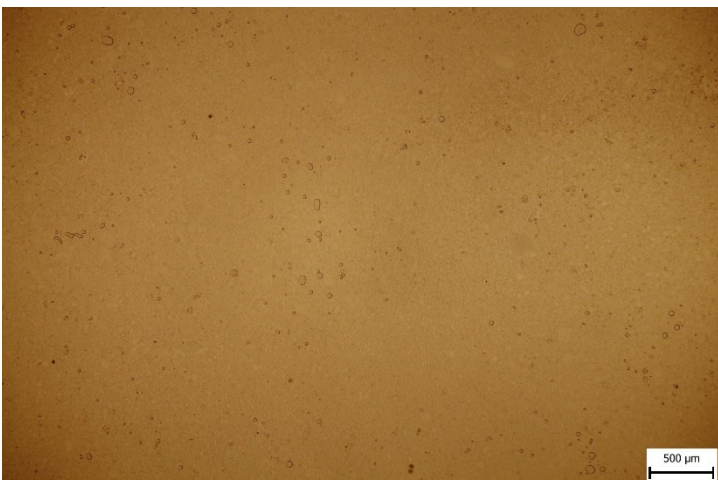
b) Matt krema stabilna in nestabilna varianta



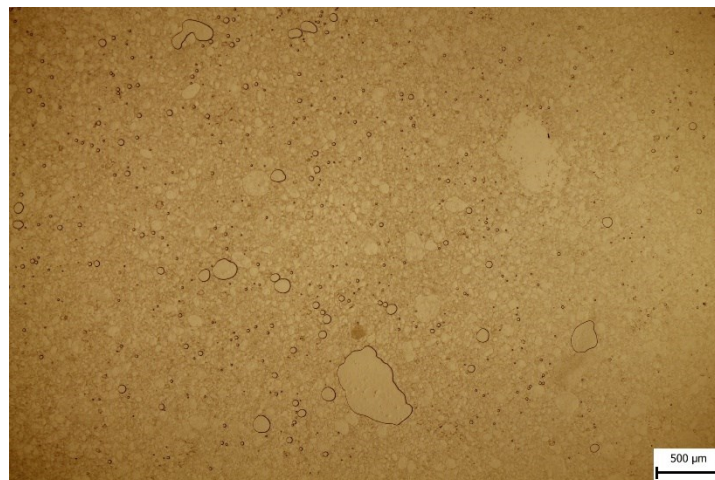
Slika 21: Matt krema stabilna, pred stresanjem (4x)



Slika 22: Matt krema stabilna, po stresanju 6 ur (4x)



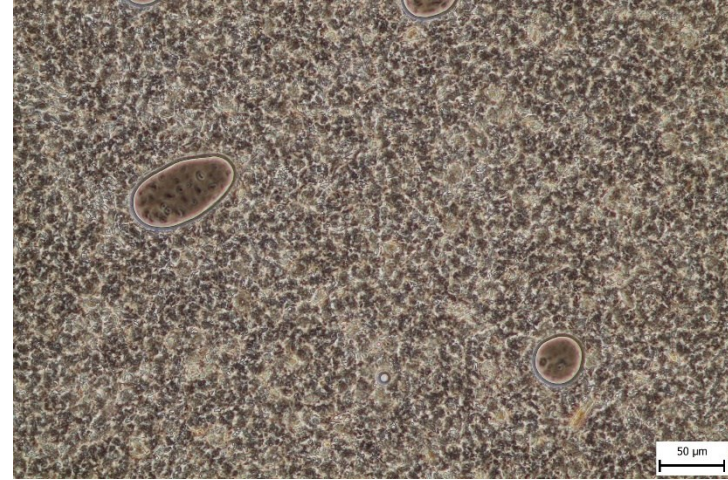
Slika 23: Matt krema nestabilna, pred stresanjem (4x)



Slika 24: Matt krema nestabilna, po stresanju 6 ur (4x)



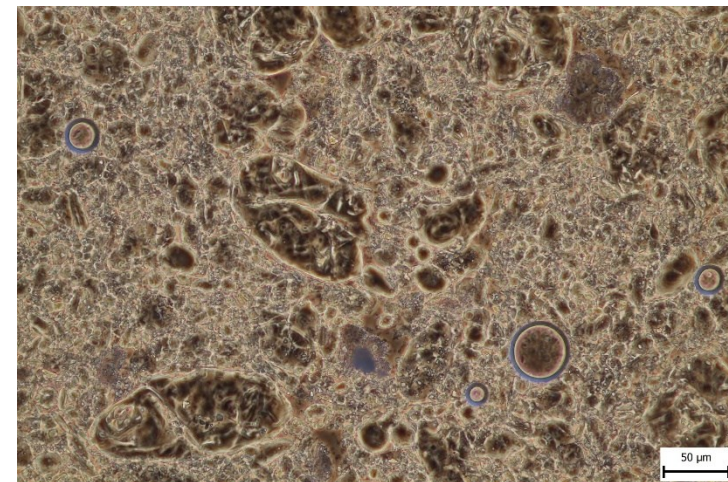
Slika 25: Matt krema stabilna, pred stresanjem (40x)



Slika 26: Matt krema stabilna, po stresanju 6 ur (40x)

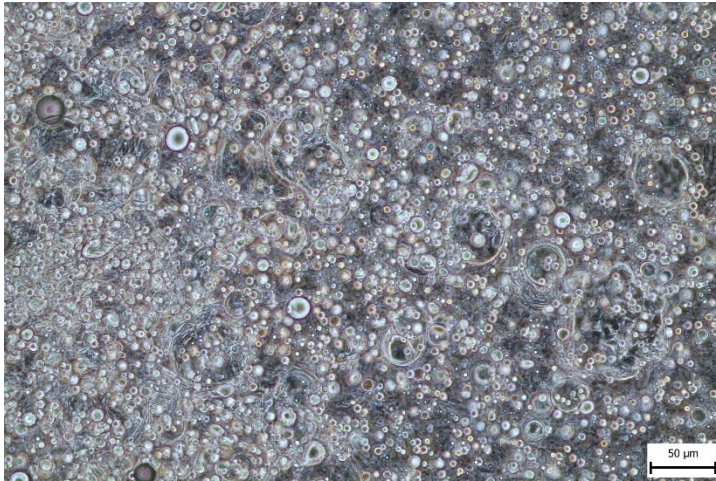


Slika 27: Matt krema nestabilna, pred stresanjem (40x)

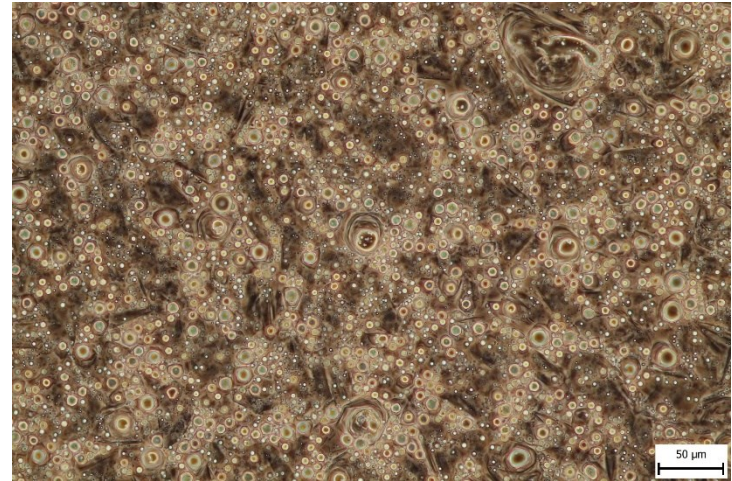


Slika 28: Matt krema nestabilna, po stresanju 6 ur (40x)

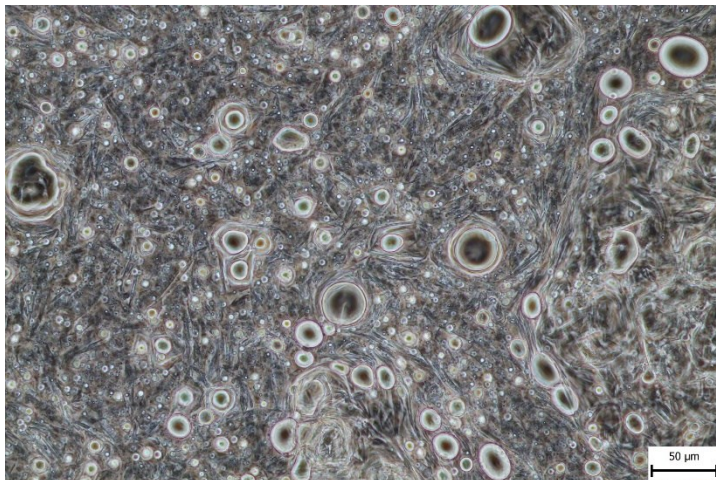
c) Barva stabilna in nestabilna varianta



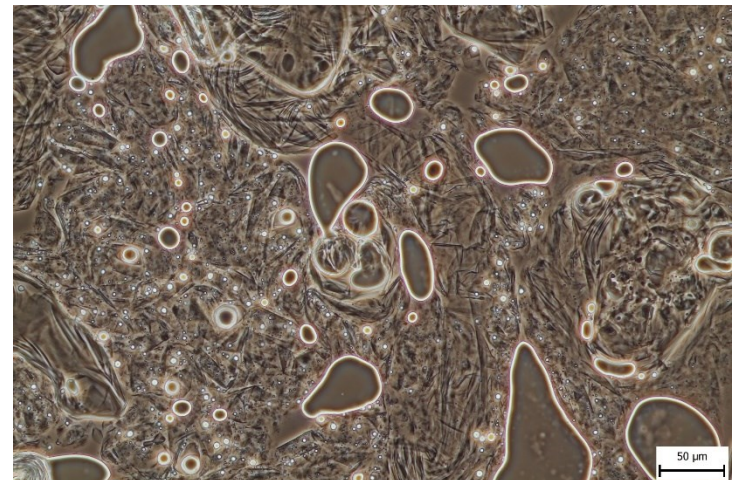
Slika 29: Barva stabilna, pred stresanjem (40x)



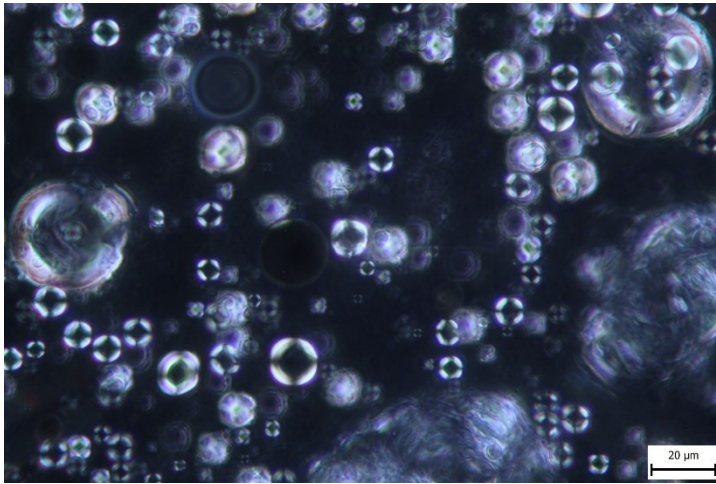
Slika 30: Barva stabilna, po stresanju 6 ur (40x)



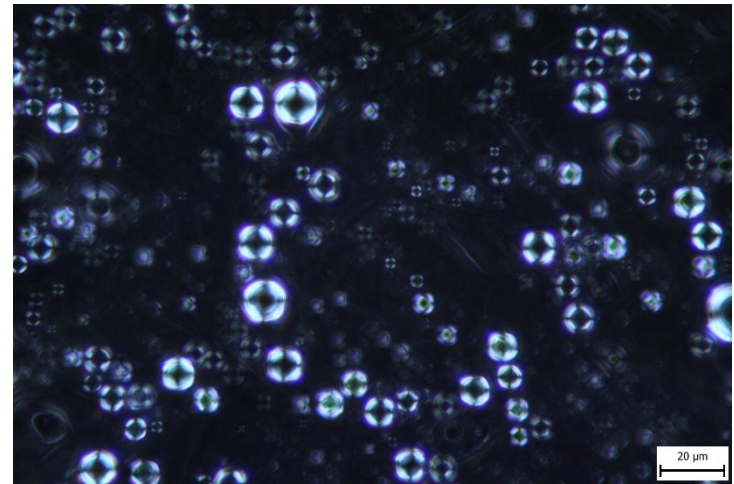
Slika 31: Barva nestabilna, pred stresanjem (40x)



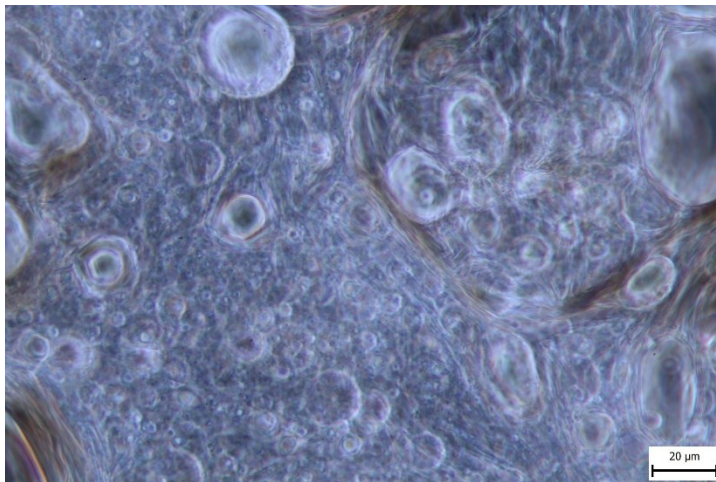
Slika 32: Barva nestabilna, po stresanju 6 ur (40x)



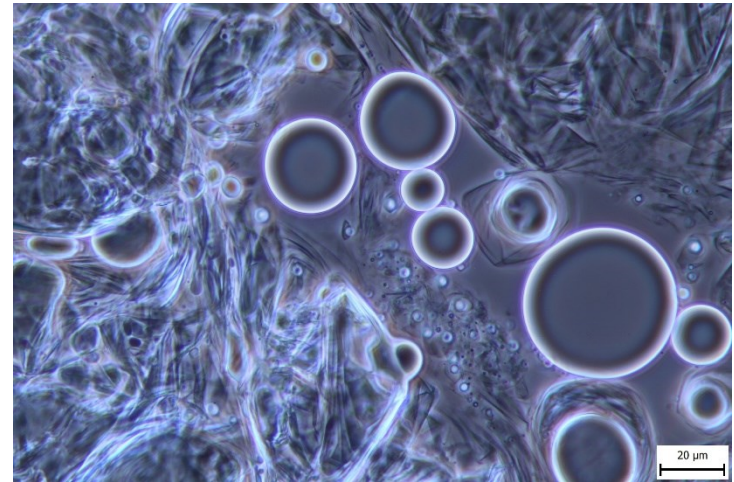
Slika 33: Barva stabilna, pred stresanjem (100x, polarizacija)



Slika 34: Barva stabilna, po stresanju 6 ur (100x, polarizacija)



Slika 35: Barva nestabilna, pred stresanjem (100x, polarizacija)



Slika 36: Barva nestabilna, po stresanju 6 ur (100x, polarizacija)