

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ZALA ZORKO

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ZALA ZORKO

**RAZVOJ HITRE IN ENOSTAVNE METODE ZA DOLOČANJE
KONCENTRACIJE ARGANOVEGA OLJA V KREMAH ZA OBRAZ**

**DEVELOPMENT OF A FAST AND SIMPLE METHOD FOR DETERMINATION
OF CONCENTRATION OF ARGAN OIL IN FACE CREAMS**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo sem opravljala na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za farmacijo, Katedri za farmacevtsko kemijo pod mentorstvom doc. dr. Janeza Mravljaka, mag. farm.

Zahvala

Mentorju doc. dr. Janezu Mravljaku, mag. farm. se zahvaljujem za prijaznost, dostopnost in strokovno pomoč pri izdelavi diplomske naloge. Prav tako se zahvaljujem izr. prof. Janezu Ilašu, mag. farm. za pomoč pri delu v laboratoriju, prijaznost, dostopnost in strokovno pomoč.

Najlepše se zahvaljujem tudi Tini Fokter, dipl. jezik. posred. (un) za lektoriranje diplomske naloge.

Iskrena hvala tudi družini in najbližjim za pomoč in podporo v času študija.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja doc. dr. Janeza Mravljaka, mag. farm.

Zala Zorko

Predsednica komisije: prof. dr. Julijana Kristl

Članica komisije: asist. dr. Jasna Omersel

Ljubljana, 2016

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	IV
ABSTRACT	V
SEZNAM OKRAJŠAV	VI
1. UVOD	1
1.1. ARGANOVO OLJE	1
1.1.1. Tradicionalna priprava.....	1
1.1.2. Industrijska priprava	1
1.1.3. Sestava	2
1.1.4. Prednosti arganovega olja za obraz	4
1.1.5. Prednosti arganovega olja pri različnih tipih kože	4
1.2. KROMATOGRAFIJA	6
1.2.1. Plinska kromatografija.....	6
1.2.2. Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC).....	9
2. NAMEN DELA.....	13
3. MATERIALI IN METODE	14
3.1. TOPILA	14
3.2. STANDARDI.....	14
3.3. LABORATORIJSKI MATERIAL	14
3.4. LABORATORIJSKA OPREMA	15
3.5. METODA	15
3.5.1. HPLC	15
3.5.2. GC.....	16
3.6. VZORCI	16
3.6.1. VZORCI ARGANOVEGA OLJA	17
3.6.2. VZORCI KREM ZA OBRAZ	18
4. EKSPERIMENTALNI DEL	23
4.1. PRIPRAVA STANDARDOV V CIKLOHEKSANU	23
4.2. PRIPRAVA VZORCEV ARGANOVEGA OLJA.....	23
4.2.1. PRIPRAVA VZORCA ARGANOVEGA OLJA V METANOLU IN n-HEKSANU	23
4.2.2. PRIPRAVA VZORCEV ARGANOVEGA OLJA V CIKLOHEKSANU	23

4.3.	PRIPRAVA VZORCEV KREM	24
4.3.1.	PRIPRAVA VZORCEV KREM V METANOLU	24
4.3.2.	PRIPRAVA VZORCA KREME V ACETONITRILU.....	24
4.3.3.	PRIPRAVA VZORCEV KREM V METANOLU IN n-HEKSANU.....	25
4.3.4.	PRIPRAVA VZORCEV KREM V METANOLU, DESTILIRANI VODI IN n-HEKSANU	25
4.3.5.	PRIPRAVA VZORCEV KREM V CIKLOHEKSANU	25
5.	REZULTATI IN RAZPRAVA	27
5.1.	ANALIZA STANDARDOV V CIKLOHEKSANU	27
5.2.	ANALIZA VZORCA ARGANOVEGA OLJA V CIKLOHEKSANU.....	29
5.2.1.	Vizualna analiza	29
5.2.2.	Analiza sestave.....	29
5.3.	ANALIZA VZORCEV KREM.....	31
5.3.1.	ANALIZA VZORCEV KREM V METANOLU	31
5.3.2.	ANALIZA VZORCA KREME V ACETONITRILU	33
5.3.3.	ANALIZA VZORCEV KREM V METANOLU IN n-HEKSANU	34
5.3.4.	ANALIZA VZORCEV KREM V CIKLOHEKSANU	34
6.	SKLEP.....	42
7.	VIRI.....	43

KAZALO SLIK

Slika 1: Arganova olja različnih proizvajalcev (Foto: Z. Zorko)	5
Slika 2: GC na Katedri za farmacevtsko kemijo UL FFA (Foto: Z. Zorko)	7
Slika 3: Shematični diagram plinske kromatografije (10).....	7
Slika 4: HPLC na Katedri za farmacevtsko kemijo FFA (Foto: Z. Zorko)	9
Slika 5: Shema HPLC (13).....	10
Slika 6: Polarnost topil (15)	12
Slika 7: Kromatogram raztopine skvalena v cikloheksanu (rdeče) in kromatogram raztopine α -tokoferola v cikloheksanu (modro) (GC)	28
Slika 8: Kromatogrami vzorcev arganovega olja 1 (rdeča), 2 (zelena), 3 (modra), 4 (roza) s standardom skvalenom (GC).....	30
Slika 9: Kromatogrami vzorcev krem 2, 3, 4, 5, 6 v metanolu (HPLC, $\lambda = 220$ nm)	31
Slika 10: Kromatogrami vzorcev krem 2, 3, 4, 5, 6 v metanolu (HPLC, $\lambda = 254$ nm)	32
Slika 11: Kromatogrami vzorcev krem 2, 3, 4, 5, 6 v metanolu (HPLC, $\lambda = 280$ nm)	32
Slika 12: Kromatogram vzorca kreme 8, raztopljene v acetonitrilu (HPLC; $\lambda = 220$ nm, 254 nm, 280 nm)	33
Slika 13: Kromatogram vzorca kreme 5 s standardom skvalena (GC)	35
Slika 14: Kromatogram vzorca kreme 6 s standardom skvalena (GC)	35
Slika 15: Kromatogram vzorca kreme 7 s standardom skvalena (GC)	36
Slika 16: Kromatogram vzorca kreme 8 s standardom skvalena (GC)	36
Slika 17: Kromatogram vzorca kreme 9 s standardom skvalena (GC)	37
Slika 18: Kromatogram vzorca kreme 10 s standardom skvalena (GC)	37
Slika 19: Kromatogram vzorca kreme 11 s standardom skvalena (GC)	38
Slika 20: Kromatogram vzorca kreme 12 s standardom skvalena (GC)	38
Slika 21: Kromatogram vzorca kreme 6 s koncentracijami 10 mg/mL (rdeča), 15 mg/mL (rožnata), 20 mg/mL (modra), 50 mg/mL (zelena), 100 mg/mL (rjava) (GC)	40
Slika 22: Koncentracija vzorca kreme 6 v odvisnosti od površine pod krivuljo pri vrhu 9,42 min. 41	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Sestava arganovega olja (4)	2
Preglednica II: Testirani vzorci arganovega olja.....	17
Preglednica III: Testirani vzorci krem za obraz	18

POVZETEK

Arganovo olje, ki ga izdelajo Berberske ženske v Maroku iz semen arganovega drevesa (*Argania Spinosa*), je že od nekdaj najbolj cenjeno olje, tako v prehranski kot kozmetični industriji. Bogato je z nasičenimi maščobnimi kislinami, naravnim tokoferolom, skvalenom in steroli.

Zaradi svoje sestave ima antioksidativni učinek, uravnava tvorbo loja in vlaži kožo, zato je primerno tako za suho kot mastno kožo, zmanjša izpadanje las in preprečuje gube. Zaradi svojega naravnega izvora je primerno tudi za nego občutljive kože, blaži srbenje, vnetje, luskavico, skratka stanja, povezana s to vrsto kože. Za določanje arganovega olja so v literaturi opisane le dolgotrajne in kompleksne metode, npr. GC-MS in derivatizacija pred analizo z GC.

Kot cilj pri diplomski nalogi smo si postavili razviti metodo, ki bi bila hitra in enostavna za določanje vsebnosti arganovega olja v kremah za obraz.

Proučili smo štiri arganova olja in osem krem za obraz različnih proizvajalcev. Kreme smo raztopili v različnih topilih oz. mešanici topil in z metodama HPLC in GC določali sestavo vzorcev. Ugotovili smo, da se kreme najbolje raztopijo v mešanici metanola, destilirane vode in cikloheksana, vendar je v hidrofilnem delu topila ostalo še nekaj lipofilnega topila in obratno, zato smo za analizo s HPLC uporabili metanol, za analizo z GC pa cikloheksan.

Kot standarda smo uporabili raztopini skvalena in α -tokoferola v cikloheksanu. Ker sta se obe spojini pojavili na kromatogramu vzorcev krem, je to pomenilo, da je metoda uporabna in pravilna.

Z različnimi koncentracijami krem smo ugotovili, da se površina pod vrhovi kromatogramov linearno povečuje s koncentracijo vzorcev krem pri analizi z GC. Za merjenje vzorcev smo najprej uporabili metodo HPLC z UV-VIS detektorjem. Ker nam ta metoda ni dala obetavnih rezultatov, saj so kromatogrami vzorcev krem imeli neugodno razmerje signal/šum, smo se osredotočili še na metodo GC s FID detektorjem. Metoda GC se je zaradi boljše ločbe sicer izkazala za boljšo metodo kot HPLC, vendar kljub temu nismo mogli z gotovostjo vedeti, kateri signali pripadajo arganovemu olju. Enostavne in hitre metode brez derivatizacije za določanje vsebnosti arganovega olja v kremah nismo uspeli razviti.

Ključne besede: arganovo olje, krema za obraz, HPLC, GC

ABSTRACT

Moroccan argan oil is made by Berberian women from kernels of argan tree (*Argania spinosa*). It has always been one of the most valued oils in food as well as in cosmetic industry. Argan oil is rich and contains unsaturated fatty acids, natural tocopherol, squalene and sterols. Due to its composition, it has an antioxidative effect, regulates the production of sebum and moisturizes the skin and is therefore appropriate for dry as well as oily skin type, reduces hair loss and prevents wrinkles. Due to its natural origin it is appropriate for sensitive skin care, it helps with inflammation, eczema, psoriasis and other conditions connected with this skin type. Only long-term and complex methods are described in literature to determine the content of argan oil, for example GC-MS and derivatization before GC analysis.

The goal of the diploma thesis was to develop a fast and effective method to determine the content of argan oil in face creams.

We used four argan oils and eight face creams from different manufacturers. We tried to optimally dissolve creams in different solvents or different mixtures of solvents. We discovered that cream was optimally dissolved in a mixture of methanol, distilled water and cyclohexane, but in the hydrophilic part of the solvent there was some lipophilic solvent left and vice versa. For this reason we used methanol for the HPLC method and cyclohexane for the GC method.

As standards we used solutions of squalene and α -tocopherol in cyclohexane. Since both of the compounds were visible on chromatogram of cream samples, the method proved to be useful and correct.

Using different concentrations of creams, we tried to verify if the area under the peaks of chromatogram was getting higher with the concentration of the cream samples. After measuring with GC and the comparison of chromatograms, we noticed that the area got higher with the concentration of cream samples.

Firstly, we used the HPLC method with UV-VIS detector for analysis. This method was not successful, due to the inconvenience of the proportion signal/noise. That is why we focused on the GC method with FID detector. This method was better, but we still could not recognize which signals belong to argan oil. We were not able to develop a simple and fast method without derivatization for determining the content of argan oil in face creams.

Key words: argan oil, face cream, HPLC, GC

SEZNAM OKRAJŠAV

- FFA Fakulteta za farmacijo
- FID plamensko ionizacijski detektor (ang. *flame ionization detector*)
- FSWC stensko prevlečena s silikagelom (ang. *fused-silica wall-coated*)
- GC plinska kromatografija (ang. *gas chromatography*)
- GC-MS plinska kromatografija, sklopljena s masno spektrometrijo (ang. *gas chromatography-mass spectrometry*)
- HPLC tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (ang. *high performance liquid chromatography*)
- MF mobilna faza
- SCOT podporno prevlečene kapilarne (ang. *support-coated open tubular*)
- UV-VIS ultravijoličen viden (ang. *ultraviolet-visible*)
- UZ ultrazvok
- WCOT stensko prevlečene kapilarne (ang. *wall-coated open tubular*)

1. UVOD

1.1. ARGANOVO OLJE

Arganovo olje skoraj izključno proizvajajo v jugozahodnem Maroku, ki je eno izmed najrevnejših predelov države. Za ekstrakcijo visoko kakovostnega arganovega olja so specializirane ženske, ki so organizirane v žensko zadrugo. Ta dejavnost jim tako omogoča finančni tok. Vendar pa lahko arganovo drevo hitro postane ogrožena vrsta zaradi pogoste suše, iztrošenosti gozda in slabega gozdnega gospodarstva (1).

1.1.1. Tradicionalna priprava

Tradicionalno arganovo olje pripravljajo izključno ženske. Po zbiranju zrelih sadežev jih olupijo in lupine zavržejo, tako da imajo arganovi oreščki velikost velike olive (2). Arganovi oreščki vsebujejo do tri jedra. Olje, pripravljeno s hladnim stiskanjem iz rahlo praženih jedrc, uporabljajo za prehrano, medtem ko uporabljajo olje, pripravljeno s hladnim stiskanjem iz nepraženih jedrc v kozmetiki (3). Arganove oreščke ročno zdrobijo tako, da jih trdno držijo med palcem in kazalcem po najdaljši diagonali semena in jih silovito udarjajo s kamnom. Nato jedra zberejo in jih v primeru priprave prehranskega olja popražijo za nekaj minut na glinenih ploščah. Pražena jedra zdrobijo z ročnim mlinskim kamnom, da nastane rjavkasto testo, ki ga pozneje ročno zmešajo s toplo vodo za nekaj minut. Mokro testo nato ročno stisnejo, da postane trdno in spusti rjavo emulzijo, ki se čez nekaj minut loči na vodno in oljno fazo, ki ju ločijo. Priprava arganovega olja po tradicionalni metodi je zelo počasna (2). Za proizvodnjo 1 L tega redkega olja, je potrebno 30 kg jedrc in 16 ur dela ene osebe, kar opraviči njegovo visoko ceno (3).

1.1.2. Industrijska priprava

Za industrijske ali laboratorijske namene arganovo olje ekstrahirajo iz zdrobljenih jeder z lipofilnimi topili. Arganovo olje se pridobi neposredno po izparevanju topila. Po tej metodi pripravlja arganovo olje samo kozmetična industrija (2).

1.1.3. Sestava

Preglednica I: Sestava arganovega olja (4)

Maščobne kisline (%)	Steroli (% vseh sterolov)	Tokoferoli (% vseh tokoferolov)
Oleinska kislina 43,0 - 49,1	Šotenol 44,0 - 49,0	γ-Tokoferol 81,0 - 92,0
Linolna kislina 29,3 - 36,0	Spinasterol 34,0 - 44,0	δ-Tokoferol 6,2 - 12,8
Palmitinska kislina 11,5 - 15,0	Δ-7-Avenasterol 4,0 - 7,0	α-Tokoferol 2,4 - 6,5
Stearinska kislina 4,3 - 7,2	Stigmasta-8-22-dien-3β-ol 3,2 - 5,7	β-Tokoferol 0,1 - 0,3
Arahidonska kislina ≤ 0,5	Kampesterol ≤ 0,4	
Gadolenska kislina ≤ 0,5	Holesterol ≤ 0,4	
Linolenska kislina ≤ 0,3		
Behenska kislina ≤ 0,2		
Miristinska kislina ≤ 0,2		
Palmitoleinska kislina ≤ 0,2		
Pentadekanojska kislina ≤ 0,1		
Heptadekanojska: sledi		

Arganovo olje sestoji iz 99 % acilgliceridov, od tega je 95 % trigliceridov. Ostale 4 % sestavljajo monogliceridi, digliceridi in proste maščobne kisline. Dve glavni maščobni kislini, prisotni v acilgliceridih arganovega olja sta oleinska in linolna kislina (mono- in dinenasičeni maščobni kislini). Na tretjem in četrtem mestu sta v arganovem olju prisotni palmitinska in stearinska kislina. Ti dve sta nasičeni maščobni kislini (2).

1 % arganovega olja sestoji iz neumiljivih snovi. Te so karoteni, tokoferoli, triterpensi alkoholi, steroli in ksantofili. V ekstra deviškem olju je nivo tokoferolov 600 - 900 mg/kg. Glavni tokoferol je γ -tokoferol, ki je učinkovit antioksidant (2). Vitamin E je antioksidant, topen v maščobah, ki ga sestavljata dve glavni homologni vrsti spojin, znanih kot tokoferoli in tokotrinoli. Tokoferoli so strukturno karakterizirani z nasičeno stransko verigo na kromatinskem obroču, kjer imajo tokotrinoli nenasičeno fitilno stransko verigo. V naravi obstajajo štirje homologi vsakega tipa in imajo različne stopnje antioksidativne učinkovitosti. Karotenoidi so visoko nenasičeni tetraterpeni, biosintetizirani iz osmih izoprenskih enot. Karotenoidi so razdeljeni v dva glavna razreda: karoteni, ki so strogo polienski ogljikovodiki in ksantofili, ki vsebujejo kisik. Kisik in ksantofili so lahko v obliki hidroksi, keto, epoksi ali karboksilnih skupin. V neobdelanem arganovem olju predstavljajo 42 % neumiljive frakcije. Steroli so tetraciklične spojine, običajno s 27, 28 ali 29 ogljikovimi atomi. Predstavljajo precejšen delež neumiljivih snovi. Celotna vsebnost sterolov v neumiljivi frakciji je 20 %. Arganovo olje ima visoko vsebnost skvalena, saj namreč presega 0,3 %, v primerjavi z ostalimi rastlinskimi olji (razen olivnega, ki ima podobno vsebnost kot arganovo olje), ki imajo vsebnost manjšo od 0,15 % (5).

Fenolni derivati, kot so kofeinska kislina, oleuropein, vanilin, tirozol, ferulna kislina, sirinska kislina, katehol, resorcinol, (-)-epikatehin in (+)-katehin prav tako delujejo antioksidativno. V arganovem olju so identificirali tudi ubikinonske triterpenske alkohole: tirukalol, β -amirin, butirospermol, lupeol in 24-metilen cikloartanol (2). V arganovem olju so odkrili tudi številne neidentificirane spojine z UV spektrom, podobnim fenolom, kar predstavlja podlago za nadaljnje preiskave (5).

1.1.4. Prednosti arganovega olja za obraz

- Vlažilec kože - arganovo olje vsebuje sterole za zdravljenje kože. Ti spodbujajo zdrav celični metabolizem in pomagajo ohraniti kožo bolj navlaženo. Poleg tega arganovo olje pomaga koži zaradi prisotnih nenasičenih maščobnih kislin, ki naredijo kožo mehkejšo (6).
- Akne in aknaste brazgotine - ker arganovo olje regulira tvorbo loja, ki povzroča akne, lahko njegova uporaba zmanjša nadaljnje izbruhe. V olju prisoten vitamin E je antioksidant, ki pomaga odstraniti poškodovane celice in pomaga pri rasti novih, zaradi česar izginejo aknaste brazgotine (6).
- Proti staranju - po nanosu na obraz, antioksidanti v arganovem olju koristijo zdravju kože s preprečevanjem oksidativnih poškodb zaradi onesnaženosti okolja in UV - sevanja. Tokoferoli in maščobne kisline, kot je linolna kislina, reagirajo z radikalom in izboljšajo elastičnost in celično trdnost kože na obrazu (6).
- Odstranjevalec ličil - olje se lahko uporablja kot varen in učinkovit odstranjevalec ličil, še posebno pri odstranjevanju ličil, kot sta črtalo in maskara, saj ne draži ob stiku z očesom (6).

1.1.5. Prednosti arganovega olja pri različnih tipih kože

Suha koža

Suhi koži arganovo olje pomaga tako, da stimulira sposobnost kože, da ostane navlažena. Poleg vlaženja kože, zmanjša srbečico in luskavost. Suha koža ne proizvede dovolj loja in tako ne ohranja kože navlažene. Arganovo olje vzdržuje ravnotežje tvorbe loja v koži (6).

Občutljiva koža

Ker je arganovo olje 100% naravna sestavina, predstavlja manjše tveganje pri občutljivi koži. Kljub vsemu pa je potrebno pred uporabo nov izdelek preizkusiti na manjšem predelu kože, da se prepričamo, da nismo alergični. Arganovo olje pomaga pri kožnih problemih, kot so vnetje, luskavica, dermatitis in rosacea, ki so povezani s tem tipom kože. Lastnost zdravljenja pa je prav tako povezana s protivnetnimi sredstvi, kot so antioksidanti in vitamin E (6).

Mastna koža

Mastna koža tvori več loja kot je potrebno, da nadomesti pomanjkanje vlage. Loj, ki oksidira, postane bolj viskozen in zamaši lojnice. Sledi bakterijska okužba zamašenih lojnic, ki vodi v nastanek aken. Arganovo olje poskrbi za potrebno navlaženost kože, tako se zmanjša tvorba loja (6).

Mešana koža

Pri mešani koži so predeli kože, kot sta nos in čelo mastni, medtem ko so drugi predeli suhi. Arganovo olje uravnoteži tvorbo loja in izenači predele med suho in mastno kožo (6).

Na sliki 1 so predstavljeni primeri arganovih olj različnih proizvajalcev, ki se uporabljajo za nego kože in las.



Slika 1: Arganova olja različnih proizvajalcev (Foto: Z. Zorko)

1.2. KROMATOGRAFIJA

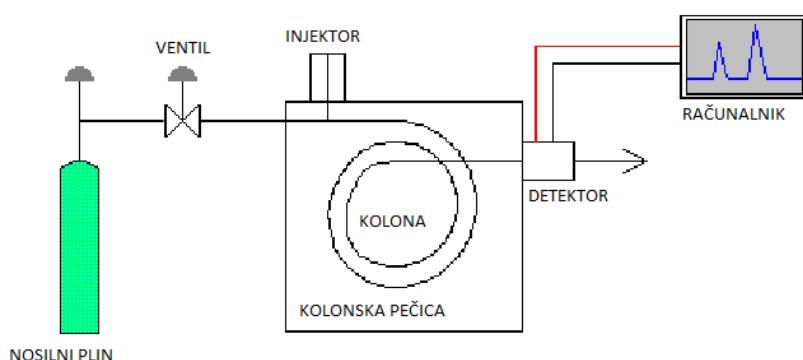
Kromatografija je analitska tehnika, ki temelji na ločevanju molekul glede na razlike v njihovi strukturi in/ali sestavi. Vključuje premikanje vzorca skozi sistem, da se loči v različne komponente čez stacionarno fazo. Molekule v vzorcu imajo različne interakcije s stacionarno podporo, kar vodi do ločevanja podobnih molekul. Kromatografske separacije se delijo na več kategorij, ki so odvisne od uporabljene mobilne in stacionarne faze ter vključujejo tankoplastno kromatografijo, plinsko kromatografijo (GC), papirno kromatografijo in tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) (7).

1.2.1. Plinska kromatografija

Plinska kromatografija je metoda ločevanja komponent mešanice plinov in pare. Široko je uporabljena v analitski kemiji in fizikalnih laboratorijih. Metoda je vsestransko uporabna, bolj natančna, enostavna za uporabo in manj odvisna od tehničnih spretnosti, kot mnogi od starih uveljavljenih načinov identifikacije in merjenja plinov (8). Tipična plinska kromatografija sestoji iz injekcijskega vhoda, kolone, opreme za nadzor toka nosilnega plina, peči in grelcev za ohranjanje temperature injekcijskega vhoda in kolone, detektorja in računalnika (sliki 2, 3). Pri plinski kromatografiji so komponente vzorca raztopljene v topilu in uparjene za ločitev analitov z deljenjem vzorca na dve fazi: stacionarno in mobilno fazo. Mobilna faza je kemično inerten plin, ki prenaša molekule analita skozi segreto kolono. Plinska kromatografija je edina oblika kromatografije, ki ne uporabi mobilne faze za interakcijo z analitom. Stacionarna faza je ali trden adsorbent, imenovano plinsko-trdna kromatografija (GSC), ali tekočina oz. inerten nosilec, imenovano plinsko-tekoča kromatografija (GLC) (9).



Slika 2: GC na Katedri za farmacevtsko kemijo UL FFA (Foto: Z. Zorko)



Slika 3: Shematični diagram plinske kromatografije (10)

1.2.1.1. Vzorci in priprava vzorcev

Z GC lahko učinkovito analiziramo številne vrste vzorcev. V nasprotju s HPLC, ki se uporablja za ločevanje večjih molekul, se GC uporablja za analizo vzorcev s komponentami, ki jih lahko uparimo (pogosto so to manjše molekule). Nujna zahteva je, da so vzorci za analizo z GC hlapni. V primeru da niso, se lahko z derivatizacijo poveča topnost in hlapnost. Derivatizacija vzorcev vključuje kemijsko reakcijo, ki spremeni molekulsko strukturo analita z namenom izboljšanja detekcije. Različne vrste spojin, imenovane derivatizacijska sredstva (npr. $\text{BF}_3 \cdot \text{MeOH}$ za tvorbo metilnih estrov iz karboksilnih kislin) se uporabljajo za povečanje hlapnosti komponent vzorca. Vendar se je bolje izogniti derivatizaciji in tako obdržati separacijo enostavno (7).

1.2.1.2. Nosilni plin

Nosilni plin mora biti kemijsko inerten. Najpogosteje se uporablja dušik, helij, argon ali ogljikov dioksid. Izbira nosilnega plina pogosto temelji na tipu uporabljenega detektorja. Sistem nosilnega plina lahko prav tako vsebuje molekularno sito za odstranitev vode in ostalih nečistoč, ki bi motile analizo (10).

1.2.1.3. Detekcijski sistemi

Detektor je naprava, nameščena na koncu kolone, ki zagotavlja kvantitativno merjenje komponent mešanice po eluiranju v kombinaciji z nosilnim plinom.

Vsak detektor ima dva glavna dela, ki ob sočasni uporabi pretvorita zaznane spremembe lastnosti v električni signal, ki ga posname v obliki kromatograma. Prvi del detektorja je senzor, ki je nameščen najbližje izhodu kolone za optimizacijo detekcije. Drugi del je elektronska oprema, ki digitalizira analogni signal, da lahko računalnik analizira pridobljen kromatogram. Prej kot se analogni signal pretvori v digitalni signal, večje postane razmerje signal - šum, saj so analogni signali bolj občutljivi na več tipov interferenc (9).

Plamensko ionizacijski detektor (ang. flame ionization detector, FID)

Ionizacijske detekcijske metode vključujejo ionizacijski detektor in med ostalimi fizikalnimi procesi zajetje elektronov, fotoionizacijo in termoionizacijsko detekcijo. Ionizacijski detektorji interagirajo s topljenci, eluiranimi iz kolone GC, da proizvedejo tok, ki se spreminja z deležem prisotnega topljenca. FID je občutljiv na molekule, ki se ionizirajo v vodikovem plamenu in vključujejo večino spojin, ki vsebujejo ogljik. Ostali detektorji reagirajo le na določene heteroatome, kot so halogeni, dušik in žveplo za detekcijo za zajetje elektronov; dušik in fosfor za termoionizacijsko detekcijo; ali točno določene strukture kot so aromati za fotoionizacijsko detekcijo. Medtem ko se ioni oblikujejo znotraj detektorja, jih električni potencial poganja proti elektrodi, kjer proizvedejo minutni tok v velikostnem redu od pikoamperov (10^{-12} A) za FID. Ta tok je spremenjen v električno napetost, filtriran in ojačan kot je potrebno (11).

1.2.1.4. Kolone

Ločimo polnjene in kapilarne oz. odprte tubularne kolone. Polnjene kolone vsebujejo fino razdeljen, inerten, trden podporni material, obložen s tekočo stacionarno fazo. Večina polnjenih kolon meri v dolžino 1,5 - 10 m in ima notranji premer 2 - 4 mm (10).

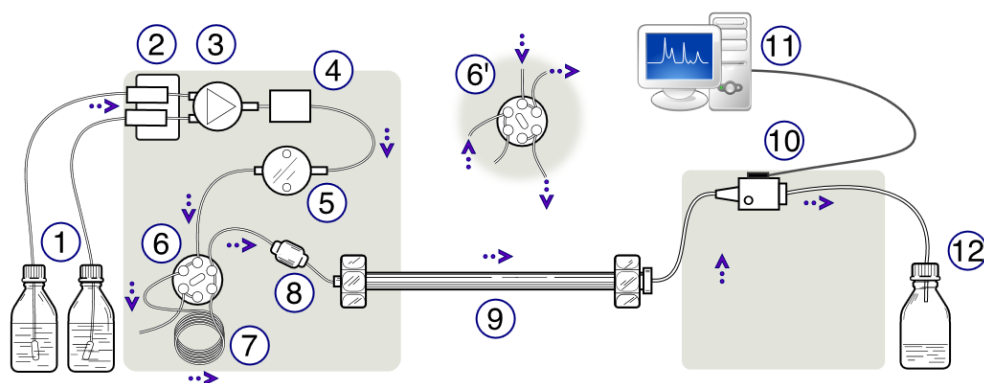
Kapilarne kolone imajo notranji premer nekaj desetih milimetra (10). Kapilarne kolone delimo na stensko prevlečene kapilarne (WCOT) kolone in podporno prevlečene kapilarne (SCOT) kolone. WCOT kolone imajo tanko plast stacionarne faze vzdolž stene kolone. Pri SCOT kolonah so stene kolon najprej obložene s tanko plastjo (debelo okoli 30 μm) adsorpcijske trdnine, kot je diatomejska prst, material, ki sestoji iz enoceličnih ogradin morskega planktona. Adsorpcijsko trdnino nato obdelamo s tekočo stacionarno fazo. Medtem ko so SCOT kolone zmožne zadržati večje volumne stacionarne faze, imajo WCOT kolone večjo kolonsko učinkovitost. Moderne WCOT kolone izdelajo iz stekla, uporabljajo pa tudi nerjaveče jeklo, aluminij, baker in plastiko. Ena izmed priljubljenih kapilarnih kolon je posebna WCOT kolona, imenovana stensko prevlečena s silikagelom (FSWC) kapilarna kolona (9).

1.2.2. Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)

HPLC je v bistvu močno izboljšana kolonska kromatografija. Namesto da topilo kaplja skozi kolono pod vplivom gravitacije, se ga s silo potisne skozi kolono pod visokimi tlaki do 400 atmosfer. Zaradi tega je ločba opravljena veliko hitreje (12). Zgradba HPLC je prikazana na slikah 4 in 5.



Slika 4: HPLC na Katedri za farmacevtsko kemijo FFA (Foto: Z. Zorko)



1-rezervoarji za topila (MF)

2-odplinjevanje topila

3-gradientni ventil

4-mešalna posoda za dostavo MF

5-visokotlačna črpalka

6-injektor

7-zanka injiciranega vzorca

8-predkolona

9-kolona

10-detektor

11-računalnik

12-odpad

Slika 5: Shema HPLC (13)

Glede na topilo in stacionarno fazo obstajata dve različici pri uporabi HPLC:

1.2.2.1. Normalno fazna HPLC

Kljub temu da je uporabljen izraz normalna, te vrste HPLC ne uporabljamo pogosto. Kolono napolnimo z majhnimi silikatnimi delci, topilo je nepolarno-npr. heksan. Tipična kolona ima notranji premer 4,6 mm ali manj in meri v dolžino od 150 do 250 mm. Polarne spojine se bodo v mešanici, ki bo šla skozi kolono dlje časa obdržale na polarni stacionarni fazi, kot pa se bodo obdržale nepolarne spojine. Nepolarne spojine bodo tako šle hitreje skozi kolono (12).

1.2.2.2. Reverzno fazna HPLC

Tu imamo derivatizirano stacionarno fazo, ki je zato lipofilna, kot mobilno fazo pa uporabljamo polarna topila. Kot organska topila uporabljamo acetonitril, metanol, izopropanol, etanol, kot vodno fazo pa uporabljamo vodo ali pufre.

Izbira mobilne faze

Mobilna faza pri reverzno fazni kromatografiji običajno obsega pufer (vodna raztopina), organski modifikator, pogosto pa dodamo tudi sredstvo za parjenje z ioni za povečanje selektivnosti mobilne faze. (14)

Vsa topila, pufrske soli, sredstva za parjenje z ioni, kot tudi voda morajo biti za pripravo mobilne faze visoke kemijske čistosti in proste kakršnih koli kovinskih ionov. Za zagotovitev primerne čistosti topila, soli in vodo označimo kot HPLC primerne čistoče. Kemijska čistost je pomembna, ker lahko nečistoče v mobilni fazi vplivajo na kromatografijo z nastankom neželenih dodatnih vrhov in navideznih vrhov (14).

Organsko topilo

Organsko topilo dodamo mobilni fazi za zmanjšanje polarnosti. Dve topili z različno polarnostjo, kot sta vodna raztopina pufera z nizkim pH in acetonitril lahko zmešamo skupaj, posledično pa nastane topilo z vmesno polarnostjo med obema originalnima komponentama. Manjša kot je polarnost mešanice topil, večja je moč eluiranja. Acetonitril in metanol sta najpogostejše uporabljeni organski topili, saj imata oba nizko viskoznost (tudi če sta zmešana v vodni raztopini) in sta UV transparentna. Prednost 2-propanola je še nižja polarnost (slika 6) in tako večja moč eluiranja (14, 15). Je UV transparenten in odličen za čiščenje reverzno fazne kolone. Vendar pa ima mobilna faza s tem organskim modifikatorjem večjo viskoznost. Večja viskoznost mobilne faze je neželena, saj je potem slab masni transport topila med mobilno in stacionarno fazo ter visok protitlak tudi pri zmernih do nizkih pretokih (14).

Topilo	Indeks polarnosti	Nepolarna Naraščujoča polarnost
n-heksan	0,0	
cikloheksan	0,2	
toluen	2,4	
benzen	2,7	
diklorometan	3,1	
kloroform	4,1	

2. NAMEN DELA

Na trgu s kozmetičnimi izdelki proizvajalci pogosto izpostavljajo izdelek, ki ima določeno sestavino naravnega izvora. Vendar pa nikjer na ovojnini ne piše, kakšna je vsebnost te sestavine. Za analizo sestave in vsebnosti komponent so v literaturi opisane le kompleksne in dolgotrajne metode (npr. derivatizacija pred merjenjem z GC ali GC-MS (16)). Zato želimo razviti enostavno in hitro metodo za določanje vsebnosti arganovega olja v kozmetičnih izdelkih.

Analizirali bomo vzorce arganovega olja različnih proizvajalcev. V vzorcih dnevnih krem z arganovim oljem bomo nato potrdili prisotnost in določili vsebnost arganovega olja.

Po pregledu literature in poznavanju analiznih metod bomo izbrali enostavni in hitri metodi HPLC in GC, s katerima bomo analizirali različne vzorce krem in arganovega olja. Kromatograme krem bomo primerjali s kromatogrami vzorcev arganovega olja. Če se bodo retencijski časi kromatografskih vrhov krem ujemali z retencijskimi časi kromatografskih vrhov arganovega olja, bomo lahko potrdili prisotnost arganovega olja v kozmetičnem izdelku. Vsebnost arganovega olja v kremah bomo določili tako, da bomo primerjali površine pod krivuljami vrhov za izbrane komponente na kromatogramu krem s površinami pod kromatografskimi vrhovi arganovega olja.

Preverili bomo, ali je v določenem koncentracijskem območju odziv linearno odvisen od koncentracije vzorca kreme.

Razvili bomo optimalni postopek za pripravo raztopin vzorcev krem v ustreznem topilu za analiziranje z metodo HPLC oz. GC.

Razvili bomo kromatografsko metodo (HPLC ali GC) z ustrežno ločljivostjo, s katero bomo lahko določili maksimalno število sestavin v arganovem olju in določili vsebnost teh sestavin v vzorcih krem.

3. **MATERIALI IN METODE**

3.1. TOPILA

- Metanol (Panreac, Barcelona, Španija)
- Cikloheksan (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija)
- n-Heksan (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija)
- Bidestilirana voda (FFA)

3.2. STANDARDI

- Skvalen (Sigma Aldrich)
- ($\pm$)- α -tokoferol (Sigma Aldrich)

3.3. LABORATORIJSKI MATERIAL

- Merilna bučka 100 mL
- Merilna pipeta 1 mL, 5 mL, 10 mL
- Polnilna pipeta 1 mL, 5 mL, 10 mL
- Plastične mikrocetrifugirke (»epice«) 2 mL-Plastibrand® (Brand, Nemčija)
- Viale 2 mL (Agilent Technologies, Nemčija)
- Inserti za vialo (Thermo Scientific, Langerwehe, Nemčija)
- Filter z velikostjo por 0,45 μ m Minisart RC 25 (Sartorius Stedium Biotech GmbH, Nemčija)
- Polavtomatska pipeta 100-1000 μ L (Eppendorf Research, Hamburg, Nemčija)
- Ustrezni nastavki za pipeto
- Falkonka 15 mL
- Laboratorijska spatula
- Brizga 2 mL

3.4. LABORATORIJSKA OPREMA

Tehtanje

Analitska tehtnica Mettler AT261 DeltaRange (Mettler, Zürich, Švica)

Mešanje in raztapljanje

- Ultrazvočna kadička SONIS 4 (Iskra PIO d. o. o., Šentjernej, Slovenija)
- Vibracijski stresalnik IKA KS 130 basic (IKA - Werke GmbH & Co. Kg, Staufen, Nemčija)
- Vortex Yellowline TTS2 (IKA - Werke GmbH & Co. Kg, Staufen, Nemčija)

Centrifugiranje

Laboratorijska centrifuga Centric 400R (Tehtnica, Železniki, Slovenija)

Priprava bidestilirane vode

Aparatura za pripravo bidestilirane vode Milli-Q Advantage A10 proizvajalca Millipore (Merck, Darmstadt, Nemčija)

3.5. METODA

3.5.1. HPLC

Sistem Agilent Technologies 1100 series z UV detektorjem (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, ZDA)

Detektor: UV-VIS

Kolona: Luna C18 250 × 4,6 mm, 5 µm

Mobilna faza:

- Vodni del: fosfatni pufer s pH 4,4, voda s pH 7,0
- Organski del: metanol, acetonitril
- MF1: Pufer:metanol = 95:5 (V/V)
- MF2: Voda:metanol = gradientno od 60% do 90% 10 min, nato 95 % 20 min, nato 95 % 25 min
- MF3: Voda:acetonitril = gradientno od 60% do 90% 10 min, nato 95 % 20 min, nato 95 % 25 min

Pretok mobilne faze: 1,5 mL/min

Volumen injiciranja:

- 10 μL
- 20 μL

Temperatura kolone: 25 °C

Valovne dolžine detekcije: 220 nm, 254 nm, 280 nm

3.5.2. GC

Sistem: GC - 2010 Plus (Shimadzu Corporation, Kjoto, Japonska)

Računalniški program: GC PostRun

Detektor: FID

Kolona: Zebron ZB-5MSi 30 m, 0,25 mm ID, 0,25 μm 5 % fenil – 95 %

Kromatografske razmere:

- nosilni plin: helij
- pretok kolone: 1,34 mL/min
- način injiciranja: »split« (1:100)
- temperatura injektorja: 320 °C
- temperatura kolone: 190 °C
- temperaturni program: prvih 5 min je temperatura konstantna 190 °C, od 5 min do 25 min narašča temperatura za 6 °C/min in doseže 310 °C, zadnjih 5 min je temperatura konstantna 310 °C
- volumen injiciranja: 1 μL
- čas analize: 30 min

3.6. VZORCI

Za vzorce smo si izbrali štiri arganova olja štirih različnih proizvajalcev. Prav tako smo si izbrali osem vzorcev krem za obraz, ki so vsebovale arganovo olje. V preglednici II so predstavljeni vzorci arganovega olja, v preglednici III pa vzorci krem za obraz.

3.6.1. VZORCI ARGANOVEGA OLJA

Preglednica II: Testirani vzorci arganovega olja

Št. vzorca	Ime arganovega olja	Slika arganovega olja v primarni in/ali sekundarni ovojnini
<u>1</u>	Bottega Verde	
<u>2</u>	Omnia Botanica	
<u>3</u>	Melvita	

<u>4</u>	Arganovo olje, kupljeno v Maroku	
----------	---	--

3.6.2. VZORCI KREM ZA OBRAZ

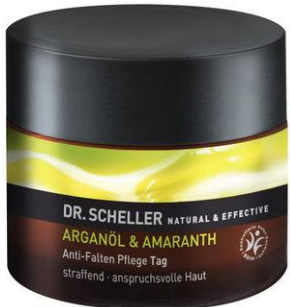
Preglednica III: Testirani vzorci krem za obraz

Št. vzorca	Ime in sestavine (INCI) kreme za obraz	Slika kreme za obraz v primarni in/ali sekundarni ovojnini
<u>5</u>	Bottega Verde Aqua, Cetearyl Alcohol, C12-15 Alkyl Benzoate, Glycerin, Glyceryl Stearate, Ethylhexyl Palmitate, Olive Oil Decyl Esters, Cyclopentasiloxane, Brassica Campestris Sterols, Potassium Palmitoyl Hydrolyzed Sweet Almond Protein, Dimethicone, Mel, Argania Spinosa Kernel Oil , Butyrospermum Parkii Butter*, Squalene, Soybean Glycerides, Hydrogenated Vegetable Oil, Butyrospermum Parkii Butter Unsaponifiables, Jasminum Officinale Flower Extract, Phenoxyethanol, Stearic Acid, Parfum, Xanthan Gum, Acetylated Glycol Stearate, Imidazolidinyl Urea, Dimethicone/Vinyl Dimethicone Crosspolymer, Butylene Glycol, Methylparaben, Cetyl Hydroxyethylcellulose, Disodium EDTA, Ethylparaben, Caramel, Lecithin,	

	Citric Acid, Buthylphenyl Methylpropional, Carrageenan, Benzyl Salicylate, Tocopherol, Coumarin, Glucose, Limonene, Ascorbyl Palmitate, Linalool, CI 19140, Caprylyl Glycol, Ethylhexylglycerin, Pottasium Sorbate, Sodium Benzoate *organska pridelava	
<u>6</u>	Omnia Botanica Aqua [Water], Argania Spinosa Kernel Oil, Glycerin, Glyceryl Oleate Citrate, Tricaprylin, Caprylic/Capric Triglyceride, Sweet Almond (Prunus Amygdalus Dulcis) Oil, Dicaprylyl Ether, Sodium Stearoyl Lactylate, Parfum [Fragrance], Glyceryl Stearate, Glyceryl Caprylate, Natural Unsaponifiable Olive Waxe, Glyceryl Dibehenate, Cellulose Gum, Tribehenin, Glyceryl Behenate, Microcrystalline Cellulose, Chamomilla Recutita (Matricaria) Flower Water, Aloe Barbadensis Leaf Extract, Rosa Centifolia Flower Water, Cetearyl Alcohol, Lauryl Alcohol, Chondrus Crispus (Carrageenan) Extract, Tocopherol, Xanthan Gum, Sodium Phytate.	
<u>7</u>	L'Erbolario Aqua, Argania spinosa Oil, Glyceryl Stearate, Ethylhexyl Palmitate, Cetearyl Alcohol, Dicaprylyl Ether, Glycerin, Butyrospermum parkii Butter, Caprylic/Capric Triglyceride, Sodium Stearoyl Lactylate, Dimethicone, Oleic\Linoleic\Linolenic Polyglycerides, Oryzanol, Argania spinosa Leaf Extract, Ceratonia siliqua Gum, Helianthus annuus Seed Oil, Canola Oil, Rosmarinus officinalis Extract, Tocopherol, Citric Acid, Sodium PCA, Glucose,	

	Glutamic Acid, Lysine, Glycine, Allantoin, Xanthan Gum, Carbomer, Profumo/Parfum, Aminomethyl Propanol, Benzyl Alcohol, Dehydroacetic Acid, Potassium Sorbate, Sodium Benzoate	
8	So' BIO étic Aqua (Water), Caprylic/Capric Triglyceride, Argania Spinosa (Kernel) Oil*, Sesamum Indicum (Sesame Seed) Oil*, Cetearyl Alcohol, Citrus Aurantium Dulcis ((Orange)fruit) Water*, Glycerin, Glyceryl Stearate, Glyceryl Stearate Citrate, Mauritia Flexuosa Fruit Oil*, Benzyl Alcohol, Xanthan Gum, Argania Spinosa (Leaf) Extract, Limonene, Citrus Aurantium Dulcis (Orange) Oil*, Helianthus Annuus (Sunflower) Seed Oil, Tocopherol, Dehydroacetic Acid, Maltodextrin, Parfum (Fragrance), Linalool, Sodium Hydroxide, Cinnamomum Zeylanicum (Bark) Oil*, Cinnamal * organska pridelava	
9	Nuxe Aqua (Water), Glycerin, Glycol Palmitate, Cera Alba (Beeswax), Cocos Nucifera (Coconut) Oil, Macadamia Ternifolia Seed Oil, Oryza Sativa (Rice) Bran Oil, Coco Caprylate/Caprates, Butylene Glycol, Butyrospermum Parkii (Shea Butter) Extract, Helianthus Annuus (Sunflower) Seed Oil Unsaponifiables, Hydroxystearic/Linolenic/Oleic Polyglycerides, Cetearyl Alcohol, Behenyl Alcohol, Arachidyl Alcohol, Dimethicone, Coco Glucoside, Mel/Honey, Parfum/Fragrance, Tocopherol, Argania Spinosa (Argan) Kernel Oil, Capryloyl Glycine, Sunflower Oil/Palm Oil Aminopropanediol Esters, Tocopheryl Acetate, Arachidyl Glucoside,	

	Hydroxyethyl Acrylate/Sodium Acryloyldimethyl Taurate Copolymer, Sodium Hydroxide, Citric Acid, Ethylhexylglycerin, Dimethicone Crosspolymer, Hordeum Vulgare Cera/Spent Grain Wax, Carbomer, Dehydroacetic Acid, Tetrasodium Glutamate Diacetate, Glycine Soja (Soybean) Oil, 10 Hydroxydecanoic Acid, Sebacic Acid, 10 Decanediol, Polysorbate 60, Sorbitan Isostearate, Solanum Lycopersicum (tomato) Fruit/Leaf/Stem Extract, Beta Carotene, Daucus Carota Sativa (Carrot) Root Extract, Caprylic/Capric Triglyceride, Glyceryl Distearate, Polysorbate 80, Linalool, Limonene, Benzyl Salicylate, Citronellol, Farnesol, Coumarin, Citral.	
<u>10</u>	Afrodita nočna krema Aqua, Helianthus Annuus Seed Oil, Isopropyl Palmitate, Cera Alba, Polyglyceryl-2 Dipolyhydroxystearate, Polyglyceryl-3 Diisostearate, Butyrospermum Parkii Butter, Argania Spinosa Kernel Oil , Simmondsia Chinensis Seed Oil, Tocopheryl Acetate, Glycerin, Zinc Stearate, Magnesium Sulfate, Hydrogenated Castor Oil, Allantoin, Retinyl Palmitate, Caprylic/Capric Triglyceride, Tocopherol, Parfum, Dehydroacetic Acid, Benzyl Alcohol, Propylene Glycol, BHT, Ascorbyl Palmitate, Glyceryl Stearate, Citric Acid	

<u>11</u>	Biobaza Aqua, Ozonized Argania Spinosa Oil, Helianthus Annuus (Sunflower) Seed Oil, Bityrospermum Parkii (Shea Butter) Fruit, Sorbitol, Cetearyl Isononanoate (And) Cetareth-20 (And) Cetearyl Alcohol (And) Glyceryl Stearate (And) Glycerin (And) Cetareth-12 (And) Cetyl Palmitate, Carbomer, Caprylyl Glycol, Sodium Hydroxide	
<u>12</u>	Dr Scheller Aqua (Water), Glycerin, Prunus Armeniaca (Apricot) Kernel Oil*, Helianthus Annuus (Sunflower) Seed Oil*, Glycine Soja (Soybean) Oil*, Hydrogenated Coconut Oil, Decyl Oleate, Glyceryl Stearate Citrate, Cetearyl Alcohol, Caprylic/Capric Triglyceride, Squalane, Cetearyl Glucoside, Argania Spinosa Kernel Oil, Amaranthus Caudatus Seed Extract, Mauritia Flexuosa Fruit Oil*, Spilanthes Acmella Flower Extract, Sodium Hyaluronate, Tocopherol, Palmitic Acid, Stearic Acid, Parfum (Fragrance), Lecithin, Xanthan Gum, Benzyl Alcohol, Sodium Benzoate, Potassium Sorbate, Alcohol, Ascorbyl Palmitate, Ascorbic Acid, Citric Acid, Parfum (Fragrance), Limonene**, Citral**, Linalool**, Geraniol**, Citronellol**, Coumarin**, Rosmarinus Officinalis (Rosemary) Leaf Extract. * sestavine iz certificiranega organskega kmetijstva ** iz naravnih esencialnih olj	

4. EKSPERIMENTALNI DEL

4.1. PRIPRAVA STANDARDOV V CIKLOHEKSANU

Pripravili smo dve referenčni raztopini. Prva je bila raztopina skvalena v cikloheksanu, druga pa raztopina α -tokoferola v cikloheksanu. Prvo raztopino smo pripravili tako, da smo v 100 mL merilno bučko natehtali 1 mg skvalena in nato dopolnili bučko s cikloheksanom do oznake. Drugo raztopino smo pripravili tako, da smo v 100 mL merilno bučko natehtali 1 mg α -tokoferola ter nato dopolnili bučko s cikloheksanom do oznake. Bučko smo zamašili in vsebino premešali. Nato smo odpipetirali 700 μ L vsake raztopine v viali, ki smo ju analizirali z GC.

4.2. PRIPRAVA VZORCEV ARGANOVEGA OLJA

4.2.1. PRIPRAVA VZORCA ARGANOVEGA OLJA V METANOLU IN n-HEKSANU

V prvo falkonko smo natehtali 4,20 mg in v drugo 4,52 mg arganovega olja. V prvo falkonko smo dodali 5,25 mL n-heksana in 5,25 mL metanola, v drugo pa 5,65 mL n-heksana in 5,65 mL metanola. Koncentracija v obeh falkonkah je bila tako 0,40 mg/mL. Falkonki smo stresali na stresalniku 10 min pri 560 obratih/min. Nato smo ju dali v UZ kadičko za 10 min. Po tem smo ju centrifugirali 15 min pri 2000 obratih/min.

4.2.2. PRIPRAVA VZORCEV ARGANOVEGA OLJA V CIKLOHEKSANU

V štiri mikrocentrifugirke smo natehtali po 20 mg vseh 4 arganovih olj (**1**, **2**, **3**, **4**). Nato smo dodali 1 mL cikloheksana s skvalenom, tako da je bila končna koncentracija v mikrocentrifugirki 20 mg/mL. Mikrocentrifugirke smo za 1 min premešali z mešalnikom vorteksom in centrifugirali 15 min pri 12 000 obratih/min. Iz mikrocentrifugirk smo nato odpipetirali 700 μ L raztopine v vial, ki smo jih analizirali z metodo GC.

4.3. PRIPRAVA VZORCEV KREM

4.3.1. PRIPRAVA VZORCEV KREM V METANOLU

4.3.1.1. *Prvi poskus priprave vzorcev krem*

V 5 falkonk smo približno natančno natehtali od 5 do 6 mg vzorcev 5 različnih krem (5, 6, 8, 11, 12). Kremiti smo nato dodali 2,5 mL do 3 mL metanola kot topila, da je bila koncentracija točno 2 mg/mL. Falkonke smo pretresli, ker se krema v nobeni falkonki ni raztopila, smo jih dali v UZ kadičko za 10 min. Po 10 min v UZ kadički ni bilo vidnih sprememb, v smislu, da bi se krema bolje raztopila. Zato smo falkonke dali na stresalnik za 10 min pri 640 obratih/min. Sicer se celotna krema še zmeraj ni raztopila, vendar smo kljub temu dali falkonke v centrifugo za 15 min na 5000 obratov/min. Po končanem centrifugiranju smo iz falkonk v vialo odpipetirali 700 µL supernatanta in ga analizirali s HPLC.

4.3.1.2. *Priprava vzorca kreme z višjo koncentracijo*

Za drugi poskus priprave raztopine krem v metanolu smo se odločili povečati koncentracijo kreme (6) in nato smo opazovali, koliko kreme se raztopi ter ali so kromatogrami sorazmerni s povečano koncentracijo. V prvo mikrocentrifugirko smo natehtali 10 mg kreme, v drugo mikrocentrifugirko 15 mg kreme, v tretjo mikrocentrifugirko 20 mg kreme, v četrto mikrocentrifugirko 30 mg kreme, v peto mikrocentrifugirko 50 mg kreme in v šesto mikrocentrifugirko 100 mg kreme. V vsako mikrocentrifugirko smo dodali 1 mL metanola. Tako smo imeli vzorce s koncentracijami 10 mg/mL, 15 mg/mL, 20 mg/mL, 30 mg/mL, 50 mg/mL in 100 mg/mL. Vsebinsko smo za 1 min premešali z vorteks mešalnikom in nato centrifugirali 15 min pri 12 000 obratih/min. Iz mikrocentrifugirk smo odpipetirali 700 µL v vialo in tako pripravljene vzorce analizirali s HPLC.

4.3.2. PRIPRAVA VZORCA KREME V ACETONITRILU

V falkonko smo natehtali 10 mg kreme (2) in dodali 5 mL acetonitrila, tako da je bila koncentracija vzorca 2 mg/mL. Falkonko smo dali v UZ kadičko za 10 min in na stresalnik za 10 min pri 540 obratih/min. Vzorec smo prefiltrirali skozi 0,45 µm filter in analizirali s HPLC.

4.3.3. PRIPRAVA VZORCEV KREM V METANOLU IN n-HEKSANU

V 5 falkonk smo natehtali 20 mg vzorcev 5 različnih krem (5, 6, 8, 11, 12). V vsako falkonko smo nato dodali 5 mL n-heksana in 5 mL metanola, tako da so bile koncentracije krem 2 mg/mL. Dve topili smo uporabili zato, da bi ločili hidrofilne komponente, ki bi se raztopile v metanolu in lipofilne komponente kreme, ki bi se raztopile v n-heksanu. Namesto cikloheksana smo uporabili n-heksan zaradi večje razlike v gostoti med n-heksanom in metanolom. Vseh 6 falkonk smo stresali na stresalniku 10 min pri 560 obratih/min. Nato smo jih dali v UZ kadičko za 10 min. Po tem smo jih centrifugirali 15 min pri 2000 obratih/min.

4.3.4. PRIPRAVA VZORCEV KREM V METANOLU, DESTILIRANI VODI IN n-HEKSANU

V 5 falkonk smo v vsako natehtali 10 mg iste kreme (12). V prvo falkonko smo nato dodali 4,9 mL metanola in 0,1 mL destilirane vode, v drugo falkonko 4,8 mL metanola in 0,2 mL destilirane vode, v tretjo falkonko 4,7 mL metanola in 0,3 mL destilirane vode, v četrto falkonko 4,6 mL metanola in 0,4 mL destilirane vode ter v peto falkonko 4,5 mL metanola in 0,5 mL destilirane vode. V šesto falkonko smo poleg 10 mg kreme dodali 5 mL metanola brez vode. V vsako falkonko smo nato dodali še 5 mL n-heksana. Ker je bila raztopina kreme najbolj bistra v tretji falkonki, smo v sedmo falkonko zatehtali 10 mg kreme 11 in v osmo falkonko 10 mg kreme 8. V vsako od obeh falkonk smo dodali 4,7 mL metanola, 0,3 mL destilirane vode in 5 mL n-heksana. Vse falkonke smo dali na UZ kadičko za 10 min in stresali na stresalniku 10 min pri 560 obratih/min. Nato smo vse falkonke centrifugirali za 15 min pri 2000 obratih/min.

4.3.5. PRIPRAVA VZORCEV KREM V CIKLOHEKSANU

4.3.5.1. Priprava vzorcev krem z začetno koncentracijo

V 8 mikrocentrifugirk smo natehtali 25 mg 8 različnih krem (5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12). V vseh 8 mikrocentrifugirk smo dodali 1 mL že prej pripravljene raztopine cikloheksana s skvalenom. Koncentracija krem je bila tako 25 mg/mL. Skvalen smo izbrali za naš interni standard. Vse mikrocentrifugirke smo nato vsako posebej premešali z vorteksom za 1 min, nato pa smo jih centrifugirali 15 min pri 12 000 obratih/min. Iz mikrocentrifugirk smo nato odpipetirali 700 µL v viala in jih analizirali z GC.

4.3.5.2. Priprava vzorcev krem z višjo koncentracijo

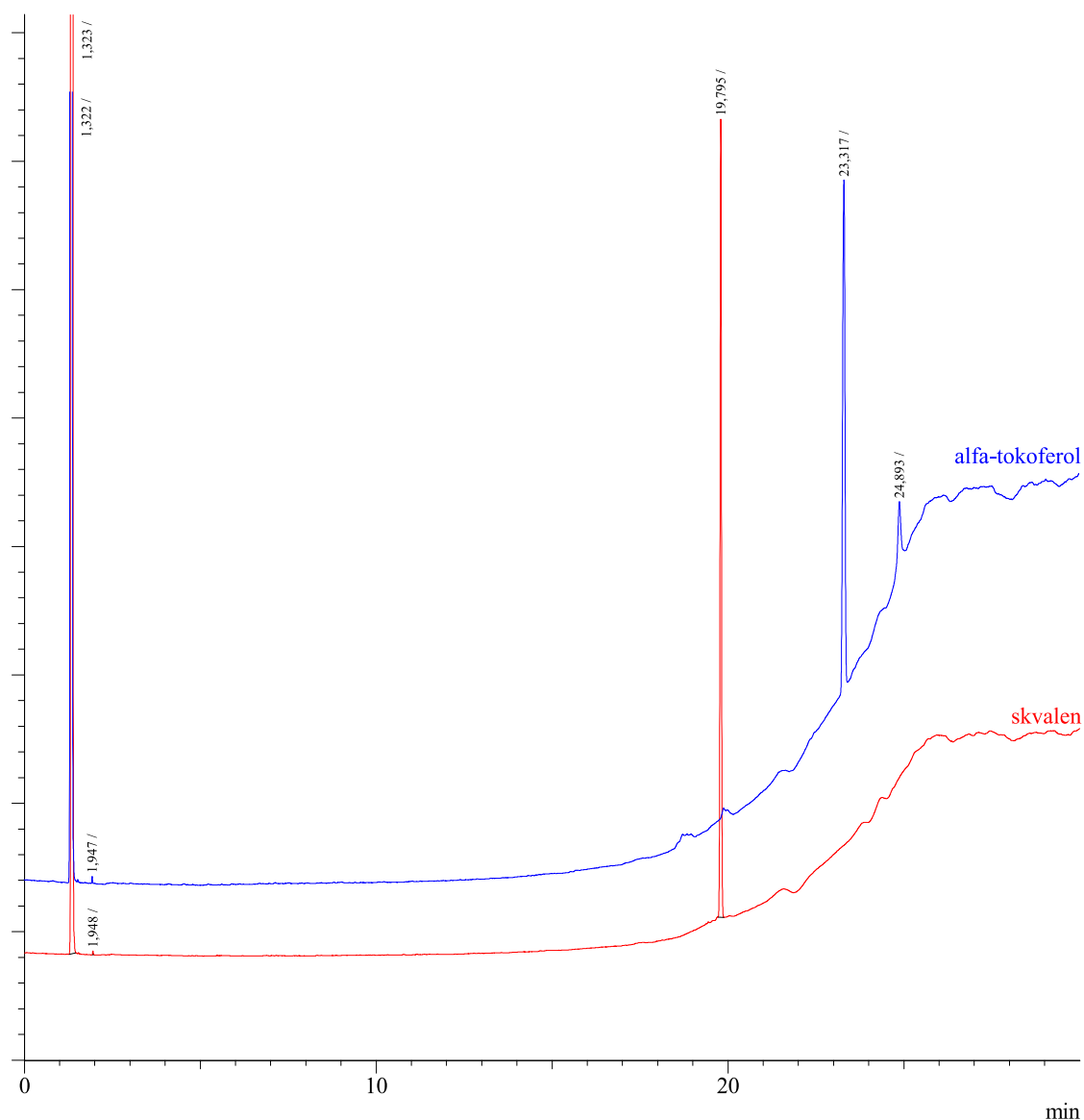
Za drugi poskus priprave krem s cikloheksanom smo se odločili povečevati koncentracijo kreme (6) in nato smo opazovali kaj se dogaja v mikrocentrifugirkah, koliko kreme se raztopi ter ali so kromatogrami sorazmerni s povečano koncentracijo. V mikrocentrifugirko 1 smo natehtali 10 mg kreme, v mikrocentrifugirko 2 15 mg kreme, v mikrocentrifugirko 3 20 mg kreme, v mikrocentrifugirko 4 30 mg kreme, mikrocentrifugirko 5 50 mg kreme in mikrocentrifugirko 6 100 mg kreme. V vsako mikrocentrifugirko smo dodali 1 mL cikloheksana. Mikrocentrifugirke smo za 1 min premešali z vorteksom in jih nato centrifugirali 15 min pri 12 000 obratih/min. Iz mikrocentrifugirk smo odpipetirali 700 μ L v viala in jih analizirali z GC.

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

Namen naših analiz in raziskav je bil razvoj hitre in enostavne metode za določanje vsebnosti arganovega olja v kremah za obraz. Zato smo izbrali vzorce krem različnih proizvajalcev, da bi jih lahko primerjali med seboj. Za standard smo uporabili skvalen v cikloheksanu in izbrali 4 arganova olja različnih proizvajalcev. Kreme smo želeli analizirati s hitro in enostavno metodo, zato smo preizkusili metodi HPLC in GC.

5.1. ANALIZA STANDARDOV V CIKLOHEKSANU

Ker smo se želeli prepričati, da je naša metoda ustrezna, smo se odločili v raztopino krem dodati spojino, ki je v arganovem olju prisotna v večji koncentraciji, ter spojino, ki je prisotna v zelo majhni koncentraciji. Tako smo pripravili dve raztopini. Prva je bila skvalen v cikloheksanu, druga pa α -tokoferol v cikloheksanu. Obe raztopini smo analizirali z GC, rezultat analize je podan na kromatogramu na sliki 7.



Slika 7: Kromatogram raztopine skvalena v cikloheksanu (rdeče) in kromatogram raztopine α -tokoferola v cikloheksanu (modro) (GC)

Retencijska časa α -tokoferola in skvalena, ki smo ju dobili z GC tako pripravljenih raztopin, bosta služila za preverjanje naše metode analize vzorcev krem. V kromatogramu raztopine α -tokoferola v cikloheksanu ima vrh α -tokoferola retencijski čas 23,317 min. Če bomo ta vrh videli tudi na kromatogramih vzorcev krem, raztopljenih v raztopini cikloheksana z α -tokoferolom bo to pomenilo, da je naša metoda ustrezna.

V kromatogramu raztopine skvalena v cikloheksanu ima vrh skvalena retencijski čas 19,795 min. Če bomo ta vrh videli tudi na kromatogramih vzorcev krem, ki jih bomo raztopili v raztopini cikloheksana s skvalenom, bo to pomenilo, da je naša metoda ustrezna.

5.2. ANALIZA VZORCA ARGANOVEGA OLJA V CIKLOHEKSANU

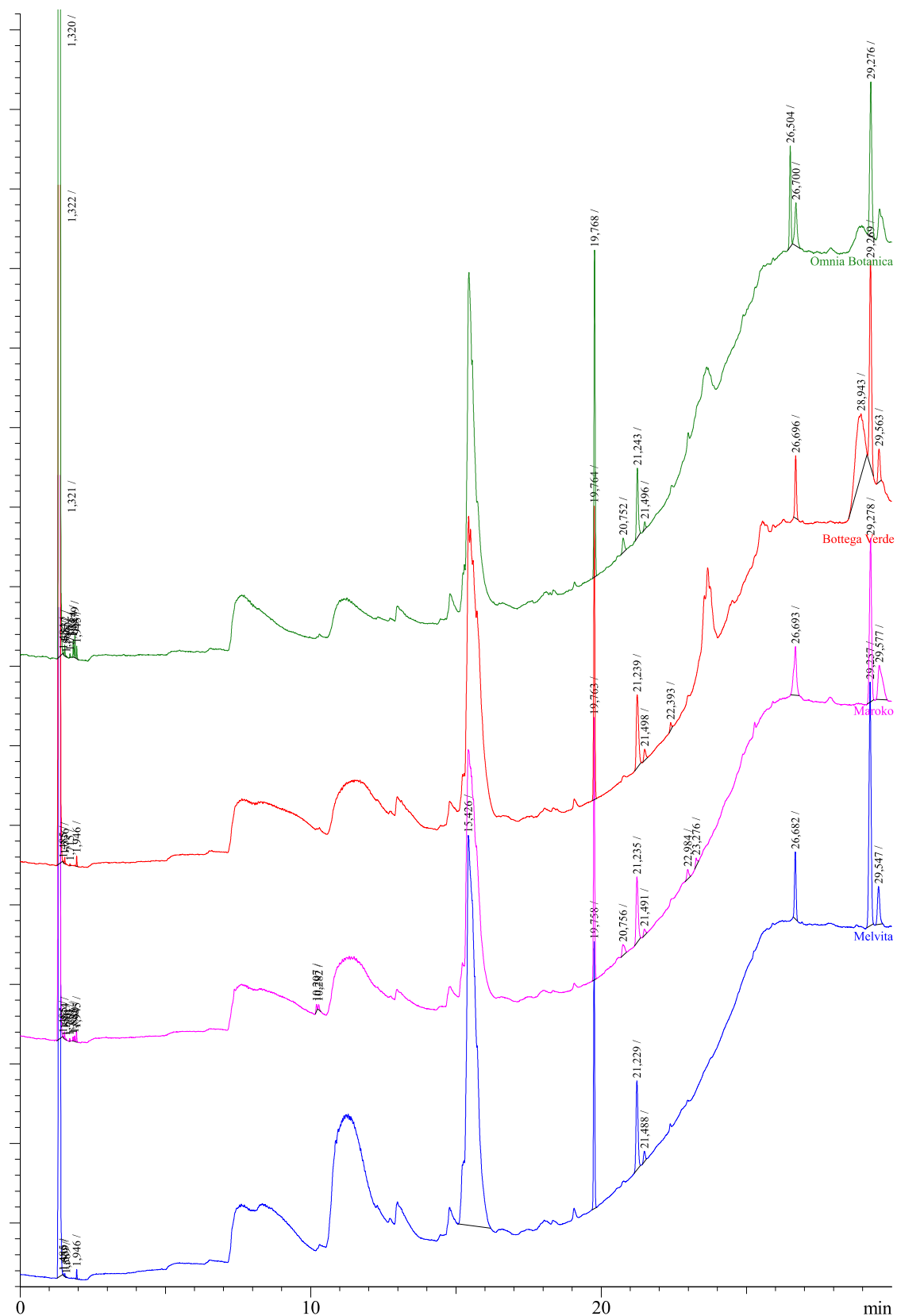
5.2.1. Vizualna analiza

Kupljena arganova olja so se med seboj razlikovala po barvi in vonju. Arganovo olje Omnie Botanice je bilo svetlo rumene barve, arganova olja Melvite in Bottega Verde sta bila rumene barve, medtem ko je bilo arganovo olje, prineseno iz Maroka oranžne barve. Prav tako je imelo arganovo olje iz Maroka najbolj intenziven vonj po arašidih, torej lahko predvidevamo, da je bilo stiskano iz praženih semen. Ker so si bila olja na pogled in po vonju tako različna, čeprav naj bi šlo za enako olje, nas je zanimalo, ali se razlikujejo tudi v sestavi.

5.2.2. Analiza sestave

Slika 8 prikazuje kromatogram arganovih olj v cikloheksana s standardom skvalenom, s katerim smo primerjali kromatograme analiziranih krem.

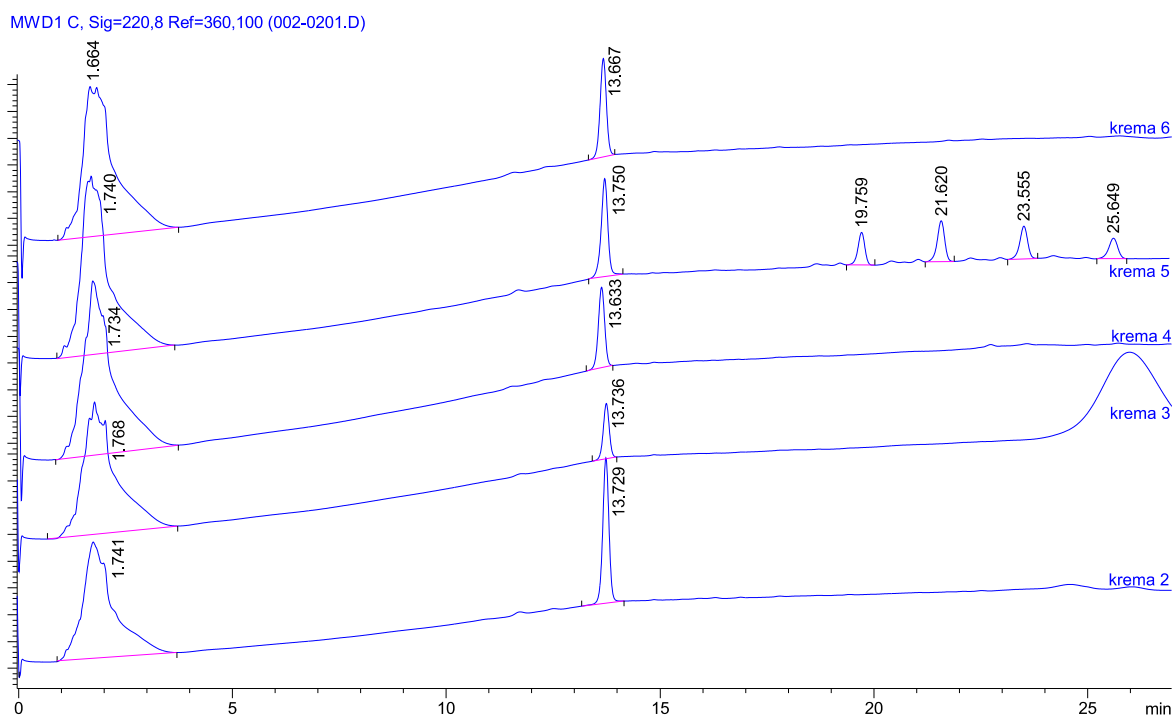
Na kromatogramih arganovih olj opazimo, da so vrhovi enaki tako v retencijskih časih kot tudi pod površino pod vrhovi. Torej je sestava olj enaka kljub njihovem različnemu videzu.



5.3. ANALIZA VZORCEV KREM

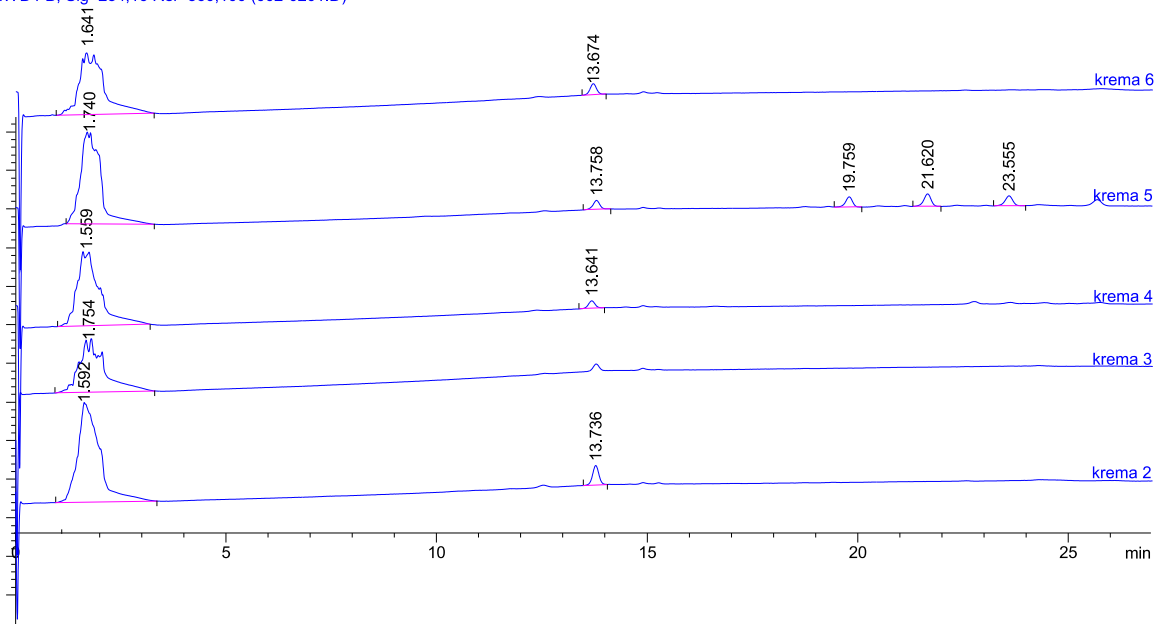
5.3.1. ANALIZA VZORCEV KREM V METANOLU

Za analizo vzorcev pri metodi HPLC smo kot polarno organsko topilo izbrali metanol, zaradi katerega naj bi se analiti krajši čas zadrževali v stacionarni fazi in tako imeli krajše retencijske čase. Vzorce različnih krem smo tako poskušali raztopiti v metanolu. Z optimizacijo raztapljanja smo falkonke s kremami in topilom dali tudi v UZ kadičko in stresalnik. Kljub temu se celotna krema ni raztopila, kar je razumljivo, saj je metanol hidrofilno topilo, večina sestavin krem pa je lipofilnega izvora. Na kromatogramih slik 9, 10 in 11 so prikazani rezultati, ki smo jih dobili.



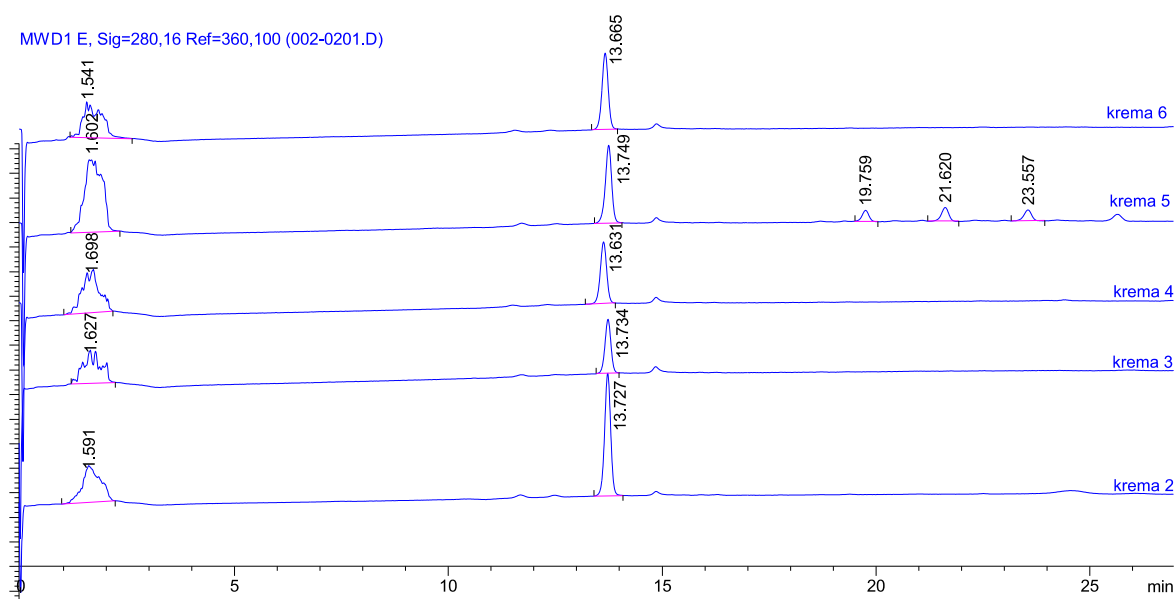
Slika 9: Kromatogrami vzorcev krem 2, 3, 4, 5, 6 v metanolu (HPLC, $\lambda = 220$ nm)

MWD1 B, Sig=254,16 Ref=360,100 (002-0201.D)



Slika 10: Kromatogrami vzorcev krem 2, 3, 4, 5, 6 v metanolu (HPLC, $\lambda = 254$ nm)

MWD1 E, Sig=280,16 Ref=360,100 (002-0201.D)

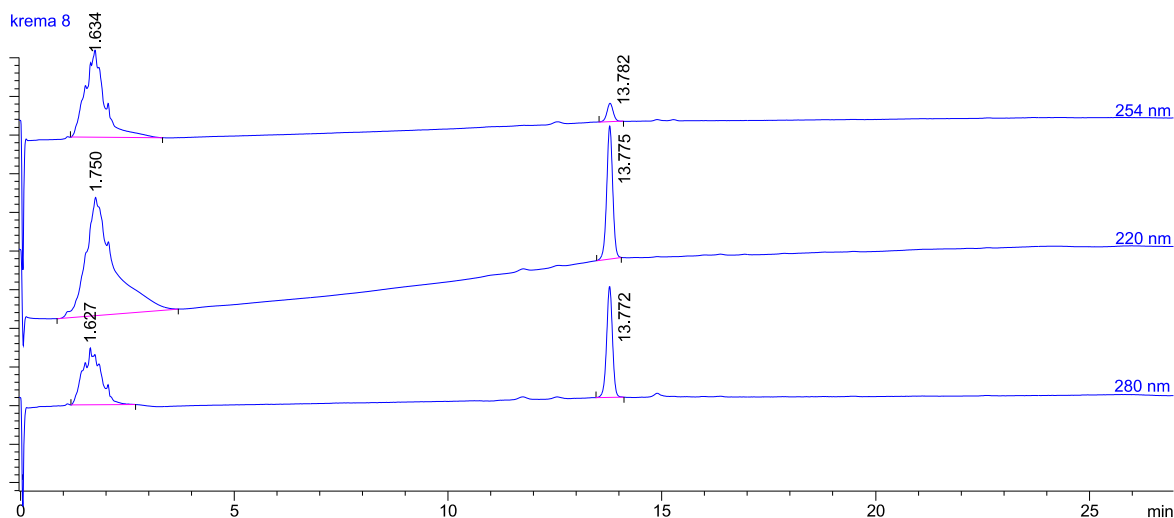


Slika 11: Kromatogrami vzorcev krem 2, 3, 4, 5, 6 v metanolu (HPLC, $\lambda = 280$ nm)

Kakor je razvidno iz kromatogramov, je ločba komponent kreme slaba. Število vrhov je majhno, kljub temu da je spojina v kremi veliko. Prav tako se na začetku eluira več spojin hkrati, kar je neustrezno. Ker so vrhovi majhni, smo se odločili povečati koncentracijo kreme v topilu.

5.3.2. ANALIZA VZORCA KREME V ACETONITRILU

Želeli smo ugotoviti obnašanje kreme (**8**) v še kakšnem drugem organskem topilu kot je metanol. Tudi iz kromatograma vzorca kreme v acetonitrilu je razvidna slaba ločba komponent kreme (slika 12). Pojavita se namreč le dva vrha, kljub temu, da je v kremi več spojin. Tako kot pri metanolu, se tudi pri acetonitrilu na začetku eluira več spojin hkrati, kar je neustrezno. Verjetno pa ni problem v ločbi, temveč v tem, da nimamo ustreznih snovi (z UV kromofori), ki bi dale lepe vrhove pri reverzno faznem HPLC-ju.



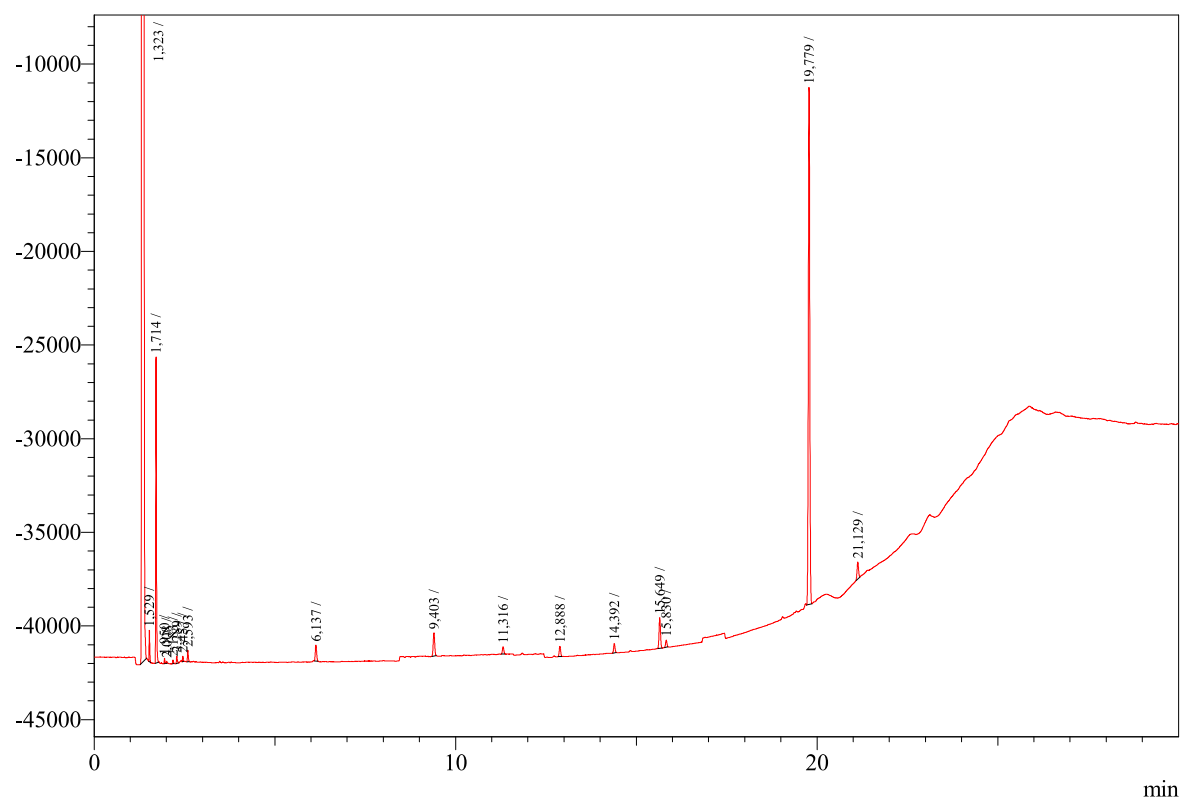
Slika 12: Kromatogram vzorca kreme **8**, raztopljene v acetonitrilu (HPLC; $\lambda = 220 \text{ nm}, 254 \text{ nm}, 280 \text{ nm}$)

5.3.3. ANALIZA VZORCEV KREM V METANOLU IN n-HEKSANU

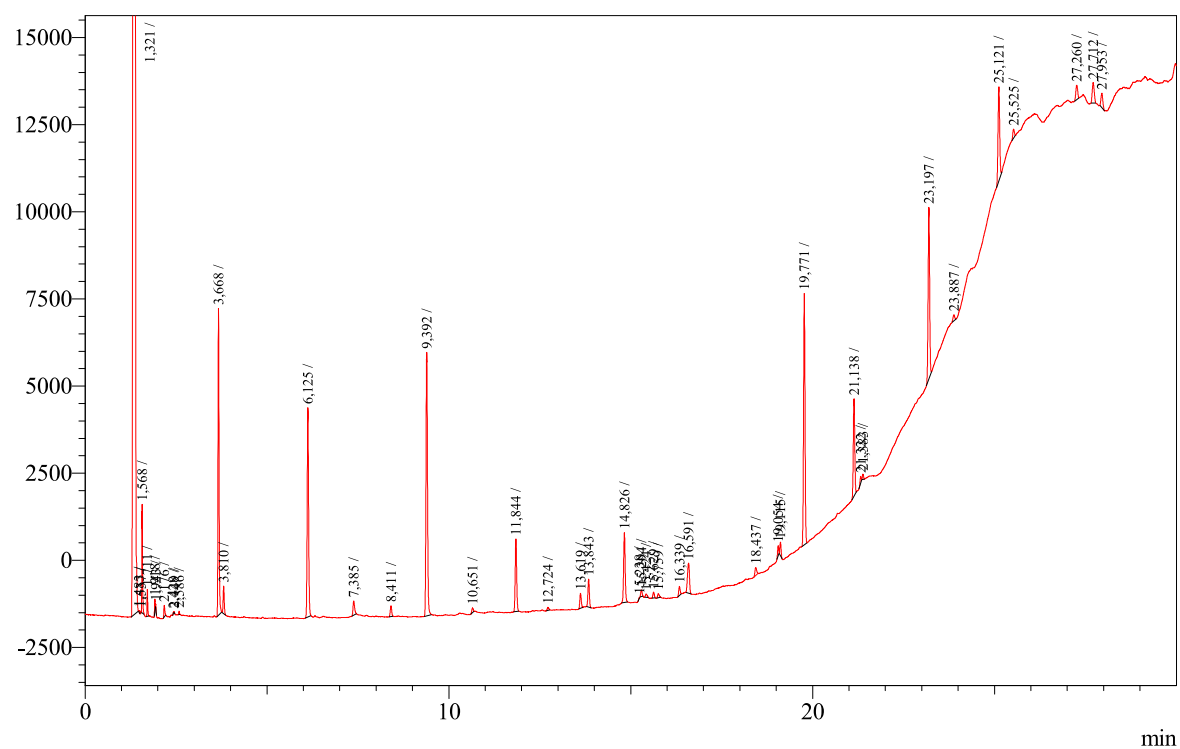
Zaradi slabega raztapljanja kreme v metanolu oz. acetonitrilu, smo se hidrofilnemu topilu odločili dodati še lipofilno topilo, da bi se hidrofilne komponente raztopile v hidrofilnem topilu in lipofilne komponente v lipofilnem topilu. Odločali smo se med dvema lipofilnima topiloma: cikloheksanom in n-heksanom. Odločili smo se za n-heksan zaradi večje razlike v gostoti med n-heksanom in metanolom kot cikloheksanom in metanolom. Metanol in n-heksan se ne mešata, kar smo tudi preverili. V falkonko smo odmerili enako količino n-heksana in metanola ter falkonko pretresli. Hitro se je vzpostavilo ravnovesje in ugotovili smo, da se res ne mešata, saj sta bila v falkonki ista volumna topil kot na začetku. Pri dodatku kreme v mešanico n-heksana in metanola pa smo opazili, da krema spremeni obnašanje topil. Razmerje 5:5 (V/V) se spremeni pri nekaterih kremah v 8:2 (V/V), pri nekaterih pa v 8,5:1,5 (V/V). Kot poizkus ali je v n-heksanu kaj ostanka metanola in obratno, smo iz spodnje in zgornje plasti odpipetirali 1 mL raztopine v mikrocentrifugirko in vsaki dodali po 1 mL destilirane vode. Opazili smo, da se voda v nobeni raztopini ne meša popolnoma, kljub temu da se metanol in voda mešata. Po dodatku vode sta namreč v obeh mikrocentrifugirkah nastali dve plasti. Prišli smo do ugotovitve, da je v spodnji plasti poleg n-heksana ostalo še malo metanola in da je v zgornji plasti poleg metanola ostalo še malo n-heksana.

5.3.4. ANALIZA VZORCEV KREM V CIKLOHEKSANU

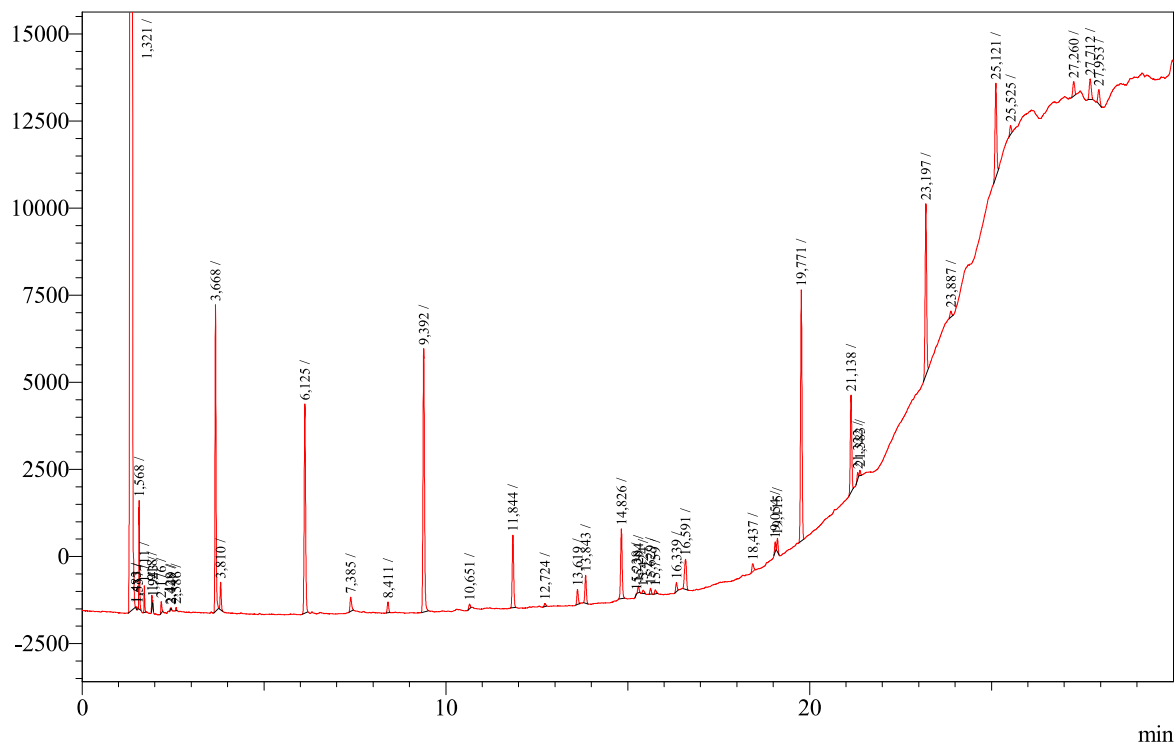
Za merjenje vzorcev krem z metodo GC smo kot topilo uporabili cikloheksan s skvalenom. Vrh skvalena nam je služil kot potrditev metode. Najprej smo pomerili vse kreme in uporabili koncentracijo 25 mg/mL. Opazili smo, da se kreme med seboj močno razlikujejo, saj je pri nekaterih kremah bilo veliko vrhov, pri nekaterih malo. Pri nekaterih kremah so bile koncentracije sestavin večje, druge manjše. Nato smo pomerili eno kremo v različnih koncentracijah in sicer 10 mg/mL, 15 mg/mL, 20 mg/mL, 30 mg/mL, 50 mg/mL in 100 mg/mL. Želeli smo namreč preveriti ali se površina pod krivuljo sorazmerno povečuje z naraščajočo koncentracijo. Ugotovili smo, da se površina pod krivuljo sorazmerno povečuje s koncentracijo. Na slikah 13-20 so prikazani kromatogrami vzorcev krem s koncentracijo 25 mg/mL.



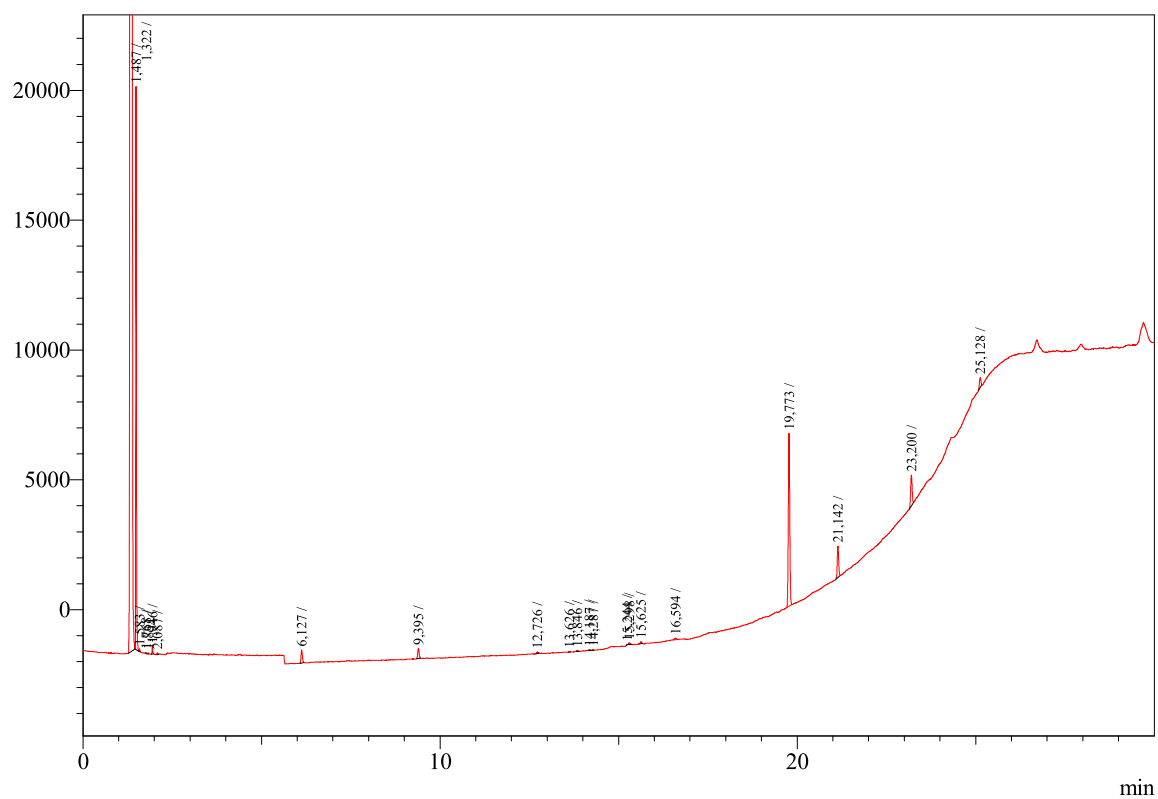
Slika 13: Kromatogram vzorca kreme 5 s standardom skvalena (GC)



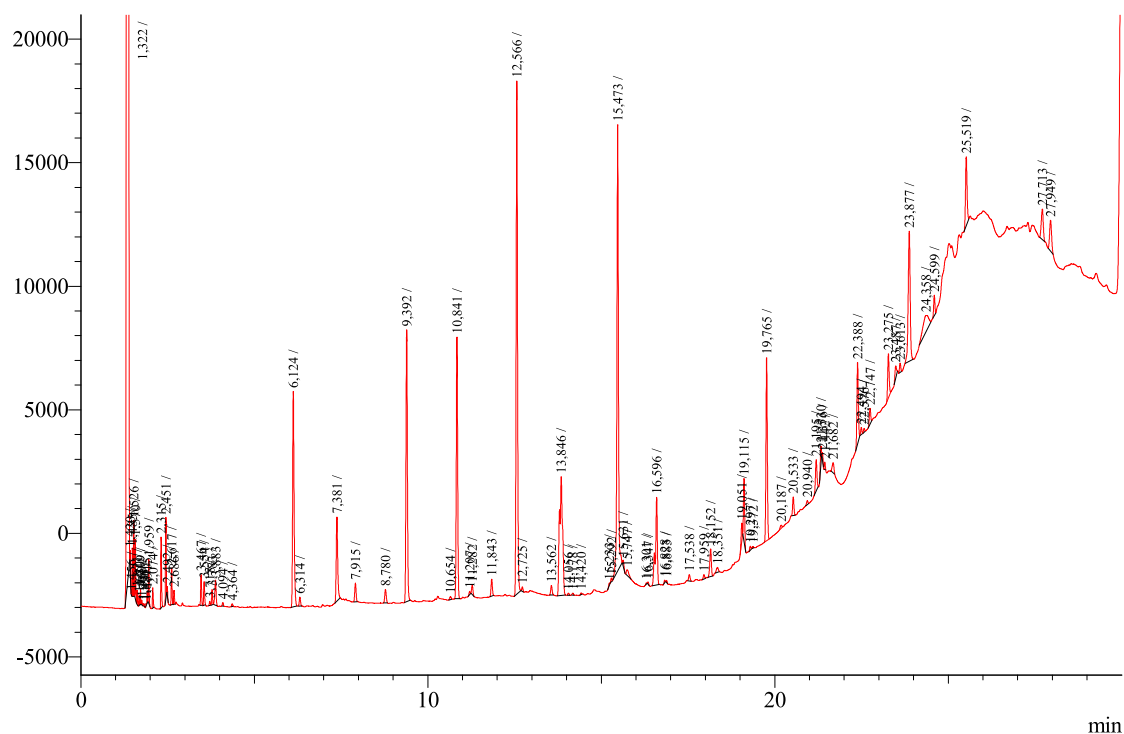
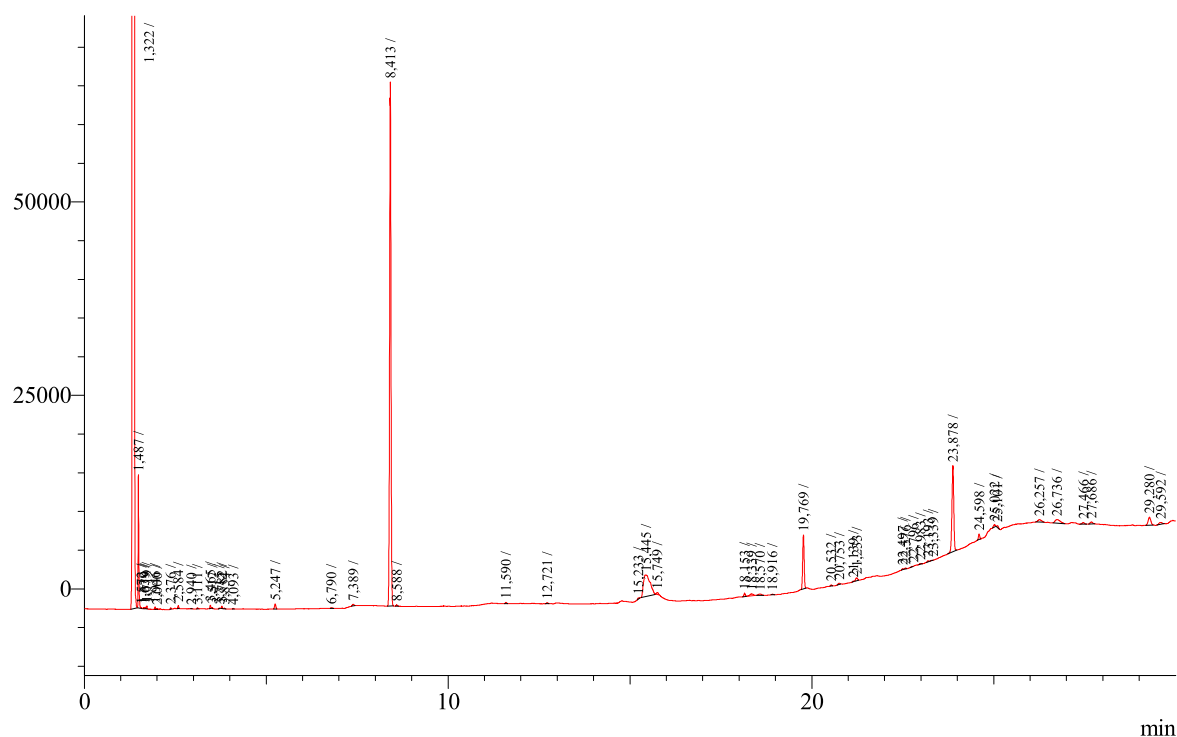
Slika 14: Kromatogram vzorca kreme 6 s standardom skvalena (GC)

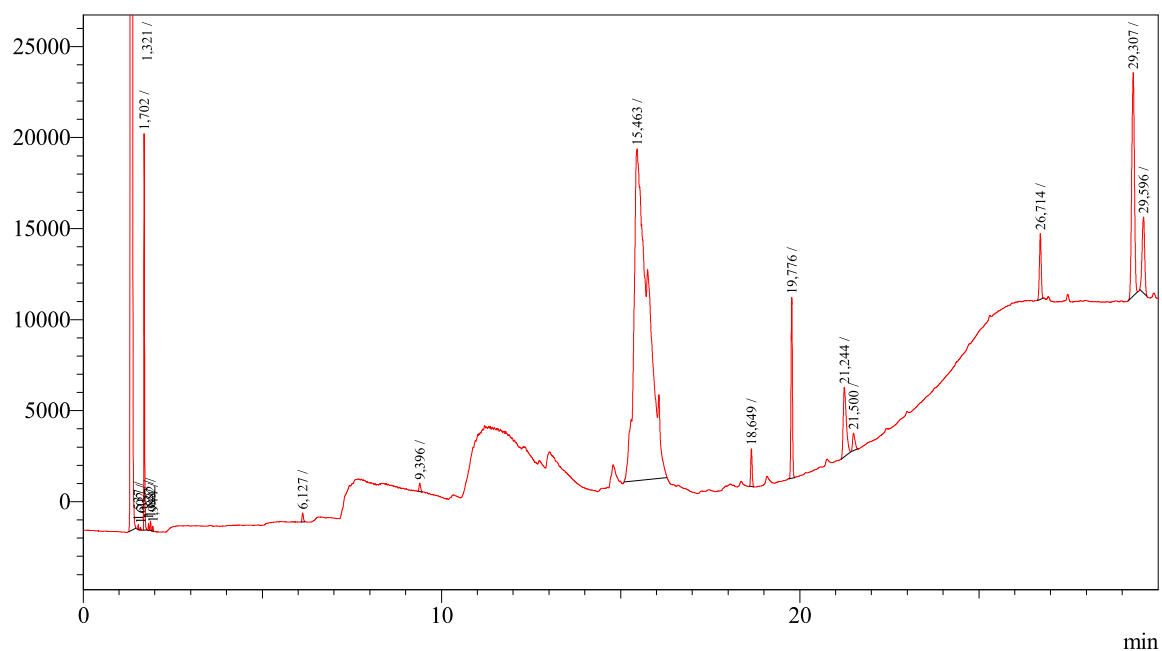


Slika 15: Kromatogram vzorca kreme 7 s standardom skvalena (GC)

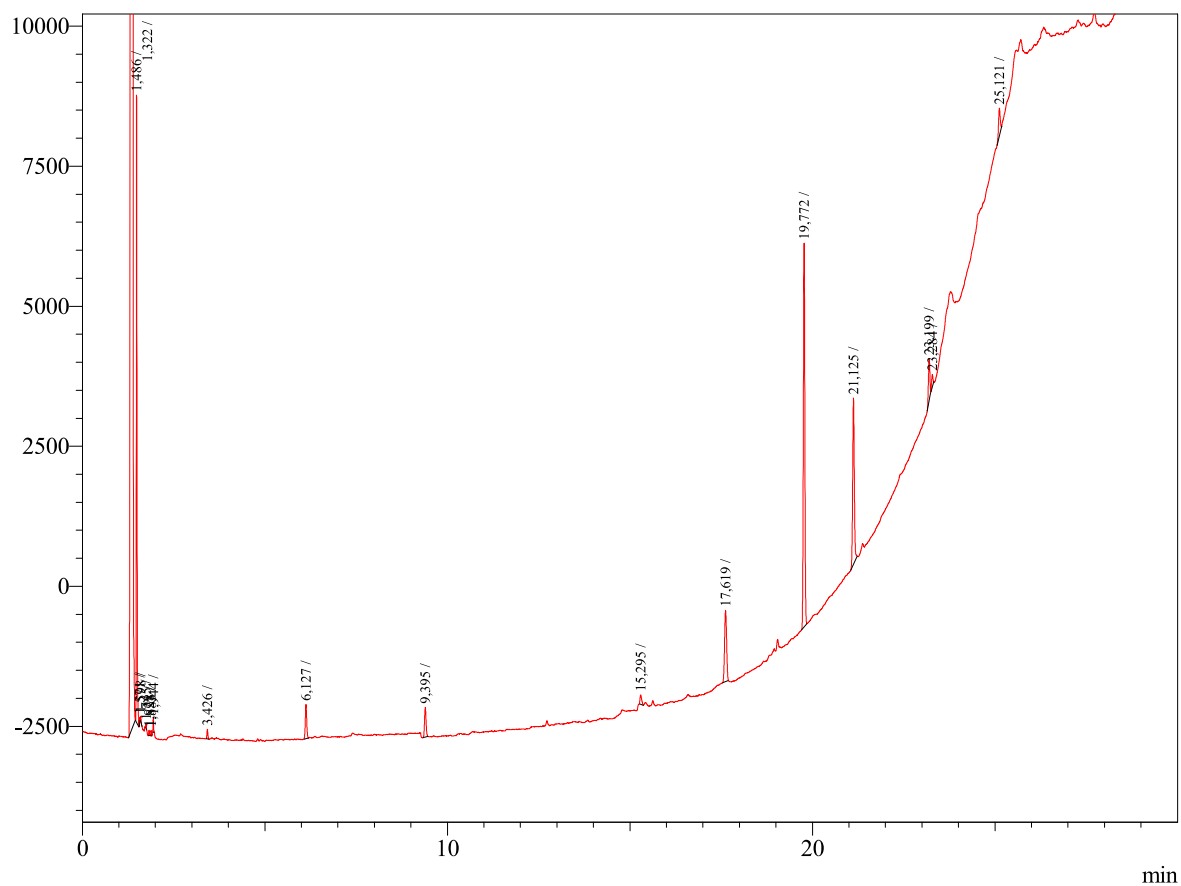


Slika 16: Kromatogram vzorca kreme 8 s standardom skvalena (GC)

Slika 17: Kromatogram vzorca kreme 9 s standardom skvalena (GC)



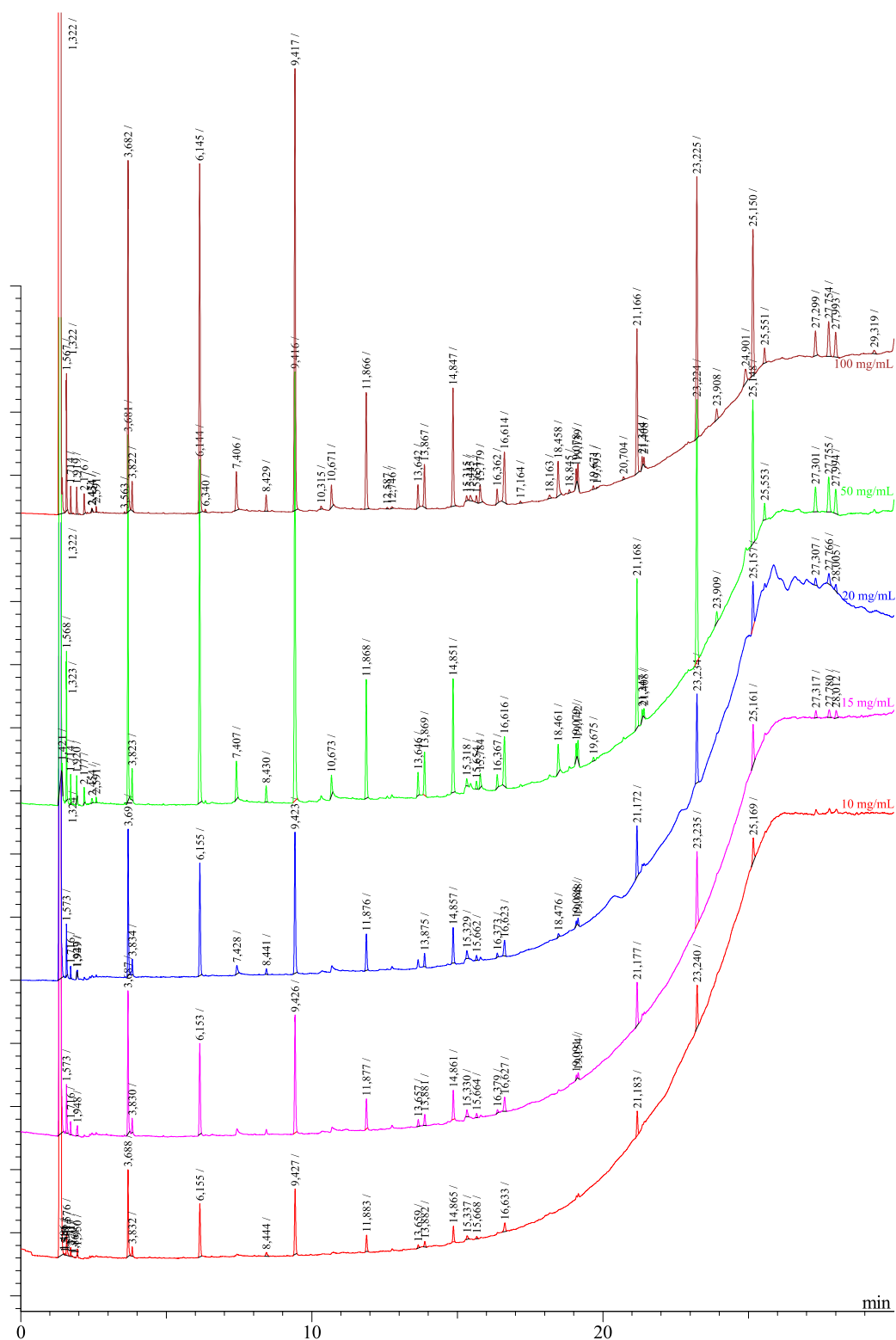
Slika 19: Kromatogram vzorca kreme 11 s standardom skvalena (GC)



Slika 20: Kromatogram vzorca kreme 12 s standardom skvalena (GC)

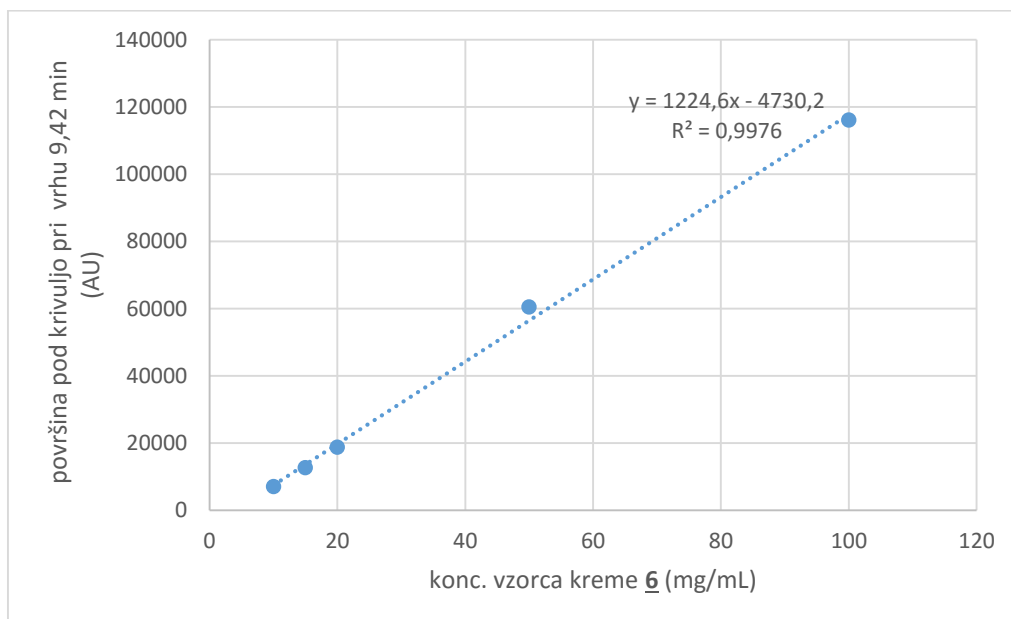
Kot je razvidno iz kromatogramov, so si kreme po sestavinah zelo različne. Na vsakem grafu opazimo vrh skvalena, ki smo ga namenoma vnesli v vzorec. Vendar pa ne moremo z gotovostjo trditi, kateri signali pripadajo arganovemu olju. Manjkajo nam standardi in ne poznamo specifičnega označevalca, ki se nahaja samo v arganovem olju in ne v drugih cenejših nadomestkih olj. Zato takšna hitra in enostavna metoda za določanje vsebnosti arganovega olja v kremah brez predhodne derivatizacije vzorcev ni ustrezna.

Na sliki 21 je prikazan kromatogram kreme (6) z višanjem koncentracije.



Slika 21: Kromatogram vzorca kreme 6 s koncentracijami 10 mg/mL (rdeča), 15 mg/mL (rožnata), 20 mg/mL (modra), 50 mg/mL (zelena), 100 mg/mL (rjava) (GC)

Pri kromatogramih z višanjem koncentracije kreme se vrhovi večajo, zato je naša metoda ustrezna.



Slika 22: Koncentracija vzorca kreme 6 v odvisnosti od površine pod krivuljo pri vrhu 9,42 min

Slika 22 prikazuje linearno odvisen odziv od koncentracije vzorca, zaradi česar je naša analizna metoda linearna. O linearnosti lahko govorimo tudi zato, ker je vrednost Pearsonovega koeficienta korelacije dovolj visoka ($R^2 = 0,9976$).

6. SKLEP

Poskušali smo postaviti hitro in enostavno metodo za določanje vsebnosti arganovega olja v kremah za obraz. Preizkusili smo dve različni kromatografski metodi (HPLC in GC).

- Ugotovili smo, da ima HPLC metoda nizko ločljivost za vzorce olj in krem. V vzorcih nismo uspeli ločiti posameznih komponent, ali pa jih sploh nismo zaznali, saj smo imeli na voljo le UV-VIS detektor. Za uspešno analizo vzorcev olj in krem bi potrebovali masni detektor, saj precej komponent ne absorbira svetlobe v območju UV-VIS detektorja.
- Z metodo GC s FID detektorjem smo dosegli boljšo ločljivost. S preizkušanjem različnih mešanic topil (metanol, destilirana voda, n-heksan, cikloheksan), smo izbrali cikloheksan, v katerem se je krema optimalno raztopila. Ločljivost metode GC se je izkazala za dobro, kljub pretežno polarnim in težko hlapnim komponentam arganovega olja, ki smo jih uspešno zaznali s FID detektorjem.
- Dokazali smo linearnost metode z odvisnostjo odziva od koncentracije vzorca. Primerjali smo površine pod vrhovi z retencijskim časom 9,42 min na kromatogramih vzorcev kreme **6** z višanjem koncentracije vzorcev (slika 22). Metoda GC je torej ustrezna, saj vrednosti meritev ležijo na premici, vrednost Pearsonovega koeficienta korelacije pa je visoka ($R^2 = 0,9976$).
- GC kromatogrami krem so nam prikazali raznovrstno sestavo le teh, nismo pa mogli natančno določiti kateri signali pripadajo arganovemu olju, torej posledično nismo mogli določiti njegove vsebnosti v kremah.
- Kozmetične kreme, ki v svoji sestavi vsebujejo množico raznovrstnih sestavin, med katerimi so številne tudi sestavljene in več spojin, kot v našem primeru arganovo olje, zahtevajo izredno sistematičen analizen pristop od spodaj navzgor in ne obratno. Z raziskavo smo potrdili, da ni enostavne analizne metode za kemijsko tako raznovrstne vzorce.

7. VIRI

- (1) Charrouf, Z. and Guillaume, D. (2011), Argan oil. *Alternative Medicine Review*, 275-279
- (2) Charrouf, Z. and Guillaume, D. (2008), Argan oil: Occurrence, composition and impact on human health. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 110: 632–636
- (3) <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/dockets/95s0316/95s-0316-rpt0255-05-Argan-Oil-vol174.pdf> (dostopano dne 16.7. 2016)
- (4) Charrouf, Z. and Guillaume, D. (2014), Argan oil, the 35-years-of-research product. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 116: 1316–1321.
- (5) Khallouki, F., Spiegelhalder, B., Bartsch, H., Owen, R. W. (2005), Secondary metabolites of the argan tree (Morocco) may have disease prevention properties. *African Journal of Biotechnology*, 4(5): 381-388
- (6) <http://www.thedermreview.com/argan-oil/> (dostopano dne 16. 7. 2016)
- (7) Kupiec Tom (2004), Quality-Control Analytical Methods: Gas Chromatography. *International Journal of Pharmaceutical Compounding*, 305-309
- (8) Fothergill, W. T. (1968), Gas Chromatography. *Technique. Proc R Soc Med.*, 525-528
- (9) http://chemwiki.ucdavis.edu/Core/Analytical_Chemistry/Instrumental_Analysis/Chromatography/Gas_Chromatography (dostopano dne 10. 7. 2016)
- (10) <http://teaching.shu.ac.uk/hwb/chemistry/tutorials/chrom/gaschrom.htm> (dostopano dne 10. 7. 2016)
- (11) Hinshaw, John W. (2005), The Flame Ionization Detector. *LCGC North America*, 1262-1272
- (12) [http://chemwiki.ucdavis.edu/core/Analytical_Chemistry/Instrumental_Analysis/Chromatography/V.Chromatography/C.High_Performance_Liquid_Chromatography_\(HPLC\)](http://chemwiki.ucdavis.edu/core/Analytical_Chemistry/Instrumental_Analysis/Chromatography/V.Chromatography/C.High_Performance_Liquid_Chromatography_(HPLC)) (dostopano dne 25. 7. 2016)
- (13) https://commons.wikimedia.org/wiki/File:HPLC_apparatus.svg (dostopano dne 2. 8. 2016)
- (14) <http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/ReversePhase/AmershamRPCManual.pdf> (dostopano dne 25. 7. 2016)
- (15) http://www.pallavchemicals.com/images/Tech_Center/Solvent%20Miscibility%20Chart.png (dostopano dne 12. 8. 2016)

- (16) Špile Marjeta (2013), Analiza za aromo pomembnih hlapnih spojin in maščobnokislinske sestave arganovega olja. Diplomsko delo. Ljubljana. Fakulteta za farmacijo, 44 str.