

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JULIJA JAKOPIN

DIPLOMSKA NALOGA

UNI KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, Maj 2014

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za farmacijo



JULIJA JAKOPIN

RAZVOJ IN VREDNOTENJE LOSJONA ZA TELO S SAPONINI

DEVELOPMENT AND EVALUATION OF BODY LOTION WITH SAPONIN

Ljubljana, Maj 2014

Raziskovalno delo je bilo opravljeno na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani pod vodstvom mentorja doc. dr. Damjana Janeša mag. farm. in somentorice doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar mag. farm. na Katedri za farmacevtsko tehnologijo.

Za to priložnost in podporo se posebno zahvaljujem obema mentorjema, prav tako za pomoč in usmerjanje pri pisanju naloge in tehničnim sodelavkam za odlično asistenco. Hvala tudi moji družini in fantu, za razumevanje, strpnost in moralno vzpodbudo pri mojem pisanju.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja doc. dr. Damjana Janeša, mag. farm. in somentorice doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar, mag. farm.

Podpis

VSEBINA

1	UVOD	1
1.1	Emulzije	1
1.2	Vrednotenje kozmetičnih izdelkov	2
1.2.1	Fizikalna stabilnost	2
1.2.2	Senzorične lastnosti	3
1.2.3	pH vrednost	3
1.2.4	Električna prevodnost	3
1.2.5	Reološke lastnosti	3
1.3	Saponini.....	5
1.3.1	Vloga saponinov v kozmetiki	5
1.3.2	Kemijske in fizikalne lastnosti saponinov	5
1.3.3	Študija združljivosti kvilaja saponinov	8
1.3.4	Biološka aktivnost in toksičnost saponinov	9
1.3.5	Viri saponinov	10
1.3.6	Ekstracija, rafinacija in izolacija saponinov	10
2	NAMEN DELA.....	12
3	MATERIALI IN METODE	13
3.1	Materiali	13
3.2	Aparature in oprema.....	15
3.3	Metode	15
3.3.1	Izbor formulacij po smernicah za naravno kozmetiko... Napaka! Zaznamek ni definiran.	
3.3.2	Vrednotenje fizikalne stabilnosti losjona	15
3.3.3	Vrednotenje fizikalno-kemijskih parametrov losjona Napaka! Zaznamek ni definiran.	
4	EKSPERIMENTALNI DEL	18
4.1	Sestava in izdelava formulacij	18
4.2	Vrednotenje senzoričnih lastnosti losjona	20
4.3	Vrednotenje fizikalne stabilnosti losjona	Napaka! Zaznamek ni definiran.
4.3.1	Centrifugiranje	Napaka! Zaznamek ni definiran.
4.3.2	Ciklični test	Napaka! Zaznamek ni definiran.
4.4	Vrednotenje fizikalno-kemijskih lastnosti losjona.....	Napaka! Zaznamek ni definiran.
4.4.1	Električna prevodnost	Napaka! Zaznamek ni definiran.
4.4.2	pH vrednost	Napaka! Zaznamek ni definiran.
4.4.3	Reološke lastnosti	Napaka! Zaznamek ni definiran.
5	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	22
5.1	Vpliv sestave na lastnosti losjona.....	22
5.2	Vrednotenje senzoričnih lastnosti.....	23
5.3	Vrednotenje fizikalno-kemijskih lastnosti	23
5.3.1	Električna prevodnost	23
5.3.2	pH vrednost	24
5.3.3	Reološke lastnosti	26
5.4	Vrednotenje fizikalno-kemijske stabilnosti	30
5.4.1	Centrifugalni test	30
5.4.2	Ciklični test	31
6	SKLEP.....	38
7	LITERATURA.....	39

POVZETEK

Saponini so heterogena skupina snovi, ki imajo površinsko aktivne lastnosti. So sestavine naravnega izvora in jih pridobivamo z ekstrakcijo različnega rastlinskega materiala. Uporabljamo jih v prehrani, medicini in v kozmetiki. Predvsem na področju naravne kozmetike so postali zanimivi za uporabo v čistilnih in negovalnih izdelkih. Namen načrtovanja naravnih izdelkov je povečanje vsebnosti naravnih sestavin brez spremenjenih lastnosti in vpliva na učinkovitost izdelka. V teoriji je možno izdelati povsem naravno emulzijo, vendar to v praksi predstavlja velik izziv.

Cilj naše raziskave je bil, da ugotovimo, ali saponini lahko uspešno nadomestijo sintezne emulgatorje in omogočijo nastanek fizikalno stabilne emulzije. V diplomskem delu smo pripravili več različic losjona za telo s saponini. Spreminjali smo sestavo lipidne faze in vrsto emulgatorjev. Učinkovitost saponinov smo primerjali z emulgatorjem Tego Care CG 90[®], ki je dovoljen v naravni kozmetiki. Z meritvami pH, električne prevodnosti in reoloških lastnosti smo vrednotili fizikalno-kemijske lastnosti. Poleg centrifugalnega testa smo za ugotavljanje fizikalne stabilnosti losjonov izvedli tudi ciklični test.

Na podlagi rezultatov lahko ugotovimo, da smo uspeli izdelati fizikalno stabilne formulacije s kombiniranjem saponinov in Tego Care CG 90[®]. Rezultati cikličnega testa za vzorce s kombinacijo saponinov in Tego Care CG 90[®] kažejo na stabilnejšo notranjo strukturo, kot pri vzorcih, ki vsebujejo kot površinsko aktivno snov samo Tego Care CG 90[®]. Način izdelave in tudi interakcije z ostalimi snovmi v formulaciji so pomembni faktorji, ki vplivajo na stabilnost. Vrsta ekstrakta s saponini in stopnja čistosti prav tako vplivata na stabilnost emulzij. Ugotovili smo, da so ekstrakti s saponini zaradi spremenljive sestave in raznolikih lastnosti kompleksna zmes, ki še vedno predstavlja izziv, zlasti v povezavi s stabilnostjo in uporabo.

ABSTRACT

Saponins are heterogeneous group of compounds, which have surface active properties. These are ingredients of natural origin and are produced with extraction of plant material. Saponins are used in food industry, in medicine as adjuvants in vaccine preparation and in cosmetics industry. They are especially useful in an area of cleansing and care products in natural cosmetics. The challenge in formulating natural products is to increase the level of natural grown / green ingredients in formulations without compromising performance. In theory it is possible to prepare a stable emulsion, but in practice this represents a serious challenge.

The aim of this research is to prove, whether saponins can successfully replace synthesized surfactants and enable physically stable emulsion. In this study, multiple versions of body lotion were prepared with saponins, where the variable were different lipid phases and types of surfactants. Efficiency of saponins was compared with surfactant Tego Care CG 90®, which is acceptable in natural cosmetics. With measurements of pH and electrical conductivity and assessment of rheologic properties, we evaluated lotions physical and chemical properties. For evaluation of physical stability we used centrifugal and cyclic tests. Based on given results, we managed to find physically stable formulations with combinations of Tego Care CG 90® and saponins. Results of a cyclic test for samples with combinations of saponins and Tego Care CG 90®, present a more stable internal structure, compared to samples which contain only Tego Care CG 90®. Form of production and interaction with other groups of molecules used in formulation, play an important role in stability of the compound. Type of an extract with saponins and rate of purity are also an important factor in stability of emulsion. Therefore we concluded that extracts produced using saponins, because of their structural and compositional diversity, are a great challenge in relation to stability and usability.

SEZNAM OKRAJŠAV

T	Tego Care CG 90®
S	Saponin 8490
O/V	olje v vodi
V/O	voda v olju
RPM	obrati na minuto
CMC	kritična micelarna koncentracija
SLS	natrijev lavrilsulfat
CG	kokoglukozid
SCD	natrijev kokoamfodiacetat
SSC	natrijev sulfosukcinat

}

1 UVOD

Glede na fizikalne lastnosti so emulzije najpogostejša kozmetična oblika v različnih kategorijah izdelkov. Lahko jih izdelamo le s skrbno izbiro ustreznega emulgatorskega sistema. Razvoj novih kozmetičnih izdelkov najprej zahteva odločitev, kakšen izdelek želimo glede na namen uporabe. Temu primerno nato izberemo sestavine in tehnologijo izdelave. V naravni kozmetiki klasične emulgatorje nadomeščajo neionski, biološko razgradljivi emulgatorji in naravni polimeri (1).

1.1 Emulzije

Emulzija je heterogena, groba disperzija najmanj dveh nemešajočih se tekočin, od katerih je ena enakomerno razpršena, dispergirana v drugi v obliki kapljic. Zaradi proste površinske energije je termodinamsko nestabilna. Makroemulzije imenujemo emulzije, ki imajo velikost kapljic večjo od 400 nm. So mlečno bele in kapljice lahko opazujemo pod mikroskopom (2). Makroemulzije so termodinamsko nestabilne in težijo k razplastitvi po določenem času (3). Fizikalno stabilna emulzija je tista, ki se ne bo ločila na komponente v časovnem obdobju njene uporabe. Zaradi prej omenjenih lastnosti uporabljamo emulgatorje, ki tvorijo film na površini kapljic in tako vplivajo na stabilnost. Emulgatorji so amfifilne molekule, ki imajo površinsko aktivne lastnosti in so glede na naboj kationski, anionski, neionski ali amfoterni. To so snovi, ki so aktivne na medfazah. Prisotnost emulgatorja na medfazi olje-voda zniža površinsko napetosti med obema fazama (4). Nestabilnost povzročijo različni mehanizmi, kot so flokulacija, koalescenca in sedimentacija. Faktorji, ki vplivajo na stabilnost kapljic, so: fizikalna narava medfaznega filma, električna ali sterična bariera, viskoznost disperznega medija, razporeditev velikosti kapljic, volumen dispergirane faze in temperatura (2).

Glede na naravo dispergirane faze in disperznega medija ločimo tipe emulzij O/V in V/O. Če so oljne kapljice dispergirane v vodni fazi, je to emulzija tipa O/V in obratno, emulzije V/O imajo vodne kapljice dispergirane v olju. Lastnosti emulzije določajo lastnosti zunanje faze. Tip emulzije je odvisen od deleža posamezne faze, vrste emulgatorja in postopka priprave. Bancroftovo pravilo pravi, da je zunanja faza tista, v kateri je emulgator bolj topen (5).

Primer O/V emulzij so losjoni, mleko, majoneza. Losjon je tekoč kozmetični izdelek. Glavna funkcija losjona je vlažilni in negovalni učinek, ki nastane zaradi združitve vodne

in oljne faze. Hidrofilna faza zagotavlja vlaženje, medtem ko lipofilni del preprečuje izgubo vode skozi kožno povrhnjico. Primer V/O emulzij so hidrofozne kreme, ki so primerne za nočno nego. Tip emulzije je v glavnem odvisen od vrste emulgatorja, deleža vodne in oljne faze in postopka priprave (2).

1.2 Vrednotenje kozmetičnih izdelkov

Učinkovit razvoj in izdelava kvalitetnega emulzijskega izdelka temelji na vrednotenju fizikalno-kemijskih lastnosti in stabilnosti. Za vrednotenje izdelkov obstaja veliko različnih instrumentov in metod. Ker imajo kozmetični izdelki zelo raznoliko sestavo, mikrostrukturo in lastnosti, za ugotavljanje lastnosti izdelka ni standardnih protokolov vrednotenja in eksperimentalnih metod, prav tako tudi analizo tehniko prilagajamo glede na posamezen izdelek (3). Najpogosteje merimo povprečni premer kapljic, pH in električno prevodnost. Določimo tudi reološke in senzorične lastnosti (6).

1.2.1 Fizikalna stabilnost

Po Evropski Uredbi o kozmetičnih proizvodih za zagotavljanje fizikalne, kemijske in mikrobiološke kakovosti, kot tudi funkcionalnosti in estetike izvajajo stabilnostne teste pod različnimi pogoji (7). Stabilnostne teste opravimo v začetni fazi razvoja izdelka, s tem dobimo informacijo o stabilnosti, ki ima v grobem dva možna izida: stabilno ali nestabilno stanje. Stabilnostni testi so eksperiment, v katerih vzorce izpostavimo različnim obremenitvam za določen čas in tako simuliramo pogoje, katerim so izpostavljeni izdelki v roku uporabe. Centrifugalni test je obremenitveni test, pri katerem vzorce izpostavimo močni centrifugalni sili, ki ji izdelek sicer v normalnih pogojih uporabe ni izpostavljen. S tem testom hitro in učinkovito ugotovimo, kateri vzorci se razplasti. Vzorce za 30 minut izpostavimo 3000 obratom/min. S to metodo lahko hitro in v zgodnji fazi izločimo nestabilne vzorce. Pri cikličnem testu vzorce izpostavimo večkratnim spremembam temperature. Vzorce izpostavimo povišani temperaturi v komori (40°C) in nižani temperaturi v hladilniku (8°C). En cikel traja 48 ur, 24 ur v komori in 24 ur v hladilniku. Izvedemo tri do pet ciklov. Po končanem testu vrednotimo organoleptične lastnosti (barvo, videz, vonj) in fizikalno kemijske lastnosti (pH, viskoznost, gostota) (6,7).

1.2.2 Senzorične lastnosti

Primeren videz, konsistenca in barva so pomembni parametri pri izdelavi losjona. Senzorične lastnosti, kot sta vonj in barva, sta parametra za spremljanje tudi skozi daljši čas po izdelavi. Prav tako nam spremembe v vonju lahko podajo informacijo o morebitni mikrobiološki nestabilnosti (3).

1.2.3 pH vrednost

Pomembno vlogo ima pH, saj moramo zagotoviti optimalen pH, primeren uporabi na koži. Mora biti rahlo kisel, da zavira rast bakterij na površini kože, njegova vrednost je 5-5,5. Za spreminjanje pH vrednosti najpogosteje uporabljamo organske kisline (3).

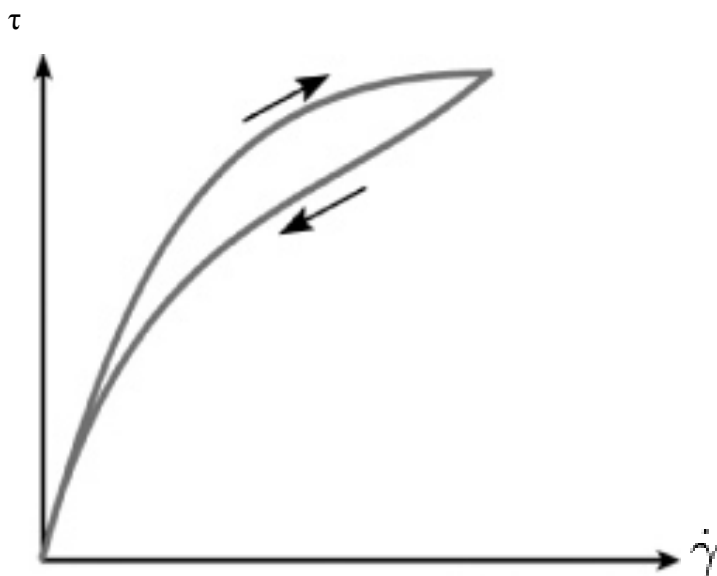
1.2.4 Električna prevodnost

Prevodnost služi za ugotavljanje tipa emulzije. Če emulzija prevaja električni tok, je emulzija tipa O/V, če toka ne prevaja je emulzija V/O in zunanja faza je olje (8).

1.2.5 Reološke lastnosti

Reološki profil kozmetičnega izdelka je ena od pomembnejših lastnosti, tako v tehničnem kot estetskem pomenu. Reološke lastnosti so pogosto neposredno povezane s senzoričnimi lastnostmi in vplivajo na funkcionalnost (6). Kozmetični izdelki so ob uporabi izpostavljeni določenim obremenitviam. Ob rokovanju je pomembno, da izdelek ne teče, ampak se z lahkoto namaže in ohrani ustrezen videz (9). Kozmetični izdelki za vlaženje, čiščenje in zaščito kože potrebujejo reološke lastnosti, ki omogočajo hitro aplikacijo in odlaganje zaščitnega oljnega filma na povrhnjico kože. Reološke lastnosti prav tako vplivajo na debelino oljnega sloja, ki ostane na površini kože in tako vplivajo na učinkovitost proizvoda. Zaradi nastanka okluzijskega filma je zagotovljeno vlaženje, saj se prepreči transepidermalna izguba vode. Kozmetične kreme in losjoni so ne-newtonske tekočine in izkazujejo psevdoplastično obnašanje. Tiksotropija omogoča kozmetičnim izdelkom, da so zelo viskozni ob mirovanju, nizko viskozni ob nanosu in da se naknadno povrnejo v prvotno stanje. Karakteristična viskoznost nam pove, ali je določen proizvod losjon ali krema. Losjoni so manj viskozni od krem, vendar morajo biti za povečanje stabilnosti vseeno dovolj viskozni (10). Reologija je veda o deformaciji, preoblikovanju in

toku tekočin, poltrdnih in trdnih sistemov pod vplivom mehanske sile. Reometrija omogoča določanje teh lastnosti z različnimi metodami in napravami. Zaradi delovanja strižne napetosti se telo deformira. Reogram je graf, ki prikazuje odvisnost strižne napetosti od strižne hitrosti. V viskoznostni krivulji je viskoznost odvisna od strižne hitrosti. Pri elastičnem sistemu se telo po deformaciji vrne v prvotno stanje, pri plastičnem pa ne. Sisteme delimo na idealne in neidealne (newtonske in ne-newtonske). Pri idealnih sistemih je viskoznost neodvisna od strižne hitrosti, odvisna je od tlaka in temperature. Pri neidealnih sistemih pa se razmerje med strižno napetostjo in strižno hitrostjo spreminja z viskoznostjo. Nenevtonske sisteme delimo na časovno odvisne in časovno neodvisne. Časovno neodvisni so psevdoplastični, plastični in dilatantni. Plastični za razliko od psevdoplastičnih začnejo teči šele, ko delujemo nanje s silo, ki je večja od sile, ki se upira porušenju strukture. Pri časovno odvisnih sistemih se po obremenitvi notranja struktura obnovi. Ločimo reopleksne in tiksotropne sisteme. Tiksotropni sistemi pod vplivom obremenitve zmanjšajo viskoznost, vendar po končani obremenitvi po določenem času mirovanja obnovijo notranjo strukturo in sistem se povrne v prvotno obliko. Ti sistemi so značilni predvsem za kozmetične proizvode, ki vsebujejo polimere, kot je ksantan. Stopnjo tiksotropije prikazujemo s površino med krivuljama, ki ji pravimo histereza ali histerezna zanka (slika 1) (11).



Slika 1: Tiksotropija in histerezna zanka.

1.3 Saponini

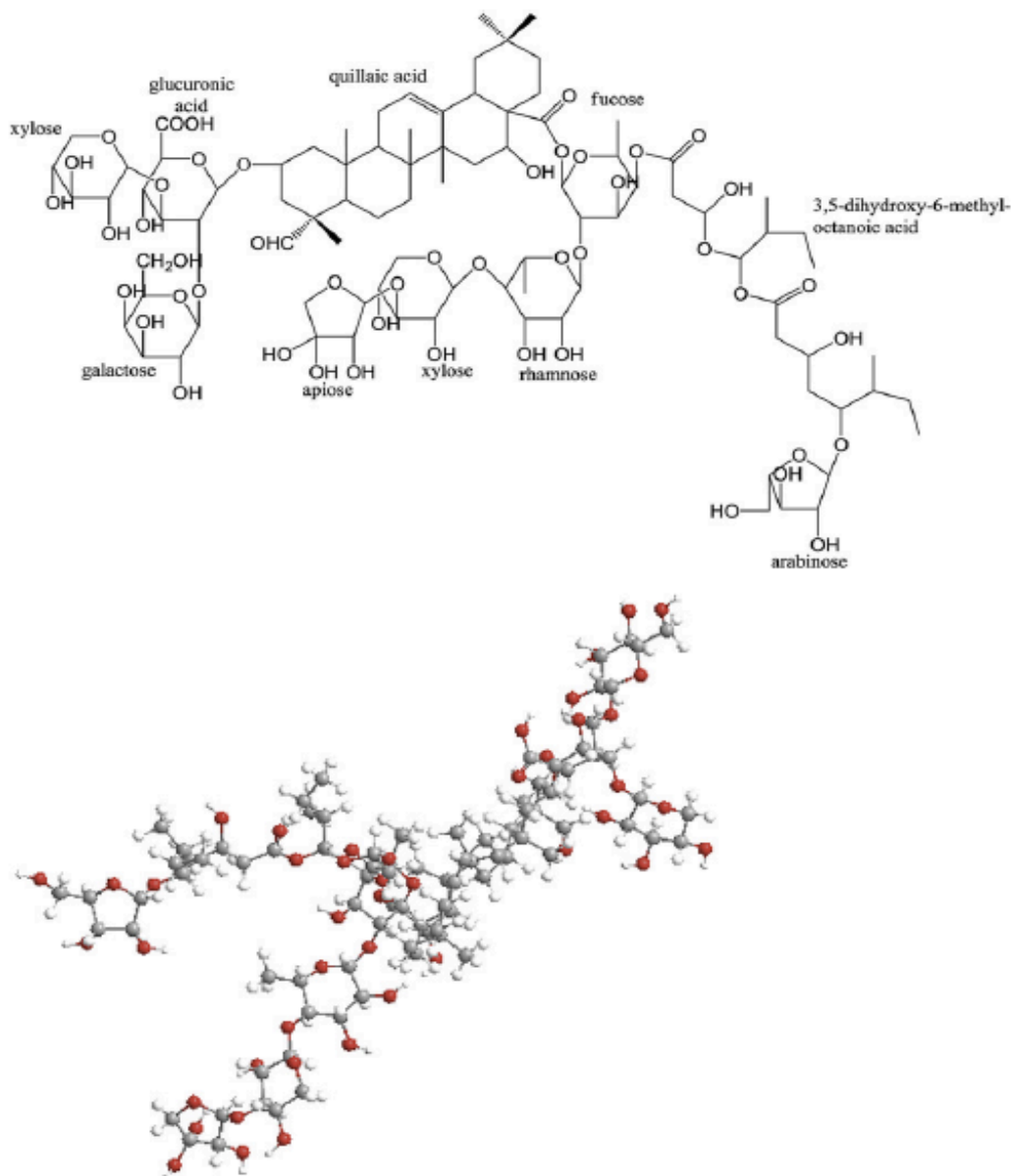
Saponini so rastlinski glikozidi. So neionski emulgatorji in tvorijo emulzijo tipa O/V (12). So strukturno glikozilirani triterpeni in se ob stresanju vodne raztopine močno penijo, podobno kot milo (13). Ta lastnost je razlog za ime "saponini", ki izvira iz latinske besede *sapo* (= milo) (14). Saponini so naravne površinsko aktivne snovi. Že stoletja jih uporabljamo kot penilce, emulgatorje v hrani in kot močljivce. Prav tako se je povečalo zanimanje zanje v medicini, zaradi njihovih pozitivnih lastnosti, kot so znižanje holesterola in imunostimulatorna aktivnost (15). Široka komercialna uporabnost je rezultat razvoja novih procesnih strategij, vendar pa so mnoge pod patentno zaščito. V okviru te naloge nas je predvsem zanimala njihova uporabnost v kozmetiki.

1.3.1 Vloga saponinov v kozmetiki

Saponini so sposobni tvorjenja pene, omočenja, solubilizacije in znižanja površinske napetosti. Izkazujejo protimikrobne lastnosti in so učinkoviti proti aknam. Zaradi sposobnosti penjenja jih uporabljamo kot penilce v čistilnih izdelkih, kot so na primer geli za prhanje, šamponi, peneče kopeli, balzami za lase in losjoni, detergenti, tekoča mila, ustne vodice, zobne paste. Prav tako jih uvrščamo med bioaktivne sestavine v kozmetiki, kjer velikokrat navajajo učinke proti staranju in proti aknam. Komercialno najpogosteje uporabljajo ekstrakte iz lubja čilskega milovca (*Quillaja saponaria*) in semen navadnega divjega kostanja (*Aesculus hippocastanum*) (npr. Indena), ki so bogati s saponini, vendar vsebujejo tudi polifenole in tanine (16).

1.3.2 Kemijske in fizikalne lastnosti saponinov

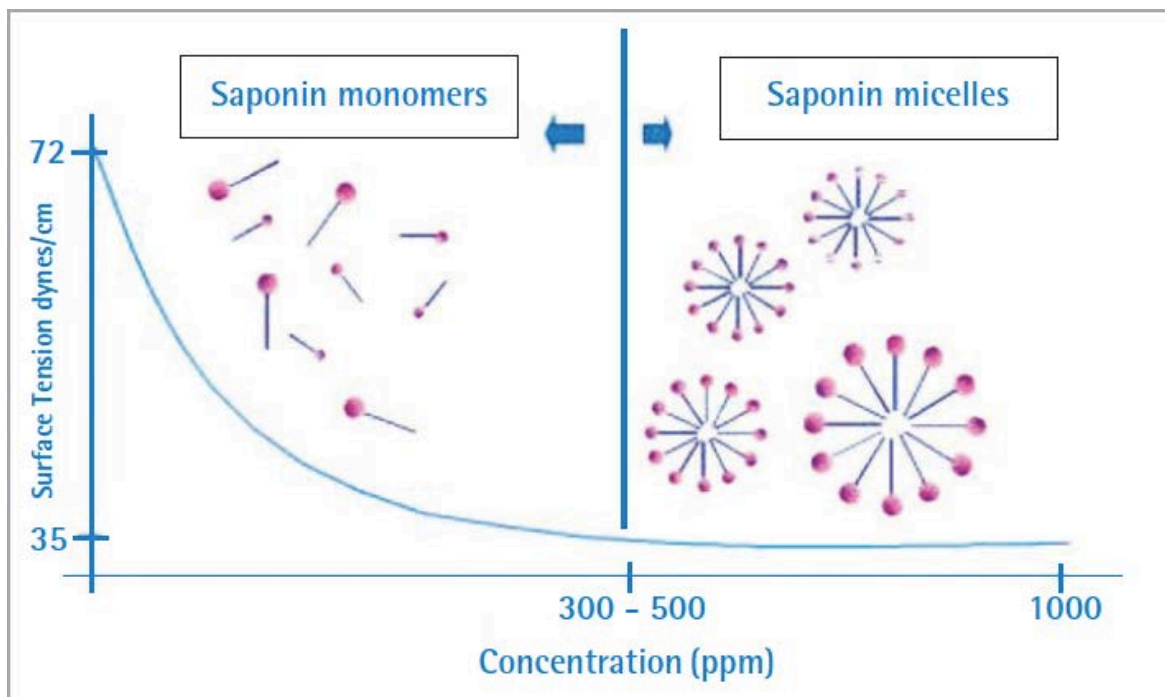
Saponini so glikozidi z eno ali večimi sladkornimi verigami pripetimi na triterpensko ali steroidno aglikonsko ogrodje ki ga imenujemo tudi sapogenin (15).



Slika 2: Kemijska struktura kvilaja saponina (13).

Glede na kemijsko strukturo aglikona jih delimo na steroidne in triterpenoidne saponine. Triterpenski saponini vsebujejo aglikone s 30C atomi. Najpogostejše osnovne strukture so pentaciklični oleani in tetraciklični damarani. Rezultat spremenljive stopnje hidroksilacije aglikona je širok spekter različnih saponinov (14). Glede na število direktno vezanih sladkornih verig jih ločimo na monodezmoide (ena veriga), bidezmoide (dve verigi) in tridezmoide (tri verige). Monosaharidni deli saponinov vključujejo širok spekter preprostih sladkorjev in njihovih derivatov, kot so D-glukoza (Glc), D-galaktoza, (Gal) D-glukuronska kislina (GlcA), D-galakturonska kislina (GalA), L-ramnoza (Rha), L-arabinoza (Ara), D-ksiloza (Xyl) in D-fukoza (Fuc) (13). Biogeneza triterpenskih

saponinov se začne s ciklizacijo skvalena do damaranov, ki se spremenijo z razprtjem obroča, kateremu sledi zaprtje obroča z lupani in oleani do ursanov. Za interakcije z biološkimi membranami morajo biti kisli saponini vezani na najmanj tri monosaharidne verige, medtem ko imajo nevtralni saponini najmanj dve sladkorni molekuli (13). Kvilaja saponini so bidezmoidi, kar pomeni, da vsebujejo dve sladkorni verigi pripeti na triterpensko ogrodje na mestu 3 in 28. Triterpensko ogrodje je identificirano kot kvilaja kislina. Monomerni saponini imajo molekulska masa 1800-2000 Da. (16) Sposobni so tvoriti micelle nad kritično micelarno koncentracijo (CMC), ki je med 0.5 do 0.8 g/L pri 298 K. Kritična micelarna koncentracija kvilaja saponinov se poviša s temperaturo in pH, medtem ko se zniža ob prisotnosti soli (16, 17). Ker so saponini naravni metaboliti rastlin in ker so ekstrakti zmes različnih saponinov, lahko CMC variira (18).



Slika 3: Prikaz oblikovanja micelov iz saponinov nad CMC (19).

V lubju čilskega milovca so identificirali najmanj 20 različnih saponinov. Z analizo HPLC so ugotovili, da komercialni ekstrakti lubja in lesa vsebujejo 15-20 % saponinov, vendar je vsebnost individualnih saponinov v vsakem ekstraktu različna (16).

Variabilnost sestave saponinskih ekstraktov je vzrok za spremenljive fizikalne, kemijske in biološke lastnosti komercialnih saponinov. Kompleksna struktura saponinov je lahko podvržena kemijski transformaciji med skladiščenjem ali predelavo, kar lahko spremeni lastnosti oziroma kakovost. Glikozidna vez in glikozidne vezi med sladkornimi ostanki so

podvrženi hidrolizi ob prisotnosti kislin/baz, hidrotermolizi (hidroliza ob povišani temperaturi) in encimski/mikrobiološki aktivnosti, kar lahko vodi do nastanka aglikonov, prosapogeninov, sladkornih ostankov ali monosaharidov (15).

1.3.3 Študija združljivosti kvilaja saponinov

Vrednotili so kompatibilnost, interakcije in obnašanje kvilaja ekstraktov, ki so jih vgrajevali skupaj s pogosto uporabljanimi kozmetičnimi sestavinami. S temi informacijami so lahko določili možno uporabo saponinov v končnih produktih in glavne karakteristike takšnih formulacij(19).

Združljivost z bazami

Raztopine triterpenskimi saponinov so kisle. Nevtralizacija z bazami (trietanolamin, NaOH, arginin) ne vpliva na njihovo stabilnost. Opazna je le rahla sprememba v intenziteti barve, vendar se je povrnila takoj, ko so spet znižali pH.

Etanol

10 % raztopine ohranijo transparentnost z dodatkom etanola do 20 %. Med 20 % in 30 % etanola je opazno postopno naraščanje opalescence.

Interakcije s hidrotropi

10 % raztopinam so dodali po 5 % naslednjih sestavin: sečnina, betain, inozitol in glicerol. Sorbitol, propilenglikol in maltitol so dodali v koncentraciji do 20 %. V vseh primerih je videz raztopine ostal nespremenjen, opazili so le rahlo poslabšanje občutka pri nanosu v kombinaciji z glicerolom in rahlo izboljššan emolientni učinek v primeru z inozitolom.

Sposobnost penjenja

Po rezultatih študije imajo prečiščeni kvilaja triterpenski saponini v povprečju za 40 % nižjo penilno sposobnost v primerjavi z visoko penečimi površinsko aktivnimi snovmi (natrijev lavrilsulfat (SLS), kokoglukozid (CG), natrijev kokoamfodiacetat (SCD), natrijev sulfosukcinat (SSC)). Pri zmesi 80:20 s CG so opazili boljšo penilno sposobnost kot pri vzorcih s SLS.

Združljivost z naravnimi in sintezniimi polimeri

V študiji so preučevali vpliv polimerov in ugotovili, da so nekateri pokazali zmanjšan zgoščevalni učinek, medtem ko so ksantan, hidroksietilceluloza in karagenan pokazali zgoščevalni učinek. Zanimive rezultate so dobili v primeru ksantana in ekstrakta karagena (*Chondrus crispus*). Testi so pokazali, da je prišlo do pozitivne sinergistične interakcije z naravnimi polimeri in kvilaja triterpenskimi saponini v vodni raztopini.

Interakcije s solmi in organskimi zgoščevali

10 % vodne raztopine z dodanimi 4 % NaCl, KCl, MgCl₂ niso pokazale nobene spremembe v viskoznosti. Testirali so organska zgoščevala in sicer kokamid DEA, PEG-120 metilglukoza dioleat, PEG-90 gliceril izostearat-lauret-2, vendar nobeden ni prispeval k spremembi viskoznosti.

Združljivost s pigmenti

Disperzije mineralnih pigmentov so kompatibilne s saponini. Nasprotno pa disperzije z mineralni prahovi, ki se uporabljajo kot abrazivi v zobnih pastah, niso združljive s saponini (19).

1.3.4 Biološka aktivnost in toksičnost saponinov

Saponinom pripisujejo številne farmakološke funkcije. Med najpomembnejše spadajo permeabilizacija celične membrane, znižanje stopnje serumskega holesterola, stimulacija luteinizirajočega hormona, imunomodulatorni potencial, citostatični in citotoksični učinki na maligne tumorske celice, adjuvantne lastnosti za vaccine kot imunostimulatorni kompleksi in sinergistično izboljšanje toksičnosti imunotoksinov. Zaradi posploševanja številnih avtorjev je ključnega pomena individualno testiranje izoliranih saponinov z namenom ugotavljanja njihovega odnosa med površinsko aktivnostjo in citotoksičnostjo (14, 20). Zelo visoko prečiščene frakcije imajo lahko različne toksikološke lastnosti (15). Zaradi razvoja nanotehnologije imajo saponini velik potencial za uporabo v novih terapevtskih izdelkih. Vendar pa je njihove toksikološke lastnosti potrebno še dopolniti z *in vivo* študijami (13).

1.3.5 Viri saponinov

Saponini so raznolika skupina spojin, ki so široko razširjene v rastlinskem svetu (14), kot tudi v morskih organizmih in insektih (13).

Najbolj znani so saponini, ki nastanejo kot sekundarni metaboliti pri kritosemenkah (Magnoliophyta). Steroidne saponine najdemo v glavnem pri enokaličnicah (npr. družinah *Agavaceae*, *Dioscoreaceae* in *Liliaceae*), medtem ko triterpenske saponine najdemo v dvokaličnicah (npr. *Fabaceae*, *Araliaceae*, *Caryophyllaceae*). Glavni prehranski viri saponinov so stročnice (npr. grah in soja), žitarice, česen in čebula, špinača, sladkorna pesa, čaj in šparglji. Pri zdravstvenih in industrijskih pripravkih pa so vir saponinov: *Quillaja saponaria* (čilski milovec), *Yucca schridigera* (vrsta juke), *Trigonella foenum-graecum* (sabljasti triplat), *Medicago sativa* (lucerna), *Aesculus hippocastanum* (navadni divji kostanj), *Glycyrrhiza glabra* (golostebelni sladki koren), *Gypsophila paniculata* (latnata sadrenka), *Saponaria officinalis* (navadna milnica), *Panax ginseng* (pravi ginseng). Molekulska zgradba saponina je odvisna od rastlinske vrste, medtem ko je vsebnost saponina odvisna od vrste rastline, genetskega izvora rastline, dela rastline, okolijskih in agronomskih dejavnikov, skladiščenja in obdelave (14).

1.3.6 Ekstrakcija, rafinacija in izolacija saponinov

Za komercialno uporabo so na voljo rastlinski ekstrakti saponinov, ki jih uporabljamo zaradi njihovih penilnih lastnosti, kot tudi saponini višje čistote, ki jih uporabljamo v medicini. Z uporabo analiznih metod lahko izboljšamo pripravo, ki je sicer težavna zaradi kompleksne narave saponinov. Zaradi obilja saponinov v naravi je na voljo veliko različnega rastlinskega materiala za komercialno uporabo. Ekstrakcija iz rastlinskega materiala je odvisna od tipa topila, pogojev ekstrakcije (časa, pH, temperature) in lastnosti vhodnega materiala (sestave in velikosti delcev). Ti faktorji močno vplivajo na učinkovitost in lastnosti končnega produkta. V primeru izolacije je treba optimizirati parametre ekstrakcije. Za pridobivanje ekstraktov s saponini uporabljamo topila, zlasti vodo, nizkomolekulske alkohole (metanol in etanol) ali vodno-alkoholne raztopine. Superkritični CO₂ je lahko alternativa organskim topilom. Vrsta topila vpliva na sestavo ekstrakta s saponini. Za nadaljnjo čiščenje saponinov uporabljamo več zaporednih postopkov. V začetni fazi ločimo saponine z mešanjem vode in nepolarnim topilom kot je na primer *n*-butanol. V nadaljevanju lahko uporabimo precipitacijo s topili, adsorpcijo,

ultrafiltracijo in/ali kromatografijo. Nestabilna struktura saponinov prispeva h kompleksnosti in ceni zaključnih postopkov (14).

2 NAMEN DELA

Namen diplomske naloge je izdelava in proučevanje stabilnosti emulzij s saponini. Izdelali bomo več prototipov losjona za telo s saponini. Pri delu bomo uporabili samo sestavine, ki so dovoljene v naravni kozmetiki. S saponini bomo kombinirali emulgator Tego Care CG 90[®] in spreminjali njegove deleže v formulaciji. Veliko virov navaja površinsko aktivnost saponinov, vendar ni dostopnih informacij o kvantitativni sestavi formulacij, ki vsebujejo saponine. Zanima nas, ali so saponini primerni za uporabo v naravni kozmetiki ter kakšne lastnosti imajo. Formulacijo bomo čim bolj poenostavili in poskusili del emulgatorja nadomestiti s saponini. Želimo doseči stabilno emulzijo z optimalnimi deleži emulgatorja. S centrifugalnim in cikličnim testom bomo vrednotili fizikalno stabilnost emulzije. Tako bomo lahko ugotovili, katere formulacije so podvržene razplastitvi. Na podlagi rezultatov bomo izbrali vzorce, ki jim bomo preverili senzorične lastnosti, izmerili pH, prevodnost in reološke lastnosti emulzije.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

- *Saponin*

Zaščiteno ime: Saponin 84510

Je visoko prečiščen ekstrakt saponinov z 8-25 % deležem sapogenina. Uporabljamo ga kot neionski emulgator O/V na področju molekularne biologije tudi za pripravo vakcin (adjuvans). Je v obliki rumenega prahu z rahlim značilnim vonjem.

Proizvajalec: Sigma-Aldrich (Nemčija)

- *Mandljevo olje*

INCI: Prunus Amygdalus Dulcis Oil

Je rumenkasta tekočina z vonjem po oreščkih. Kemijsko je zmes trigliceridov 62-86 % oleinske kisline, 20-30 % linolne kisline in drugih maščobnih kislin, vsebuje beta-sitosterol, skvalen in vitamin E. Ima vlogo emolienta.

Proizvajalec: Lex d.o.o. (Slovenija)

- *Karitejevo maslo*

INCI: Butyrospermum Parkii (Shea Butter)

Je bele barve, brez vonja in v poltrdni obliki. Je netopen v vodi, temperatura tališča je med 32-45°C. Ima vlogo emolienta.

Proizvajalec: Caesar & Loretz GmbH (Nemčija)

- *Cetearilglukozid*

INCI: Cetearyl Glucoside

Zaščiteno ime: TEGO Care CG 90®

Je neionski emulgator O/V in je dovoljen v naravni kozmetiki. Je posebej primeren za nizko viskozne sisteme, kot so losjoni, lahke emulzije, kreme, pene za obraz in telo. Dodaja se v nizkih koncentracijah (1-1,5 %). HLB je približno 11. Je v obliki belega prahu, brez vonja in je topen v vodi.

Proizvajalec: Evonik Industries AG (Nemčija)

- *Cetostearyl*

INCI: Cetearyl alcohol

Zaščiteno ime: Lanette O[®]

Je večnamensko zgoščevalo sestavljeno iz maščobnih alkoholov C18 stearylalkohola (45-55 %) in C16 cetilalkohola (45-55 %). Uporabljamo ga za modificiranje konsistence, predvsem uravnavanje viskoznosti v O/V emulzijah. Je svetlo rumen, podoben vosku in ima rahel značilen vonj.

Proizvajalec: Lex d.o.o. (Slovenija)

- *Xsantan*

INCI: Xanthan Gum

Je heteropolisaharid (iz glukoze, manoze in glukuronske kisline) z visoko molekulsko maso. Pridobivamo ga s fermentacijo iz čiste kulture *Xanthomonas campestris*. Je topen v hladnem ali toplem. Ima vlogo zgoščevala in poveča viskoznost sistema, ima tudi negovalni učinek.

Proizvajalec: Sigma-Aldrich (Nemčija)

- *Glicerol*

INCI: Glycerin

Je vlažilec (humektant), topilo (dispergira) za ksantan, emolient in lubrikant. Je prozorna tekočina brez vonja in je topen v vodi.

Proizvajalec: Pharmachem Sušnik Jožef s.p., Slovenija

- *Benzojska kislina*

INCI: Benzoic Acid

Je organska kislina (C₇H₆O₂) v obliki belega kristaliničnega prahu. Ima vlogo konzervansa v prehrani in kozmetiki.

Proizvajalec: Sigma-Aldrich (Nemčija)

- *Sorbinska kislina*

INCI: Sorbic Acid

Je organska kislina ($C_6H_8O_2$) v obliki kristaliničnega prahu in služi kot konzervans, predvsem proti plesnim in glivam.

Proizvajalec: Sigma-Aldrich (Nemčija)

- *Mlečna kislina*

INCI: Lactic acid

Je organska kislina ($C_3H_6O_3$) v obliki belega kristaliničnega prahu. V kozmetiki nastopa kot eksfoliant, humektant, za uravnavanje pH in kot negovalna sestavina v izdelkih za nego in proti staranju kože.

Proizvajalec: Lex d.o.o. (Slovenija)

3.2 Aparature in oprema

vodna kopel (INAKO VK6ER, Hrvaška)

centrifuga (Centric 322A, Slovenija)

tehnica (Sartorius AX623, Anglija)

konduktometer (Mettler Toledo, Taiwan)

pH meter (Mettler Toledo, Taiwan)

reometer ((Physica MCR 301, Nemčija)

hladilnik (Gorenje, Slovenija)

komora (Kambič SP 45, Slovenija)

patene in pestila

plastične epruvete

3.3 Metode

3.3.1 Vrednotenje fizikalne stabilnosti losjona

Za vse izdelane formulacije smo preizkušali stabilnost po Evropski Uredbi o kozmetičnih izdelkih (7). Vzorci so bili izpostavljeni stresnim pogojem, ki so naslednji: centrifugiranje in cikel nihanja temperature. Test s centrifugiranjem je hiter in enostaven ter nam poda prvo informacijo o stabilnosti sistema.

3.3.2 *Centrifugiranje*

V plastične epruvete smo napolnili vzorce z enako maso in jih postavili v centrifugo za 30 minut pri 3000 RPM (1458.99 g). Po centrifugiranju smo vzorce ocenili in fotografirali.

3.3.3 *Ciklični test*

V komori na 40°C smo vzorce shranjevali 24 ur in jih zatem prestavili v hladilnik na +5°C za naslednjih 24 ur. To predstavlja en cikel, izvedli pa smo pet ciklov. Nato smo preverili fizikalno stabilnost in po končani obremenitvi določili reološke lastnosti. Najprimernejše je teste izvajati v originalni ovojnini, vendar je naš izdelek ni imel, tako da smo stabilnost določali v plastičnih epruvetah.

3.4 *Vrednotenje senzoričnih lastnosti losjona*

Senzorične lastnosti so opisne lastnosti. V to področje sodi ugotavljanje videza, barve, vonja, mazljivosti in občutka po nanosu. Vzorcem smo ocenili videz, ki mora biti homogen, brez mehurčkov in/ali grudic. Barvo smo ocenili tako, da smo primerjali vzorce glede na belo podlago. Ugotovili smo lastnosti takoj po izdelavi in po končanem cikličnem testu, kot tudi skozi daljši čas shranjevanja pri sobni temperaturi.

3.5 *Vrednotenje fizikalno-kemijskih lastnosti losjona*

3.5.1 *Električna prevodnost*

Električno prevodnost smo izmerili s konduktometrično metodo z direktnim vstavljanjem elektrode v vzorce pri sobni temperaturi.

3.5.2 *pH vrednost*

Pripravili smo vodne raztopine Tego Care CG 90[®] in saponina v različnih koncentracijah. Izdelanim vodnim raztopinam smo pH merili potenciometrično s pH metrom. Najprej smo pH meter umerili s standardnimi pufrnimi raztopinami (pH 4.01 in pH 9.21). Pred vsakim merjenjem smo sprali elektrodo in rezultat izmerili tako, da smo elektrodo vstavili v vzorec in odčitali vrednost na ekranu.

3.5.3 Reološke lastnosti

Reološke lastnosti smo merili z rotacijskim viskozimetrom z merilnim sistemom stožec-ploščica (CP 50-2). Ta merilni sistem omogoča merjenje majhnih količin vzorca. Vzorce smo merili pri temperaturi 23°C. Pred analizo smo vzorce shranili 24 ur v plastični epruveti pri sobni temperaturi. Merili smo strižno napetost in viskoznost v območju strižnih hitrosti od 0 do 100/s in nazaj. V vsakem intervalu smo v 100s izmerili 20 merilnih točk.

4 EKSPERIMENTALNI DEL

4.1 Sestava in izdelava formulacij

Sestava vseh pripravljenih formulacij in njihova fizikalna stabilnost sta podani v tabeli I. Stabilnost smo ugotavljali s centrifugalnim testom in izločili vzorce, ki so se izkazali kot nestabilni. Nestabilni so bili tisti vzorci, ki so pokazali ločitev oljne in vodne faze. Na podlagi centrifugalnega testa in senzoričnih lastnosti (konsistenca, videz) smo kot optimalno izbrali formulacijo VIII. V skladu s postopkom, opisanem v nadaljevanju, smo recepturi, podani v tabeli II, spreminjali deleže površinsko aktivne snovi TEGO Care CG 90 in saponina tako, da so vsi prototipi formulacij vsebovali konstantno vsebnost oljne in vodne faze (deleži so podani v tabeli III). Razmerja obeh emulgatorjev v vzorcih so prikazana na sliki 4. Formulacije smo razdelili na dva dela: en del je vseboval TEGO Care CG 90[®], drugi del pa kombinacijo TEGO Care CG 90[®] in saponina. Vzorce s kombinacijo TEGO Care CG 90[®] in saponina smo pripravili tako, da smo na vodni kopeli segreli lipidno fazo (~80°C) in del vodne faze, kateri smo dodali TEGO Care CG[®]. Nato smo z intenzivnim mešanjem oljno in vodno fazo združili na kopeli. Ohlajeni zmesi vode in olja smo nato dodali preostanek vode, v kateri smo raztopili saponin. Vzorce smo pripravili na vodni kopeli, z ročnim mešanjem in jih po izdelavi napolnili v plastične epruvete, tako da smo dobili za vsako formulacijo po štiri vzorce. Vzorce smo hranili 24 ur pri sobni temperaturi in jim nato merili pH in električno prevodnost, izmerili reološke lastnosti in izvedli centrifugalni in ciklični test.

Tabela I: Sestava formulacij (v g) in njihova fizikalna stabilnost

sestavina	I.	II.	III.	IV.	V.	VI.	VII.	VIII.	IX.	X.
mandljevo olje								16,0	16,0	16,0
karitejevo maslo	8,0	8,0	8,0	8,0	7,0	7,0	4,0	4,0	4,0	4,0
kokosovo olje	5,5	5,5	5,5	5,5	5,0	6,0				
olivno olje	3,0	3,0	3	3	7,0	7,0	18,0			
kakavovo maslo				1	1,5	2,0				
cetostearol	1,0	0,5	1				2,0	4,0	4,0	4,0
fosfolipon		1,0	1	1,0	2,0	1,0				
saponin	1,5	1,0	0,5	1,0		1,0			1,6	0,8
Tego Care CG 90	78,5	78,5	78,5		75,0	74,5	1,6	1,6		0,8
voda							69,2	69,2	69,2	69,2

glicerol	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	5,0	5,0	5,0	5,0
ksantan	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
stabilnost	NE	NE	NE	NE	NE	NE	DA	DA	NE	NE

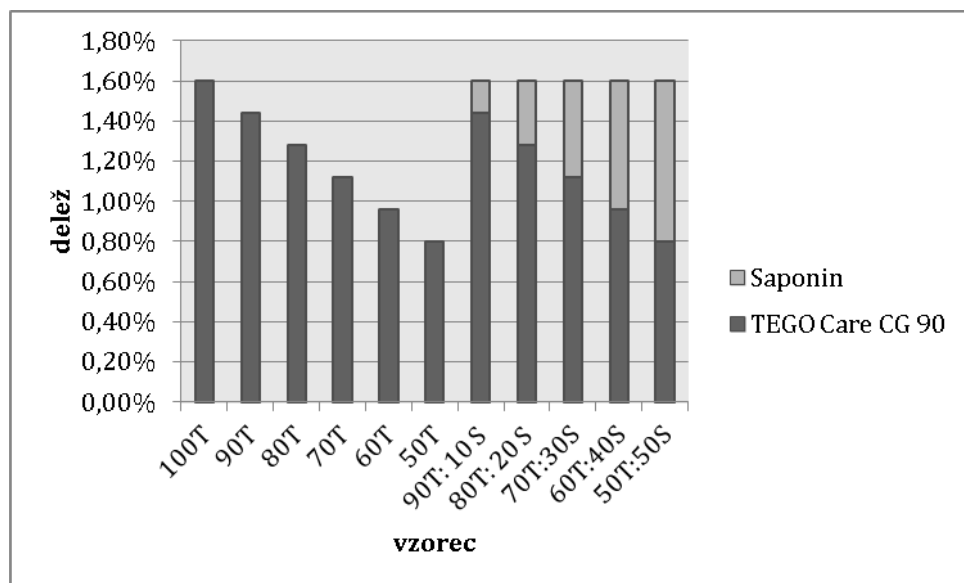
Tabela II: Izbrana receptura za losjon.

A	mandljevo olje	16,00 g
	karitejevo maslo	4,00 g
	cetostearol	4,00 g
B	voda	69,2 g
	emulgator (TEGO Care CG 90 [®] in/ali saponin)	X g
C	glicerol	5,00 g
	ksantan	0,20 g
D	benzojska kislina	0,10 g
	sorbinska kislina	0,10 g
	mlečna kislina	q.s.

Postopek izdelave:

1. Na vodni kopeli segrejemo fazo A na 70-80°C
2. Del vode iz faze B zavremo (50 g) in postavimo na vodno kopel na 70-80°C, nato dodamo TEGO Care CG 90[®] in dispergiramo 30 sekund.
3. Fazo A združimo v fazo B na vodni kopeli in mešamo do homogene zmesi bele barve. Odstavimo s kopeli in nadaljujemo z mešanjem, dokler se ne ohladi. Po ohajanju dodamo drugi del vodne faze (19,2g), ki lahko vsebuje saponin.
4. Ksantan raztremo v terilnici z glicerolom in dodamo fazo A/B. Previdno zmešamo.
5. Po potrebi uravnamo pH z mlečno kislino in dodamo benzojsko in sorbinsko kislino.

Slika 4 prikazuje razmerja med obema emulgatorjema. Prvih šest stolpcev prikazuje zmanjševanje TEGO Care CG 90[®], medtem ko drugih pet prikazuje razmerja med saponinom in TEGO Care CG 90[®].



Slika 4: Odstotek emulgatorjev v izbranih formulacijah s TEGO Care CG 90[®] in saponinom.

Tabela III: Vsebnost (m/m%) TEGO Care CG 90[®] in saponina.

formulacija	TEGO Care CG 90	Saponin
100T	1,60 %	/
90T	1,44 %	/
80T	1,28 %	/
70T	1,12 %	/
60T	0,96 %	/
50T	0,80 %	/
90T10 S	1,44 %	0,16 %
80T20 S	1,28 %	0,32 %
70T30S	1,12 %	0,48 %
60T40S	0,96 %	0,64 %
50T50S	0,80 %	0,80 %

4.1.1 Izbor formulacij po smernicah za naravno kozmetiko

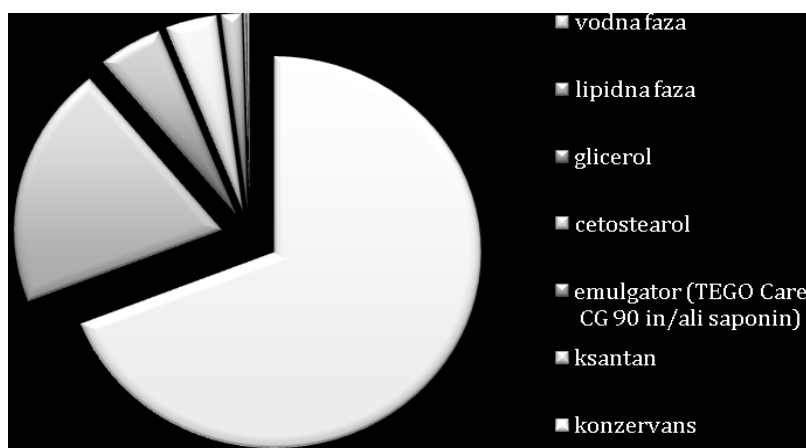
Sestavine za losjon smo izbrali v skladu s predpisi za sestavine v naravni kozmetiki. COSMOS (»Cosmetic Organic and Natural Standard) je standard, ki so ga razvile družbe ICEA (Italija), BDIH (Nemčija), BioForum (Belgija), Soil Assosiation (Anglija) in ECOCERT (Francija). COSMOS določa za pridobitev certifikata najmanj 20% organske vsebine, medtem ko naj za naziv »organsko« vsebuje 95% organske vsebine, kjer se voda ne upošteva. COSMOS opisuje pet kategorij sestavin: voda, minerali, fizikalno predelane

rastlinske sestavine, kemijsko predelane rastlinske sestavine in sintezni materiali. V vsaki kategoriji so napisani procesi, ki so dovoljeni za predelavo rastlinskega materiala. Glede na Prilogo II COSMOS standarda, so dovoljene naslednje sintetične sestavine: benzojska kislina, benzilalkohol, dehidroocetna kislina, dinatrijev benzoat, heliotropin, salicilna kislina, sorbinska kislina in tetranatrijev glutamat diacetat (1).

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 Vpliv sestave na lastnosti losjona

Osnovni pogoji izbire sestavin za losjon so bili: stabilnost formulacij, biokompatibilnost sestavin in biorazgradljivost. Sestavine smo izbrali upoštevaje določila za naravne negovalne kozmetične izdelke. Na podlagi stabilne formulacije smo nato spreminjali vrednosti TEGO Care CG 90[®] in saponina. Na sliki 5 je prikazana poenostavljena sestava formulacije za losjon. Vidimo, da losjon vsebuje velik del vodne faze, medtem ko je lipidne faze manj kot 25 %. Izdelane emulzije so tipa O/V. Vsebujejo manj lipidne faze, kot emulzije tipa V/O. Vodne faze je prisotno največ in ima v losjonu vlažilni učinek. Za povečanje negovalnih lastnosti izdelka lahko del vode nadomestimo s hidrolati različnih rastlin. V vodni fazi je hidrofilni emulgator, ki je v našem primeru cetearilglukozid in saponin. Zaradi velikega deleža vodne faze je treba dodati konzervans (benzojska in sorbinska kislina). Poudariti je treba, da ima na samo formulacijo vpliv tudi vir lipida. Lipofilno fazo sestavljajo različne lipidne sestavine, ki imajo emolientne lastnosti. Zaradi različnih talilnih temperatur lahko pripomorejo k spreminjanju viskoznosti sistema. Uporaba karitejevega masla se je izkazala kot ugodna, zaradi povišanega tališča lipidne faze, kar pomeni, da ima formulacija višjo viskoznost. Cetostearol deluje kot koemulgator. Dodatek cetostearola povzroči spremembo konsistence v poltrdno stanje. Formulacije s fosfolipidi so nizko viskozne in niso stabilne, saj kapljice priplavajo na površino, ko se mešanje ustavi. Ksantan ima v formulaciji vlogo zgoščevala in lahko zaradi tvorjenja gelske mreže pripomore k fizikalni stabilnosti formulacij. Vrednost pH uravnavamo z organskimi kislinami, kot je npr. mlečna ali citronska kislina.



Slika 5: Poenostavljena sestava formulacije za losjon

Saponini so hidrofilni in so podvrženi hidrolizni in oksidativni razgradnji. Zaradi razpada kemijske strukture saponinov pri povišani temperaturi smo losjon izdelali tako, da smo saponine vključili v že ohlajeno zmes olja in vode. Vir saponinov in njihova čistota prav tako igrajo pomembno vlogo, kar pomeni da je zaradi različnih lastnosti saponinov potrebno upoštevati njihov rastlinski vir in stopnjo čistosti. Ekstrakti se lahko zelo razlikujejo v svoji kemijski sestavi, zato je zagotavljanje ustrezne kakovosti ključnega pomena. Kakovost saponinov lahko bistveno spremeni lastnosti emulzije. Ker so rastlinski ekstrakti zelo raznoliki, je v primeru komercialne uporabe smiselno spremljati kakovost in ponovljivost sestave ekstraktov s saponini.

5.2 Vrednotenje senzoričnih lastnosti

Senzorične lastnosti smo vrednotili po občutku. Zanimal nas je predvsem videz formulacij, ki je moral biti ustrezno homogen. To pomeni, da je morala biti izdelana formulacija bele barve, brez očitne ločitve faz, brez grudic in zračnih mehurčkov. Izdelane formulacije imajo tekočo do poltrdno konsistenco (konsistenca je odvisna od koncentracije TEGO Care CG 90[®]) in so mlečno bele barve. Ker formulacije ne vsebujejo dišav, imajo značilen vonj po cetostearolu. Formulacije s saponinom imajo manj neprijeten vonj, sicer značilen za saponine. Vzorec 80T je spremenil vonj, kar pomeni da je bil mikrobiološko nestabilen. Sicer se losjon lepo maže in razporeja po koži. Po nanosu pusti hladen in vlažilen občutek. Hitro se vpije in ne pušča lepljivega občutka.

5.3 Vrednotenje fizikalno-kemijskih lastnosti

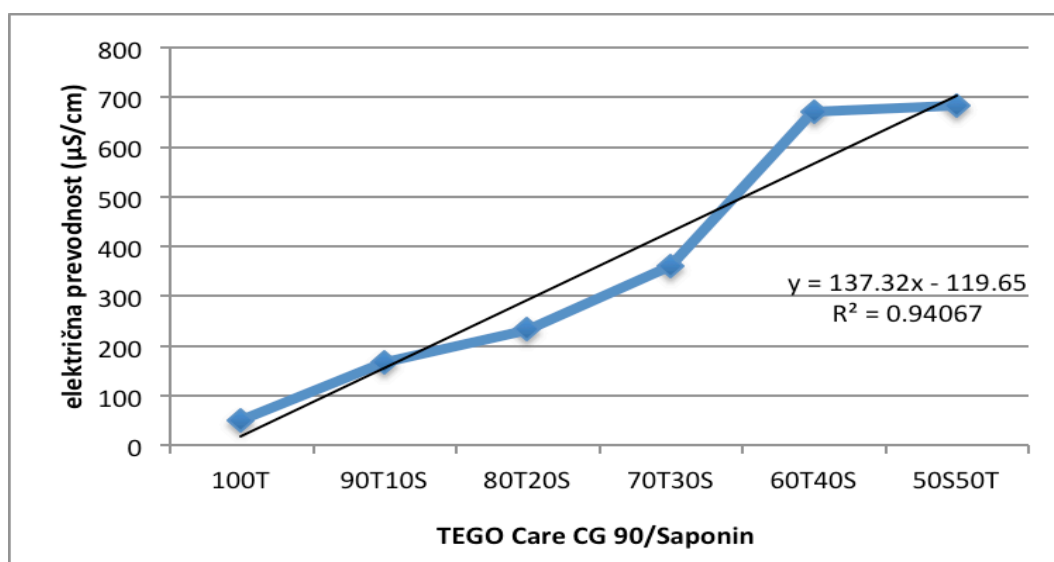
5.3.1 Električna prevodnost

Električno prevodnost merimo za ugotavljanje tipa emulzije. V primeru, da emulzija prevaja električni tok, je zunanja faza voda. To so emulzije tipa O/V. V primeru, da emulzija ne prevaja električnega toka, pa je zunanja faza olje in je to emulzija tipa V/O. V tabeli IV so podane meritve električne prevodnosti za posamezne vzorce. Vse formulacije so prevajale električni tok, kar pomeni, da so emulzije tipa O/V. Ta tip emulzije se meša z vodo in ima bolj hidrofilne lastnosti.

Tabela IV: Električna prevodnost vzorcev s saponini.

TEGO Care CG 90/Saponin	Električna prevodnost ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
100T	50
90T10S	167,9
80T20S	233
70T30S	360
60T40S	671
50S50T	684

Prav tako s slike 6 vidimo, da se je električna prevodnost povečevala sorazmerno z vsebnostjo saponina. Torej lahko sklepamo na prisotnost ionskih snovi, ki vplivajo na povečanje prevodnosti. Saponini so neionske snovi, vendar lahko vsebujejo nečistote, ki vplivajo na rezultate meritev.



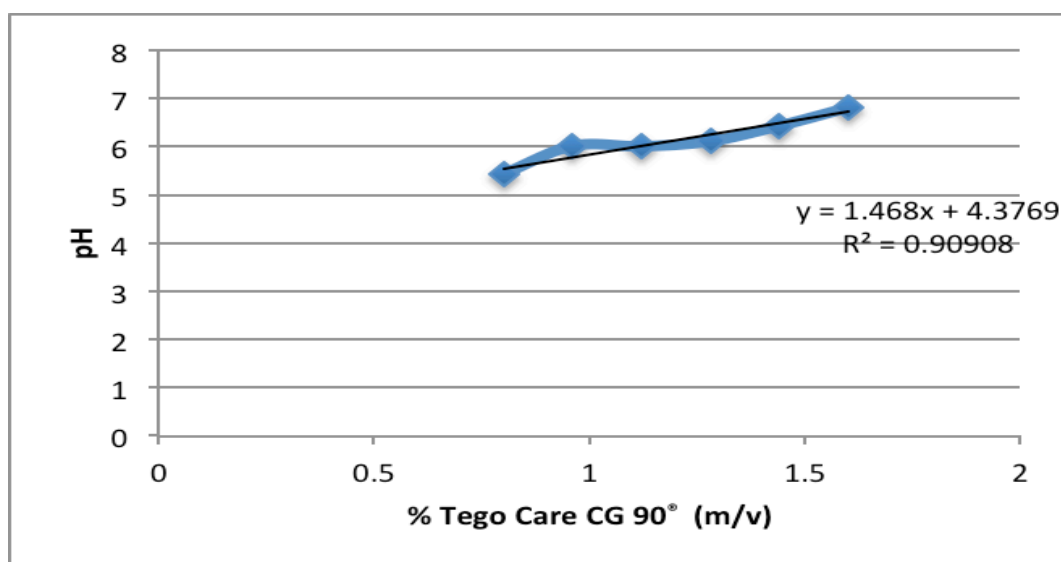
Slika 6: Odvisnost električne prevodnosti od razmerja med emulgatorjema.

5.3.2 pH vrednost

Za načrtovanje formulacij je pomemben vpliv posameznih sestavin na pH vrednost. Zato smo izmerili pH vodnim raztopinam saponina in vodnim raztopinam TEGO Care CG 90[®] v takšnih koncentracijah, kot smo jih sicer uporabili za izdelavo vzorcev. Vrednosti pH v odvisnosti od koncentracije vodne raztopine Tego Care CG 90[®] v vodni raztopini, so podane v tabeli V in grafično prikazane na sliki 7. Vse raztopine so rahlo kisle. Vodne raztopine s saponinom so bolj kisle, kot tiste s Tego Care CG 90[®].

Tabela V: pH vodne raztopine Tego Care CG 90[®].

% (m/v)	pH
1,6	6,813
1,44	6,436
1,28	6,115
1,12	6,008
0,96	6,018
0,8	5,441



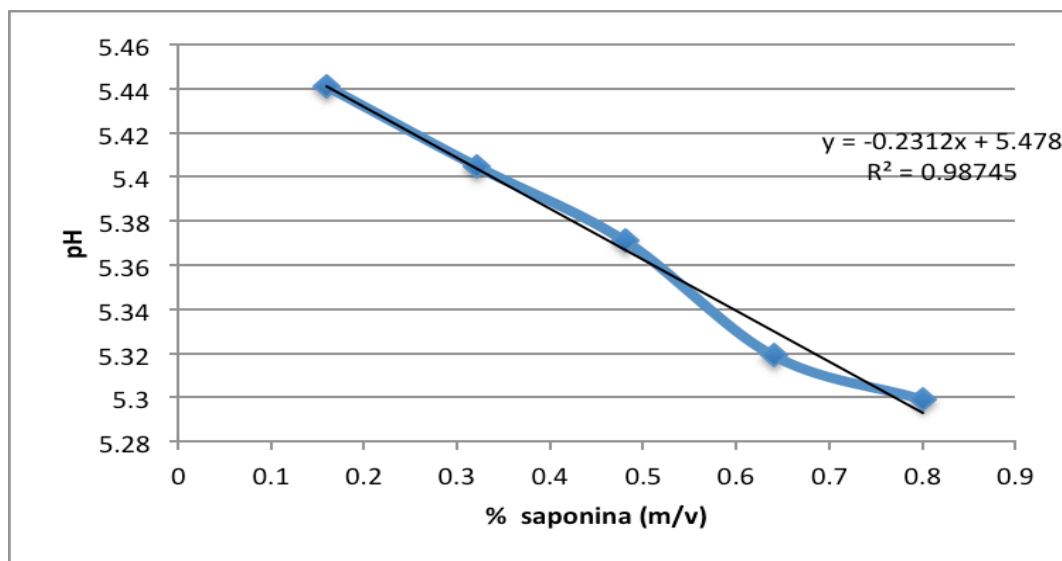
Slika 7: Odvisnost pH od koncentracije vodne raztopine Tego Care CG 90[®].

S slike 7 vidimo, da Tego Care CG 90[®] vpliva na povišanje pH. Večji kot je delež Tego Care CG 90[®], višji je pH. Vodne raztopine s koncentracijo od 0,8 % do 1,6 % so imele pH od 5,441 do 6,813. To pomeni, da je formulacijam, ki vsebujejo Tego Care CG 90[®], potrebno ustrezno znižati pH.

Tabela VI prikazuje vrednosti pH za vodne raztopine saponina. Na sliki 8 vidimo, da saponin vpliva na znižanje pH. Vodne raztopine s koncentracijo od 0,16 % do 0,8 % imajo pH med 5,4 in 5,3.

Tabela VI.: pH vodne raztopine saponina.

% (m/v)	pH
0,16	5,441
0,32	5,41
0,48	5,371
0,64	5,319
0,8	5,299



Slika 8: Odvisnost pH od vsebnosti saponina.

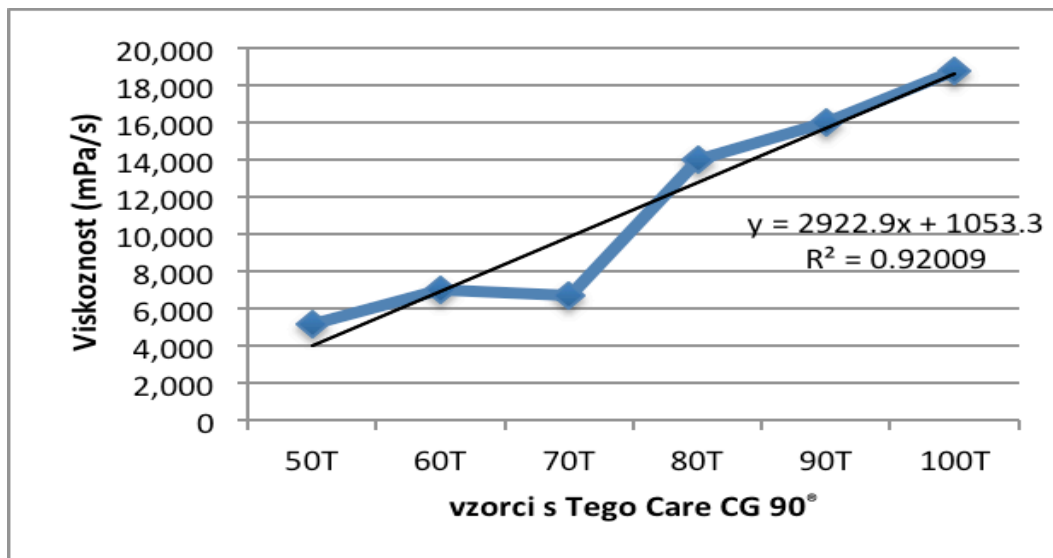
5.3.3 Reološke lastnosti

V tabeli VII so podane izmerjene vrednosti viskoznosti za posamezne vzorce.

Tabela VII: Viskoznost vzorcev.

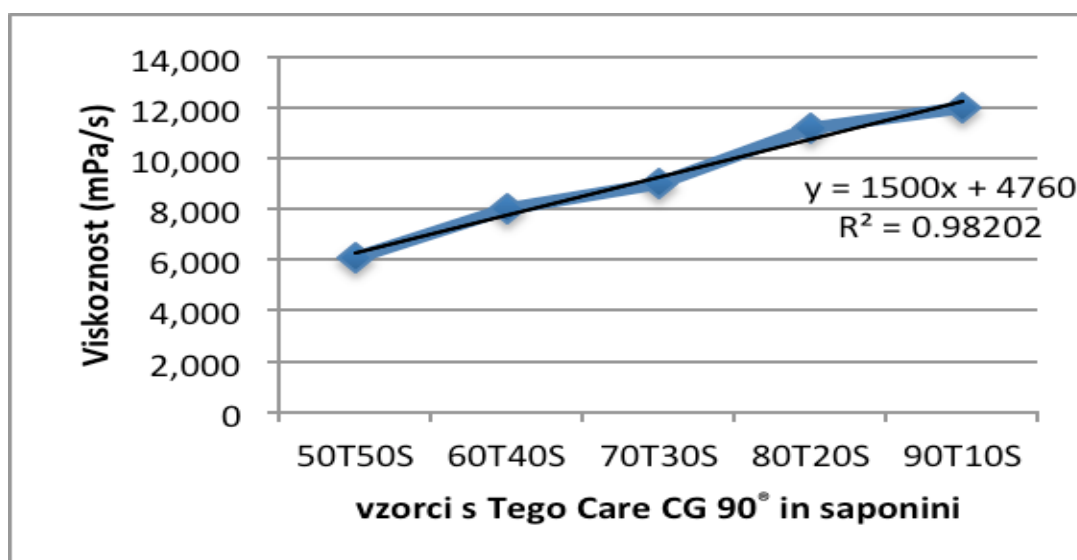
vzorec	Viskoznost (mPa/s)
100T	18.800
90T	16.000
80T	14.000
70T	6.700
60T	7.000
50T	5.200
90T10S	12.000
80T20S	11.200
70T30S	9.000
60T40S	8.000
50T50S	6.100

Na sliki 9 vidimo, da se je viskoznost povečevala z vsebnostjo TEGO Care CG 90[®], kar pomeni, da prispeva k povečani viskoznosti sistema in ima zato v formulaciji poleg emulgiranja tudi vlogo zgoščevala. Z dodatkom TEGO Care CG 90[®] se poveča viskoznost.

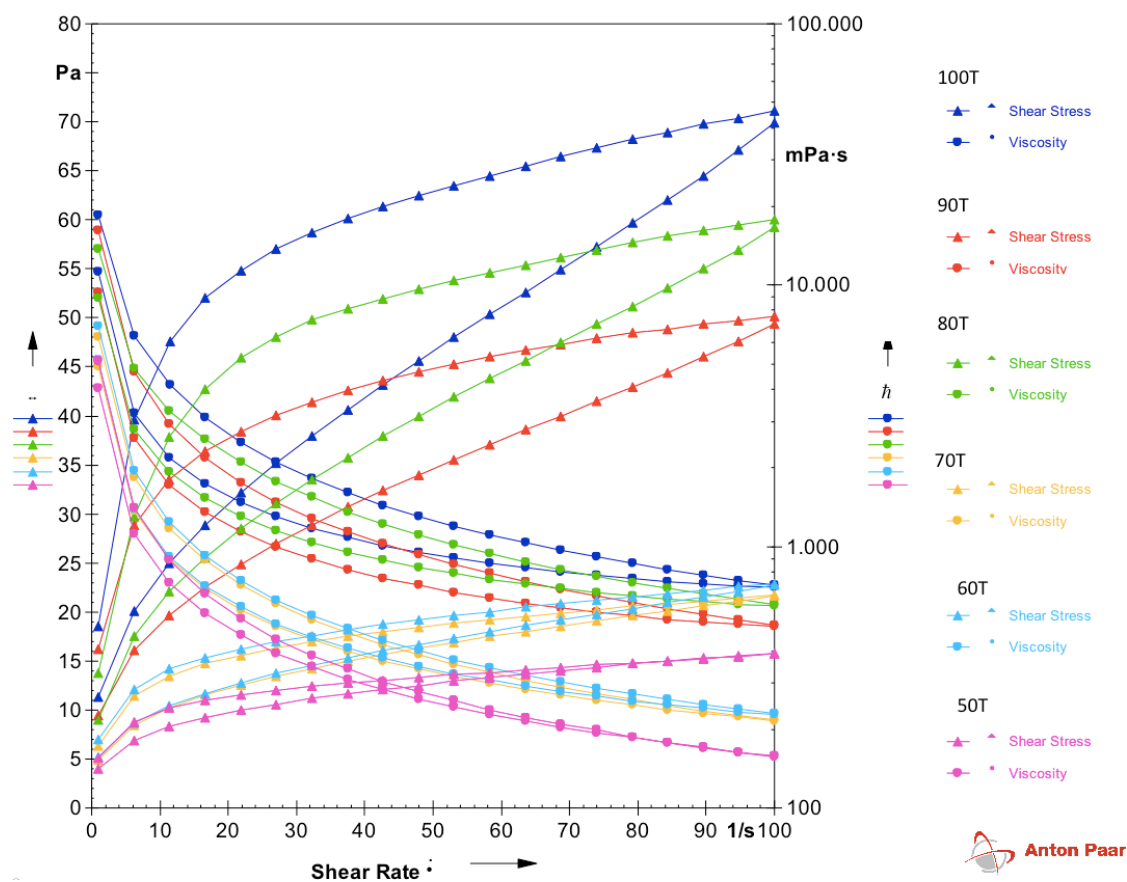


Slika 9: Viskoznost vzorcev v odvisnosti od sestave s TEGO Care CG 90[®].

Viskoznost je tudi pri vzorcih s TEGO Care CG 90[®] in saponinom naraščala linearno (slika 10), vendar je naraščala bolj počasi kot pri vzorcih le s TEGO Care CG 90[®]. Iz tega lahko sklepamo, da saponin ne prispeva k viskoznosti, medtem ko TEGO Care CG 90[®] prispeva k povečanju viskoznosti.



Slika 10: Odvisnost viskoznosti vzorcev od sestave vzorcev s TEGO Care CG 90[®] in saponini.

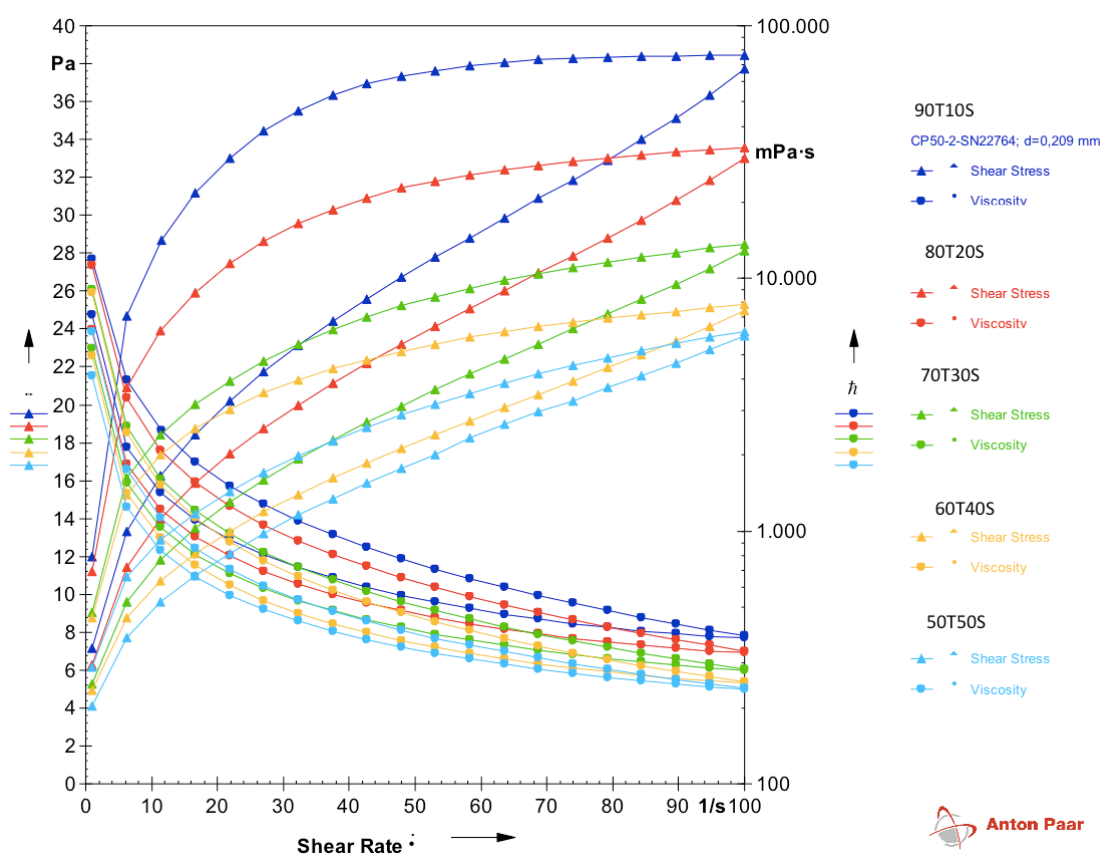


Slika 11: Reogram (odvisnost strižne napetosti od strižne hitrosti) in viskoznozna krivulja (odvisnost viskoznosti od strižne hitrosti) za vzorce z različno koncentracijo TEGO Care CG 90[®]. Reogram je označen s trikotniki in viskoznost s krogi.

S slike 11 vidimo, da viskoznost pada s povečevanjem strižne hitrosti. Pripravljene formulacije so ne-newtonski sistemi. Po obliki grafa izkazujejo psevdoplastične lastnosti z opazno tiksotropijo. Zunanja sila povzroči orientacijo kapljic vzdolž silnice, kar zmanjša trenje in vezi, ki so odgovorne za nastanek gelske rešetke se pretrgajo in rezultat je zmanjšanje viskoznosti. Po prenehanju zunanje sile se viskoznost počasi vrne v prvotno stanje, kar opisujemo kot tiksotropijo. Površina zanke je histereza, ki je merilo tiksotropije. Vzorce s TEGO Care CG 90[®] so psevdoplastični sistemi in imajo raznoliko stopnjo tiksotropije. Podatki o površini histerezne zanke so v tabeli VIII. Raznolika površina histerezne zanke je lahko posledica občutljivosti reometra. Spremembe v rezultatih meritev lahko nastanejo zaradi rokovanja z vzorcem (nanašanje vzorca na merilno površino) kot tudi zaradi različnih pogojev meritev (temperatura, vlaga).

Tabela VIII: Površina histerezne zanke pri posameznih vzorcih s TEGO Care CG 90[®]

vzorec	površina histerezne zanke (Pa/s)
100T	1445,14
90T	900,65
80T	1082,2
70T	188,03
60T	219,3
50T	81,09



Slika 12: Reogram (odvisnost strižne napetosti od strižne hitrosti) in viskoznozna krivulja (odvisnost viskoznosti od strižne hitrosti) za TEGO Care CG 90[®] in saponin. Reogram je označen s trikotniki in viskoznost s krogi.

Zgornji graf prikazuje reogram in viskoznozna krivuljo za vzorce z različnimi koncentracijami TEGO Care CG 90[®] in saponina. Tudi pri teh vzorcih opazimo zmanjšanje viskoznosti s povečevanjem strižne hitrosti. Vzorce imajo pseudoplastično obnašanje z opazno tiksotropijo. Podatki o površini histerezne zanke so v tabeli IX.

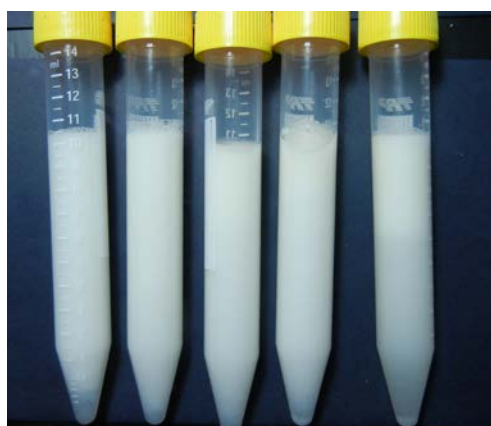
Tabela IX: Površina histerezne zanke pri posameznih vzorcih s TEGO Care CG 90[®] in saponinom

vzorec	površina histerezne zanke (Pa/s)
90T10S	870,96
80T20S	685,22
70T30S	444,67
60T40S	437,2
50T50S	233,42

5.4 Vrednotenje fizikalno-kemijske stabilnosti

5.4.1 Centrifugalni test

Za ugotavljanje podvrženosti formulacije k razslojevanju smo uporabili obremenilni test s pomočjo centrifuge. S tem testom lahko hitro in neposredno določimo stabilnost oziroma nestabilnost. Vzorci 1 do 5 so formulacije pripravljene s saponini, vzorci od 6 do 10 pa s TEGO Care CG 90[®] in saponini.



Slika 13: Formulacije s saponini.



Slika 14: Formulacije s TEGO Care CG 90[®].

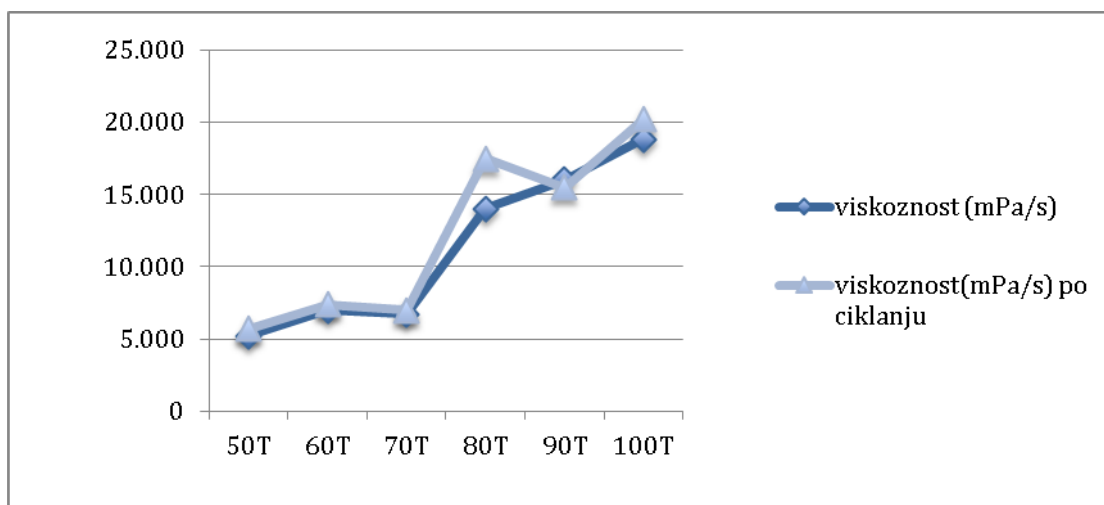
S tem testom se je kombinacija TEGO Care CG 90[®] in saponina pokazala kot bolj ugodna kot pri vzorcih, ki vsebujejo le TEGO Care CG 90[®]. Vzorci od 90T10S, 80T20S, 70T30S, 60T40S so stabilni, medtem ko je pri vzorcu 50T50S opazna delna razslojitev (spodnji del je bil rahlo bolj transparenten kot pri vzorcih 1-4). Vzorci 90T, 80T, 70T so stabilni, medtem ko je pri vzorcih 60T in 50T očitna razplastitev. Vzorca 60T in 50T vsebujeta manj kot 1 % TEGO Care CG 90[®]. Formulacija 60T40S sicer prav tako vsebuje manj kot 1

% TEGO Care CG 90[®], vendar je stabilna zaradi dodatka saponina (0,64 %). V tem primeru je kombinacija saponina in TEGO Care CG 90[®] dala pozitivne rezultate in kaže na to, da saponini pomagajo pri stabilizaciji emulzije.

5.4.2 Ciklični test

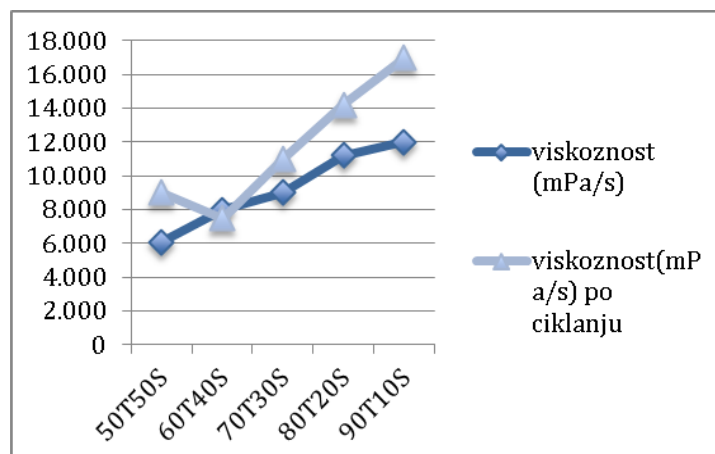
Vsi vzorci so bili po končanem ciklu spreminjanja temperature fizikalno stabilni, saj ni prišlo do ločitve faz. Na videz so ostali nespremenjeni: beli in homogeni. Vzorec 80T je spremenil vonj, iz česar sklepamo, da je prišlo do mikrobiološke kontaminacije. Drugi vzorci so ostali nespremenjeni.

Rezultati reoloških meritev s TEGO Care CG 90[®] po končani ciklični obremenitvi so prikazani na sliki 15. Viskoznost vzorcev s TEGO Care CG 90[®] se ni spremenila tudi po koncu testa. Rahlo odstopanje vzorca 80T od krivulje bi lahko pripisali mikrobiološki kontaminaciji, ki je opazna na vrhu vzorca.



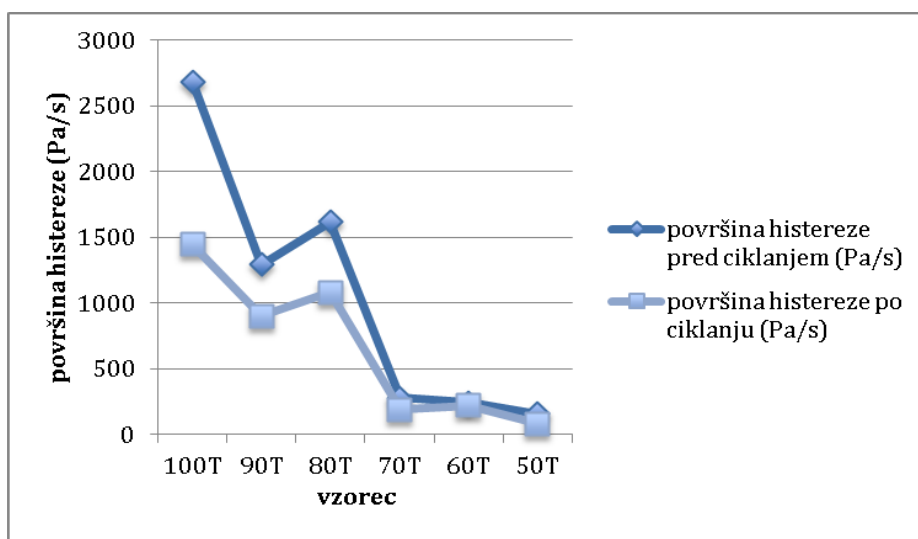
Slika 15: Viskoznost vzorcev s TEGO Care CG 90[®] pred in po ciklanju.

Viskoznost vzorcev s TEGO Care CG 90[®] in saponinom se je po ciklični obremenitvi povečala, kar prikazuje slika 16. To povečanje sicer ni zelo veliko, vendar kaže na to, da so vzorci po obremenitvi spremenili notranjo strukturo. To povečanje je opazno le pri vzorcih s saponini in ne pri vzorcih, ki vsebujejo TEGO Care CG 90[®]. Celotno povečanje viskoznosti po končani ciklični obremenitvi prikazuje zaželeno notranje strukturiranje in naznanjuje dolgoročno stabilnost testiranih vzorcev (21).



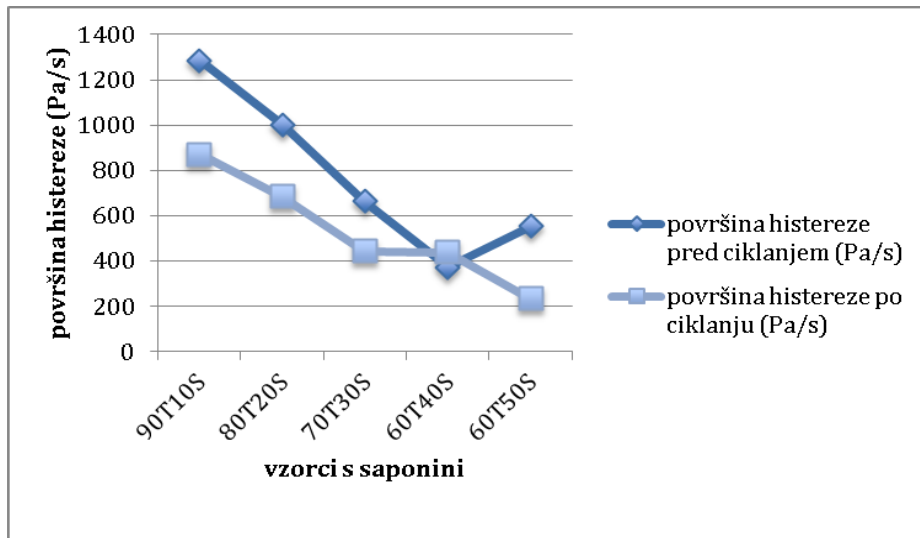
Slika 16: Viskoznost vzorcev s TEGO Care CG 90[®] in saponinom pred in po ciklični obremenitvi.

Na sliki 17 je prikazana površina histerezne zanke v odvisnosti od koncentracije Tego Care CG 90[®]. Vidimo, da se je površina histereze zmanjševala. Po cikličnem testu so vzorci 100T, 90T, 80T pokazali zmanjšanje histereze, medtem ko se pri vzorcih 70T, 60T in 50T ni pokazala nobena sprememba v površini histereze.

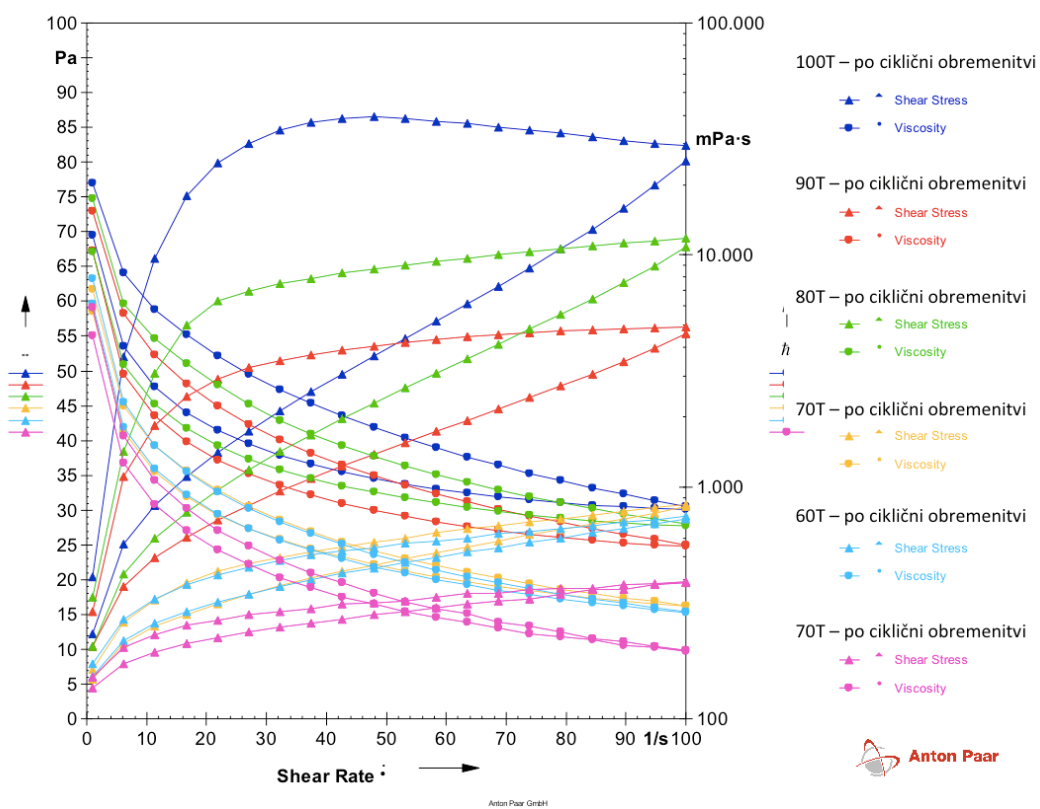


Slika 17: Površina histerezne zanke za vzorce, ki vsebuje s Tego Care CG 90[®].

Na sliki 18 vidimo, da se tudi pri vzorcih s saponini, površina histerezne zanke po ciklični obremenitvi zmanjša. Verjetno na račun Tego Care CG 90, kot je razvidno iz slike 17. Histerezna zanka vzorca 60T40S ni spremenila površin, iz česar lahko sklepamo na ugodno notranjo strukturo, na katero temperaturna obremenitev nima vpliva.

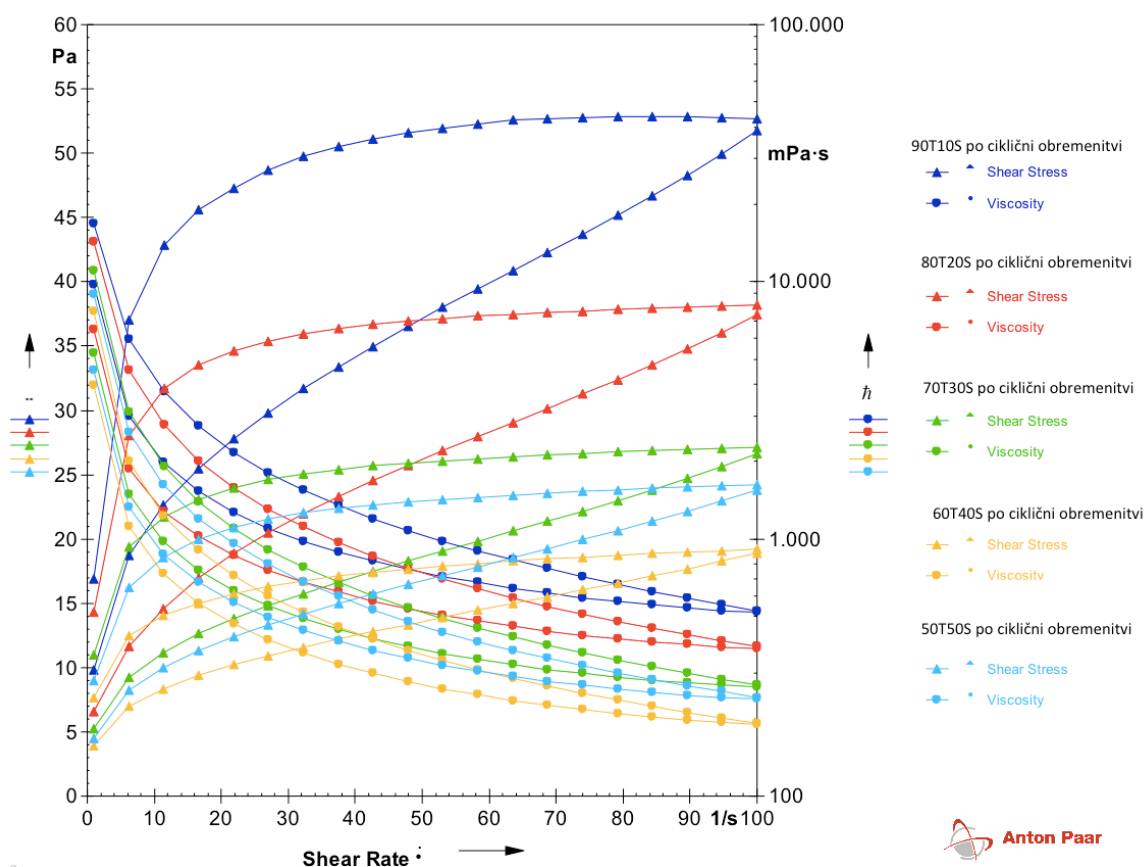


Slika 18: Površina histerezne zanke za vzorce, ki vsebuje kombinacijo Tego Care CG 90[®] s saponini.



Slika 19: Reogram (odvisnost strižne napetosti od strižne hitrosti) in viskoznostna krivulja (odvisnost viskoznosti od strižne hitrosti) za vzorce z različno koncentracijo TEGO Care CG 90[®] po cikličnem testu. Reogram je označen s trikotniki in viskoznost s krogi.

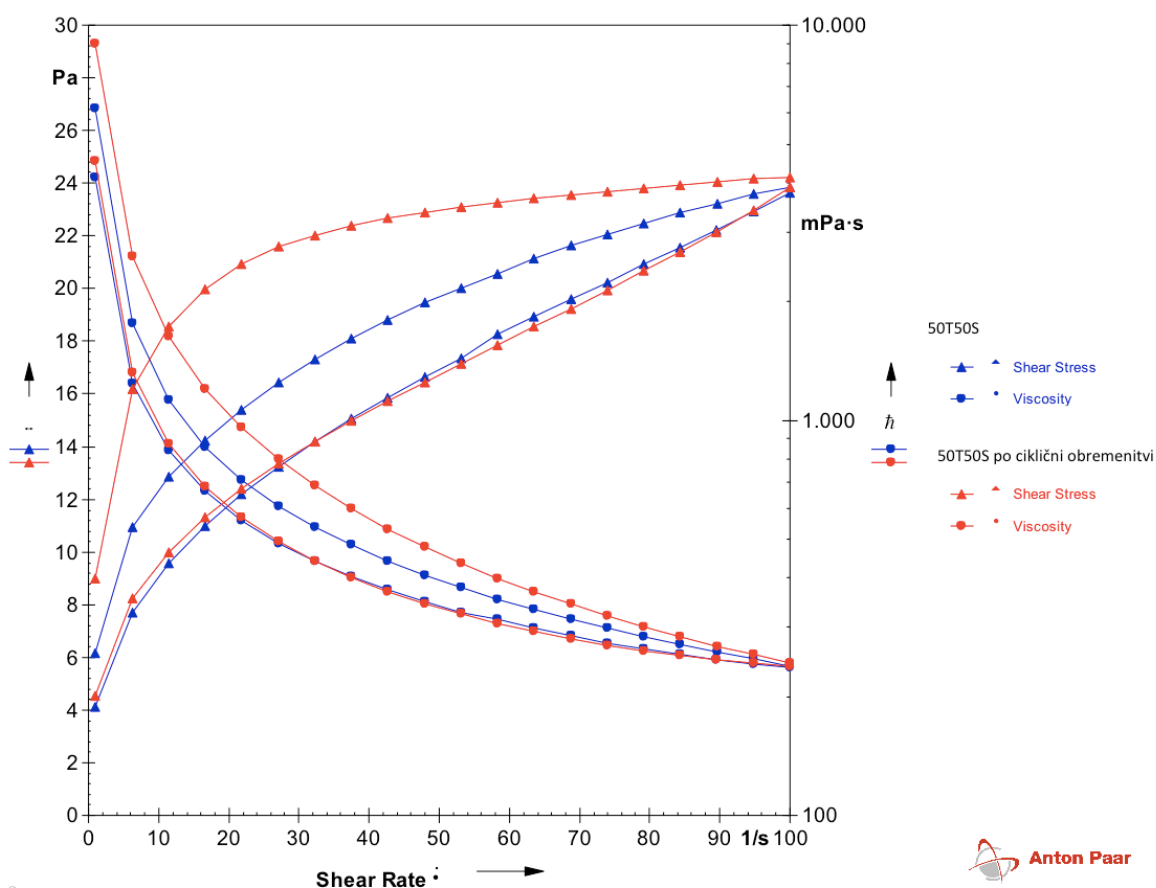
Na sliki 19 vidimo, da izstopa vzorec 80T, ki bi po pričakovanjih imel nižjo viskoznost od vzorca 90T. Kot smo že omenili, je pri vzorcu 80T prišlo do kontaminacije, kar verjetno vpliva na rezultate. Vzorci so pokazali enako obnašanje kot pred ciklično obremenitvijo. To je ugodno, saj nakazuje da je sistem ostal stabilen tudi po končanem ciklu temperaturne obremenitve.



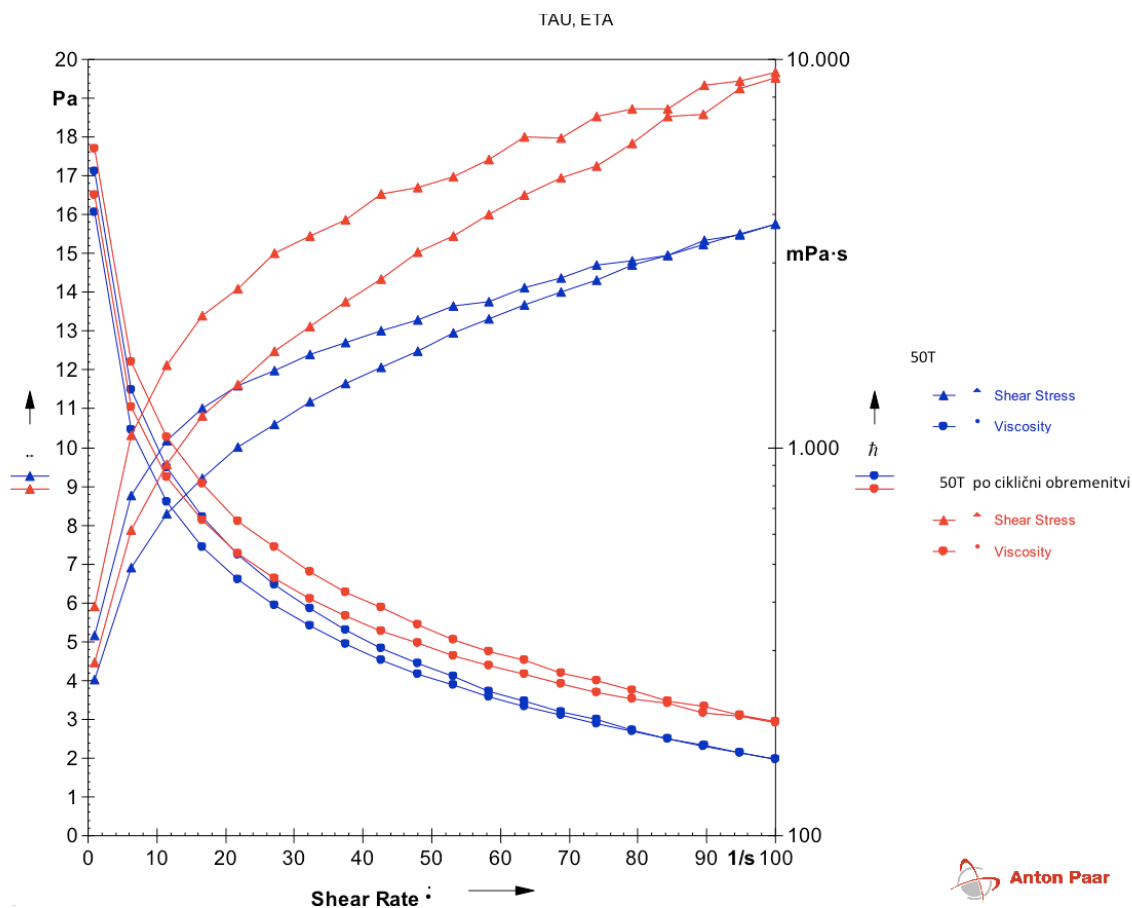
Slika 20: Reogram (odvisnost strižne napetosti od strižne hitrosti) in viskoznoznostna krivulja (odvisnost viskoznosti od strižne hitrosti) za vzorce z različnimi razmerji med TEGO Care CG 90[®] in saponinom po cikličnem testu. Reogram je označen s trikotniki in viskoznost s krogi.

Slika 20 prikazuje reogram in viskoznoznostno krivuljo vzorcev z različnimi razmerji med Tego Care CG 90[®] in saponinom. Vidimo, da vsi vzorci izkazujejo enako obnašanje in nobeden ne izstopa tako kot pri vzorcih, ki so vsebovali samo Tego Care CG 90[®]. Rezultati kažejo na stabilno notranjo strukturo, ki se ni spremenila po ciklu temperaturne obremenitve.

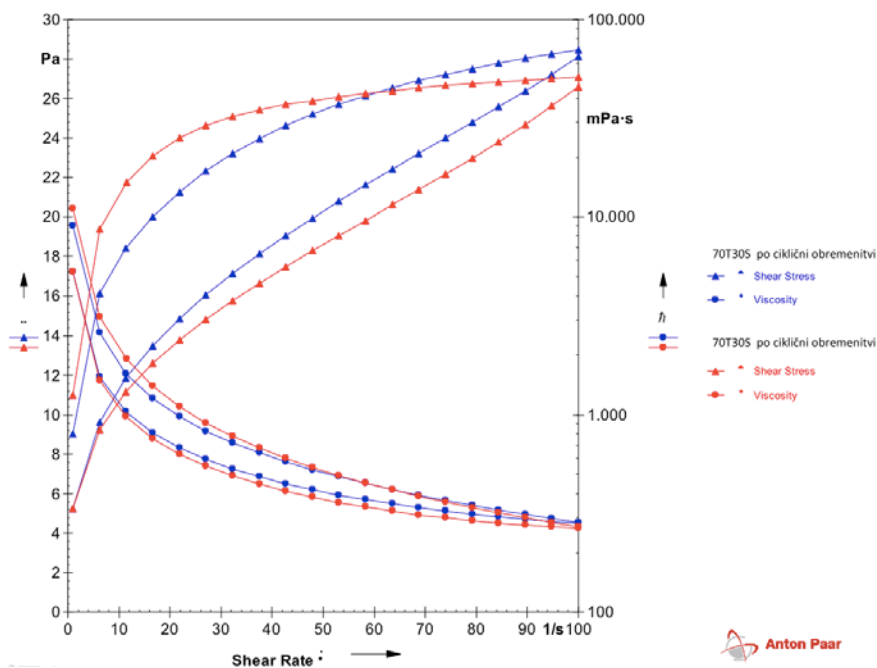
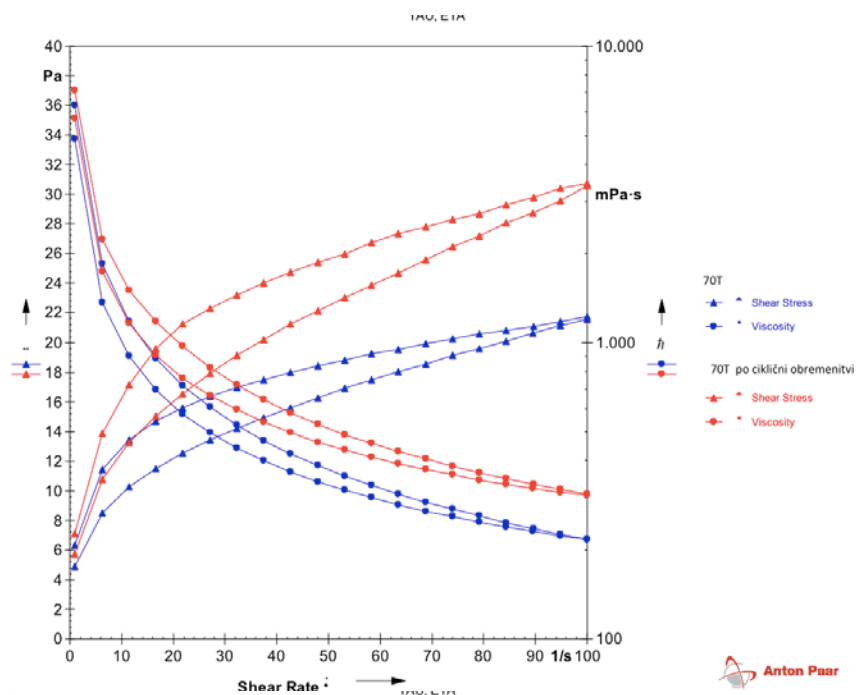
Na slikah 21-24 so prikazani posamezni reogrami za različne vzorce, katerih namen je primerjava med vzorci, ki vsebujejo Tego Care CG 90[®] in saponin in vzorci, ki vsebuje samo Tego Care CG 90[®]. Slika 22 prikazuje neugodno notranjo strukturo vzorca 50T po ciklanju (nagubana rdeča krivulja), medtem ko vzorec 50T50S ni spremenil strukture pred in po končanem ciklu. To kaže na boljšo stabilnost vzorca 50T50S v primerjavi s TEGO Care CG 90[®].



Slika 21: Reogram (odvisnost strižne napetosti od strižne hitrosti) in viskoznostna krivulja (odvisnost viskoznosti od strižne hitrosti) za vzorec 50T50S pred in po ciklični obremenitvi. Reogram je označen s trikotniki in viskoznost s krogi.



Slika 22: Reogram (odvisnost strižne napetosti od strižne hitrosti) in viskoznostna krivulja (odvisnost viskoznosti od strižne hitrosti) za vzorec 50T pred in po ciklični obremenitvi. Reogram je označen s trikotniki in viskoznost s krogi.



Slika 23 in 24 : Reogram (odvisnost strižne napetosti od strižne hitrosti) in viskoznostna krivulja (odvisnost viskoznosti od strižne hitrosti) za vzorca (levo:70T in desno: 70T30S) pred in po ciklični obremenitvi. Reogram je označen s trikotniki in viskoznost s krogi.

Iz slike 23 in 24 lahko vidimo, da se vzorec 70T30S viskoznost pred ciklanjem in po ciklanju ne razlikuje toliko kot pri vzorcu 70T. Tudi tukaj lahko sklepamo na boljšo stabilnost formulacije 70T30S v primerjavi s formulacijo 70T, ki vsebuje le TEGO Care CG 90®.

6 SKLEP

Uspelo nam je izdelati stabilen losjon za telo na osnovi naravnih sestavin. Ker ni standardnih protokolov za vrednotenje kozmetičnih izdelkov, smo sledili smernicam kozmetične industrije. Centrifugalni test se je izkazal kot hiter in učinkovit test določanja fizikalne stabilnosti. Veliko različic osnovne formulacije se je razplastilo, preden smo dobili optimalno varianto formulacije. Ugotovili smo, da so vzorci s kombinacijo saponinov in TEGO Care CG 90[®] bolj stabilni po končani ciklični obremenitvi kot vzorci, ki vsebujejo samo TEGO Care CG 90[®]. Izkazalo se je, da imajo vzorci s kombinacijo obeh emulgatorjev bolj stabilno notranjo strukturo, ki se ne spremeni tudi po ciklični temperaturni obremenitvi. Za določanje ustreznega razmerja obeh emulgatorjev je potreben kompromis, saj večji delež TEGO Care CG 90[®] vpliva na viskoznost in posledično tudi na obliko izdelka (losjon, krema).

Pri delu smo uporabljali visoko prečiščene saponine, ki jih uporabljajo v molekularni biologiji. Te sestavine so zelo drage in sicer niso najbolj primerne za komercialno uporabo. To je verjetno razlog, da na tržišču ni formulacij, ki bi vsebovale visoke deleže saponinov. Smiselno bi bilo uporabiti rastlinske ekstrakte (manjše čistote), ki so cenejši, vendar njihova sestava lahko variira (vrsta rastline, vrsta topila idr.), kar lahko negativno vpliva na kakovost kozmetičnega izdelka. Ravno ponovljivost je na področju naravne kozmetike problem, saj je kemijska sestava naravnih sestavin tako zelo spremenljiva. Ugotovili smo, da so saponini učinkoviti emulgatorji v kombinaciji s Tego Care CG 90[®] in uspešno smo stabilizirali emulzijo s kombinacijo obeh. Saponini sicer nastopajo v čistilnih proizvodih zaradi penilnih lastnosti, vendar jih lahko dodajamo tudi v negovalne izdelke, kot so losjoni in kreme. Ekstrakti s saponini so dobrodošli kot dodatek v kozmetičnih izdelkih tudi z namenom aktivnega delovanja. Saponini so inovativna kozmetična sestavina s široko izbiro uporabe v kozmetičnih pripravkih.

7 LITERATURA

1. Dayan N, Kromidas L: Formulating, packaging, and marketing of natural cosmetic products, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2011: 3-25.
2. Rhein D. L, O'Lenick A, Somasundaran P: Surfactants in Personal Care Products and Decorative Cosmetics, Third Edition, CRC Press, New York, 2012: 149-150.
3. McClements D. J: Critical Review of Techniques and methodologies for characterization of emulsion stability, Critical reviews in food science and nutrition, 2007; 47.7:611-49.
4. Hadi J. N, Norazian M. H, Ahmad K: Natural surfactants for pharmaceutical emulsions:
http://irep.iium.edu.my/14524/1/CHAPTER_10_Natural_surfactants_for_pharmaceutical_emulsions.pdf (datum dostopa 30.5.2014)
5. Bancroft rule: http://en.wikipedia.org/wiki/Bancroft_rule (datum dostopa 15.5. 2014)
6. Stability testing: <http://www.zenitech.com/documents/Stability%20Testing.pdf> (datum dostopa 15.5.2014)
7. Stability test method: <http://www.obeliscosmetics.net/eu-directive/stability-test-test-method/> (datum dostopa 1.4.2014)
8. Đorđević M. S., Cekić D. N., Isailović M.T.: Nanoemulzije dobijene variranjem tipa emulgatora I udela masne faze: Uticaj formulacije I procesnih parametara na karakterisike i fizičku stabilnost, Hem. Ind., 2013, 67: 795-809.
9. Menard K: Application of the SR5 rheometer for the cosmetic and personal products industries, PerkinElmer, Inc., USA (www.perkinelmer.com)
10. Romanowski P, Schuller R: Beginning cosmetic chemistry Third edition, Allured Bussines Media, IL USA, 2009: 241-249
11. Becher P: Emulsions: Theory and practice, Reinhold publishing corporation, New York, 1966: 60-65.
12. Yang Y, E. Leser M, A. Sher A, McClements D. J: Formation and stability of emulsion using a natural small molecule surfactant: Quillaja Saponin (Q-Naturale ®). Food Hydrocolloids 2013; 30: 589-596.
13. Burlando B, Verotta I, Cornara L, Bottini-Massa E: Herbal principles in cosmetics, CRC Press, New York, 2010: 11-33.
14. Thakur M, Fmelzig M, Fuchs H, Weng A: Chemistry and pharmacology of saponins:

- special focus on cytotoxic properties. *Botanics: Targets and Therapy* 2011; 1: 19-29.
15. Özlem G, Mazza G: Saponins: Properties, Applications and Processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2007; 47:231-258.
 16. San Martín R, Briones R: Industrial uses and sustainable supply of *Quillaja saponaria* (Rosaceae) saponins. *Economic Botany* 1999; 53(3): 302-311.
 17. Mitra S, Dungan S. R: Cholesterol solubilization in aqueous micellar solutions of quillaja Saponin, bile salts, or nonionic surfactants. *J Agric Food Chem* 2001; 49: 384-394.
 18. [http://openwetware.org/wiki/Critical_micelle_concentration_\(CMC\)](http://openwetware.org/wiki/Critical_micelle_concentration_(CMC)) (datum dostopa 15.5. 2014)
 19. Rigano L, Lionetti N, Otero R, Quillaja triterpenic saponins-the natural foamers, *SOFW Journal*, 2009; 4: 3-9.
 20. Quillaja saponin: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/r?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+2171> (datum dostopa 1.4.2015)
 21. Gilbert L, Picard C, Savary G, Grisel M: Rheological and textural characterization of cosmetic emulsions containing natural and syntetic polymers: relationship between both data, *Colloids and Surfaces: Physicochem. Eng. Aspects* 421 (2013): 150-163.