

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za farmacijo



DAŠA PAVC

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2014

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za farmacijo



DAŠA PAVC

DOLOČANJE VSEBNOSTI KOENCIMA Q₁₀ V KOZMETIČNIH
IZDELKIH

DETERMINATION OF CONTENT OF COENZYME Q₁₀ IN
COSMETIC PRODUCTS

Ljubljana, 2014

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Jožka Cesarja.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Jožku Cesarju za strokovne nasvete in vso pomoč pri izdelavi diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi staršem za moralno in finančno podporo v času študija in vsem drugim, ki so me podpirali in mi stali ob strani.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja doc. dr. Jožka Cesarja.

Daša Pavc

Ljubljana, 2014

VSEBINA

VSEBINA	III
KAZALO SLIK	V
KAZALO GRAFOV	VI
KAZALO DIAGRAMOV	VI
KAZALO TABEL	VI
POVZETEK	VII
ABSTRACT	VIII
SEZNAM OKRAJŠAV	IX
1. UVOD	1
1.1 KOŽA.....	1
1.1.1 Zgradba in funkcija kože.....	2
1.1.2 Staranje kože	2
1.1.3 UV sevanje in fotostaranje kože.....	3
1.2 REAKTIVNE ZVRSTI	4
1.2.1 Oksidativni stres	5
1.3 ANTIOKSIDANTI	5
1.3.1 Antioksidanti v kozmetiki	6
1.3.2 Koencim Q ₁₀	6
1.4 KOZMETIČNI IZDELKI	8
1.4.1 Vrste kozmetičnih izdelkov.....	8
1.4.2 Stabilnost kozmetičnih izdelkov	9
1.5 VALIDACIJA ANALIZNE METODE	10
1.5.1 Točnost (pravilnost)	10
1.5.2 Natančnost, preciznost	11
1.5.3 Specifičnost	11
1.5.4 Meja zaznave.....	11
1.5.5 Meja določitve.....	11
1.5.6 Linearnost.....	11
1.5.7 Območje metode	12
1.5.8 Robustnost.....	12
2. NAMEN DELA	13
3. MATERIALI IN METODE	14
3.1 MATERIALI.....	14
3.1.1 Reagenti in topila	14
3.1.2 Aparature.....	14
3.1.3 Standardi.....	14

3.1.4 Vzorci	15
3.2 METODE	18
3.2.1 Priprava topil za vzorce	18
3.2.2 Priprava raztopine standarda CoQ ₁₀ ; RS _{Q₁₀}	18
3.2.3 Priprava raztopin vzorcev za preliminarno oceno vsebnosti CoQ ₁₀ ("screening")	19
3.2.4 Priprava raztopin vzorcev za določanje vsebnosti CoQ ₁₀	19
3.2.5 Priprava raztopin standarda in vzorcev za verifikacijo metode določanja vsebnosti CoQ ₁₀	20
3.2.6 Umetno staranje vzorcev za preverjanje stabilnosti	21
3.2.7 Kromatografski pogoji za določanja vsebnosti	21
3.2.8 Določanje vsebnosti CoQ ₁₀	21
4. REZULTATI	23
4.1 VERIFIKACIJA METODE DOLOČANJA KOENCIMA Q ₁₀ V KOZMETIČNIH IZDELKIH	23
4.1.1 Natančnost metode	23
4.1.2 Točnost metode	24
4.1.3 Območje linearnosti metode	26
4.2 VSEBNOST KOENCIMA Q ₁₀ V KOZMETIČNIH IZDELKIH	27
4.2.1 Vsebnost koencima Q ₁₀ v kozmetičnih izdelkih	27
4.2.2 Stabilnost koencima Q ₁₀	28
5. RAZPRAVA	29
5.1 OPTIMIZACIJA IN VERIFIKACIJA ANALIZNE METODE DOLOČANJA CoQ ₁₀ V KOZMETIČNIH IZDELKIH	29
5.1.1 Optimizacija postopka priprave raztopin vzorcev in standardov	29
5.1.2 Optimizacija kromatografskih pogojev	31
5.2 PRIMERJAVA VSEBNOSTI KOENCIMA Q ₁₀ V KI	31
5.2.1 Primerjava vseh analiziranih KI	31
5.2.2 Primerjava vsebnosti koencima Q ₁₀ med različnimi KI istega proizvajalca	32
5.2.3 Primerjava vsebnosti koencima Q ₁₀ glede na vrsto KI in ceno	34
6. SKLEP	38
7. LITERATURA	39
PRILOGE	42
PRILOGA 1: KROMATOGRAMI VZORCEV	42

KAZALO SLIK

Slika 1: Zgradba kože (4)	2
Slika 2: Proces staranja kože s tanjšanjem in pojavom starostnih znamenj (2)	3
Slika 3: Koencim Q ₁₀ (27).....	7
Slika 4: Redukcija ubikinona preko semikinona do ubikinola (33)	7
Slika 5: Kromatogram raztopine vzorca, pripravljenega s topilom 1 (zgoraj) in s topilom 2 (spodaj).....	30
Slika 6: Kromatogram raztopine vzorca, pripravljenega s topilom 2 (zgoraj) in s topilom 3 (spodaj).....	30
Slika 7: Kromatogram vzorca 1 (NIVEA Body performance Mleko za telo Q ₁₀).....	42
Slika 8: Kromatogram vzorca 2 (NIVEA Losjon za telo Q ₁₀ performance).....	42
Slika 9: Kromatogram vzorca 3 (NIVEA Body performance Olje za prožnostno kožo Q ₁₀).....	42
Slika 10: Kromatogram vzorca 4 (NIVEA Krema za roke s Q ₁₀ proti staranju)	42
Slika 11: Kromatogram vzorca 5 (NIVEA Visage Q ₁₀ plus Dnevna krema)	43
Slika 12: Kromatogram vzorca 6 (NIVEA Visage Q ₁₀ plus Nočna krema)	43
Slika 13: Kromatogram vzorca 7 (NIVEA Visage Q ₁₀ plus Gel serum za obraz).....	43
Slika 14: Kromatogram vzorca 8 (NIVEA Visage Q ₁₀ Krema za predel okoli oči s kroglico)	43
Slika 15: Kromatogram vzorca 9 (CADEAVERA Vital Dnevna krema proti gubicam s Q ₁₀).....	44
Slika 16: Kromatogram vzorca 10 (CADEAVERA Vital Nočna krema proti gubicam s Q ₁₀).....	44
Slika 17: Kromatogram vzorca 11 (CADEAVERA Vital Krema za predel okoli oči proti gubicam s Q ₁₀)	44
Slika 18: Kromatogram vzorca 12 (CADEAVERA Vital Serum proti gubicam s Q ₁₀).....	44
Slika 19: Kromatogram vzorca 13 (CADEAVERA Vital Kapsule proti gubicam s Q ₁₀) ..	45
Slika 20: Kromatogram vzorca 14 (CADEAVERA Vital Ampula s takojšnjim učinkom) ..	45
Slika 21: Kromatogram vzorca 15 (CADEAVERA Vital Maska proti gubam z Q ₁₀).....	45
Slika 22: Kromatogram vzorca 16 (CADEAVERA Vital Maska proti gubicam s Q ₁₀ za predel okoli oči).....	45
Slika 23: Kromatogram vzorca 17 (SEBAMED Anti-ageing Losjon za čvrsto kožo).....	46
Slika 24: Kromatogram vzorca 18 (SEBAMED Anti-ageing Krema Q ₁₀ za obnovitev kože)	46
Slika 25: Kromatogram vzorca 19 (SEBAMED Anti-ageing Krema za oči).....	46
Slika 26: Kromatogram vzorca 20 (DECLARE Age control Krema s Q ₁₀)	46
Slika 27: Kromatogram vzorca 21 (EVELINE Anti-Wrinkles Krema proti gubam okoli oči).....	47
Slika 28: Kromatogram vzorec 22 (SCHAEBENS Koncentrat za zrelo kožo s Q ₁₀)	47
Slika 29: Kromatogram vzorca 23 (KAMILL Krema za roke in nohte anti age z Q ₁₀).....	47
Slika 30: Kromatogram vzorca 24 (AVEO Krema za roke Anti age Q ₁₀	47

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Točnost metode določanja vsebnosti CoQ ₁₀	25
Graf 2: Območje linearnosti metode določanja vsebnosti CoQ ₁₀	26
Graf 3: Odstopanje izračunanega odziva od izmerjenega odziva.....	26

KAZALO DIAGRAMOV

Diagram 1: Primerjava vsebnosti CoQ ₁₀ v vseh vzorcih	31
Diagram 2: Primerjava vsebnosti CoQ ₁₀ v KI proizvajalca NIVEA.....	32
Diagram 3: Primerjava vsebnosti CoQ ₁₀ blagovne znamke CADEAVERA	33
Diagram 4: Primerjava vsebnosti CoQ ₁₀ v KI proizvajalca SEBAMED	34
Diagram 5: Primerjava vsebnosti CoQ ₁₀ v KI za nego telesa	34
Diagram 6: Primerjava vsebnosti CoQ ₁₀ v kremah za roke	35
Diagram 7: Primerjava vsebnosti CoQ ₁₀ v kremah in maski za nego obraza različnih proizvajalcev	35
Diagram 8: Primerjava vsebnosti CoQ ₁₀ v kremah in maski za predel okoli oči	36
Diagram 9: Primerjava vsebnosti CoQ ₁₀ v serumih in koncentratih.....	37
Diagram 11: Primerjava vsebnosti CoQ ₁₀ v enoodmernih kozmetičnih oblikah.....	37

KAZALO TABEL

Tabela I: Spekter UV svetlobe in nekateri biološki učinki na kožo	4
Tabela II: Analizirani kozmetični izdelki.....	15
Tabela III: Uporabljena topila in njihova sestava.....	18
Tabela IV: Pregled postopka priprave raztopin vzorcev	19
Tabela V: Ponovljivost kromatografskega sistema za raztopino standarda	23
Tabela VI: Natančnost metode pri določanju vsebnosti CoQ ₁₀ v vzorcu 1	23
Tabela VII: Točnost metode za določanje CoQ ₁₀ v emulziji	24
Tabela VIII: Točnost metode v vzorcu z večjim deležem vodne faze	24
Tabela IX: Točnost metode v vzorcu z večjim deležem oljne faze.....	25
Tabela X: Vsebnost CoQ ₁₀ v vzorcih.....	27
Tabela XI: Vsebnost CoQ ₁₀ tekom staranja v klimatski komori.....	28
Tabela XII: Vsebnost CoQ ₁₀ v vzorcih brez in s segrevanjem	31

POVZETEK

Danes imamo na trgu kozmetičnih izdelkov na voljo številne formulacije namenjene ohranjanju mladostnega videza in odpravljanju znakov zgodnjega staranja kože. Med pogosto uporabljanimi kozmetično aktivnimi učinkovinami v takih izdelkih najdemo tudi koencim Q_{10} .

Koencim Q_{10} je lipofilna molekula, naravno prisotna v vseh človeških celicah, kjer sodeluje pri proizvodnji energije (tvorbi molekul ATP). Zaradi zmožnosti nevtralizacije prostih radikalov ima tudi antioksidativne lastnosti.

V okviru diplomske naloge smo določali vsebnost koencima Q_{10} v 24 kozmetičnih izdelkih z visokoločljivostno tekočinsko kromatografijo (HPLC). Izbrali smo različne vrste kozmetičnih izdelkov različnih proizvajalcev in cenovnih razredov, pri vseh pa je bil Q_{10} podarjen že v imenu oziroma na embalaži. Izhajali smo iz metode za določanje vsebnosti Q_{10} monografije v ameriški farmakopeji (USP), ki smo jo prilagodili našim vzorcem in potrdili njeno ustreznost.

Vsebnost koencima Q_{10} smo določili v 23 vzorcih, pri enem pa je bila prenizka (ali pa ga sploh ni vseboval). Vsebnosti, ki smo jih določili v posameznih izdelkih, so bile v območju od 30 $\mu\text{g/g}$ do 700 $\mu\text{g/g}$. Pri nekaterih proizvajalcih je vsebnost precej odvisna od vrste kozmetičnega izdelka. Tako imajo izdelki za nego telesa (losjon, mleko, olje za telo) nižje vsebnosti Q_{10} od izdelkov za nego obraza. Pri drugih pa so te razlike manj izražene in so vsebnosti v različnih izdelkih podobne. Cena izdelkov ni povezana z vsebnostjo učinkovine, pač pa bolj s samo blagovno znamko, znotraj te pa z vrsto izdelka.

V treh izdelkih smo ovrednotili tudi stabilnost koencima Q_{10} po 2 in 4 tednih staranja v stabilnostni komori pri povišani temperaturi in relativni vlažnosti. V tem času ni prišlo do sprememb v izgledu ali v vsebnosti.

Ključne besede: staranje kože, kozmetični izdelki, koencim Q_{10} , visokoločljivostna tekočinska kromatografija, stabilnost

ABSTRACT

Various cosmetic products on the market claim to have anti-aging properties and to preserve youthful appearance. Coenzyme Q₁₀ is one of the most commonly used active ingredients in such preparations.

Coenzyme Q₁₀ is a lipophilic molecule naturally occurring in human cells. It is involved in the production of energy in the form of ATP molecules. It also acts as an antioxidant due to its ability to neutralize free radicals.

In our work, content of coenzyme Q₁₀ in 24 cosmetic products was determined by HPLC. Various types of products from different manufacturers and price ranges were chosen, all of them bearing Q₁₀ in their names or having Q₁₀ visibly stated on their label. The method for determination of content of coenzyme Q₁₀ from US pharmacopoeia was adopted to our samples and verified.

Content of coenzyme Q₁₀ was determined in 23 samples, while in one sample no Q₁₀ could be found. Determined amounts varied between 30 µg and 700 µg per gram of product. By some manufacturers the content depends on the type of product with lower levels in body cosmetics and higher in face care products. By other labels these differences were less pronounced. Pricing was primarily linked to trademark followed by the type of product.

In three selected products the stability of coenzyme Q₁₀ was assessed by aging in the stability chamber at an elevated temperature and relative humidity. Products were found stable since no changes in appearance or coenzyme Q₁₀ content after 4 weeks at stress conditions were observed.

Key words: skin aging, cosmetic products, coenzyme Q₁₀, high performance liquid chromatography, stability

SEZNAM OKRAJŠAV

AO	antioksidant
ATP	adenozin trifosfat
CAT	katalaza
CoQ ₁₀	koencim Q ₁₀
CV	Cadeavera
DNK	deoksiribonukleinska kislina
GP _x	glutation peroksidaza
GR	glutation reduktaza
GSH	reducirana oblika glutaciona
HPLC	visokozmogljivostna tekočinska kromatografija (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
ICH	mednarodna konferenca o usklajevanju (<i>International Conference on Harmonisation</i>)
INCI	mednarodna nomenklatura za kozmetične sestavine (<i>International Nomenclature of Cosmetic Ingredients</i>)
KI	kozmetični izdelek
MF	mobilna faza
MWD	detektor z možnostjo hkratnega merjenja pri večih valovnih dolžinah (<i>Multiple Wavelength Detector</i>)
RNS	reaktivne dušikove zvrsti (<i>Reactive Nitrogen Species</i>)
ROS	reaktivne kisikove zvrsti (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
RS	reaktivne zvrsti (<i>Reactive Species</i>)
RSD	relativni standardni odklon (<i>Relative Standard Deviation</i>)
RV	relativna vlažnost
SD	standardni odklon (<i>Standard Deviation</i>)
SOD	superoksid dismutaza
UV	ultravijolična svetloba

1. UVOD

V današnjih časih smo poplavljeni s slikami mladostne lepote na televiziji, v filmih in v modnih revijah, poleg tega čutimo pritisk družbe in okolice po večno mladem videzu. Estetska vloga kože je tako danes bolj poudarjena in zaželena kot kadarkoli prej. Ker se življenjska doba ljudi v razvitih državah povečuje, število novorojenih otrok pa pada, se s tem povečuje tudi povprečna starost populacije. Starejši so o pomembnosti zdravja, dobrega počutja in lepega videza bolj ozaveščeni kot mladi, poleg tega imajo na razpolago večja finančna sredstva, ki jih namenijo nakupu kozmetičnih izdelkov. Zato so proizvajalci bolj osredotočeni na njihovo zdravje in videz, na tržišču zagotavljajo široko paleto kozmetičnih izdelkov, ki vsebujejo trditve, kot so “upočasnjuje staranje kože” in “zmanjšujejo vidnost gub” (1,2,3).

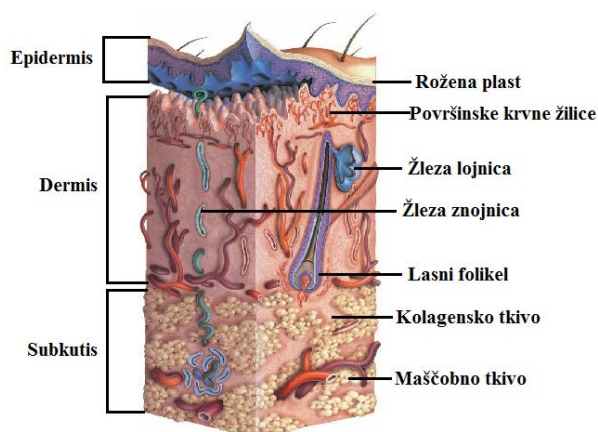
Vsa živa bitja so podvržena staranju in skupaj z organizmom se stara tudi koža. Kljub stalnemu obnavljanju in popravljanju celic ima koža svoj dnevnik in nabrane spremembe se pokažejo šele skozi čas (1). Koža predstavlja ogledalo staranja, saj prehaja od mehke in gladke kože pri otrocih, preko prožne in čvrste kože pri mladostnikih do zgubanega, povešenega videza v starejšem obdobju. Staranje kože je naraven proces, pri katerem pride do izgube strukturne celovitosti in fizioloških funkcij kože (2,4).

1.1 KOŽA

Koža je pomemben organ. Če bi zelo od blizu pogledali vsak kvadratni centimeter kože bi v njem našli približno 7,6 milijona celic, 36 žlez lojnic, 240 žlez znojnic, 26 dlak in več milijonov mikroskopskih bakterij. Za oskrbo vsakega kvadratnega centimetra kože skrbi okoli 7600 živčnih celic in veliko število miniaturnih krvnih žil. Glavne funkcije kože so izločanje odpadnih produktov in toksinov, uravnavanje in ohranjanje vodnega ravnotežja in telesne temperature. Vsebuje tudi številne čutilne celice, ter predstavlja bariero, ki nas varuje pred zunanjimi vplivi (1).

Koža je največji organ telesa, ki zavzema okoli 15 % telesne teže. Povprečna površina kože pri odraslem človeku znaša približno 1,6 kvadratnega metra površine (5).

1.1.1 Zgradba in funkcija kože



Slika 1: Zgradba kože (4)

Koža je sestavljena iz treh plasti:

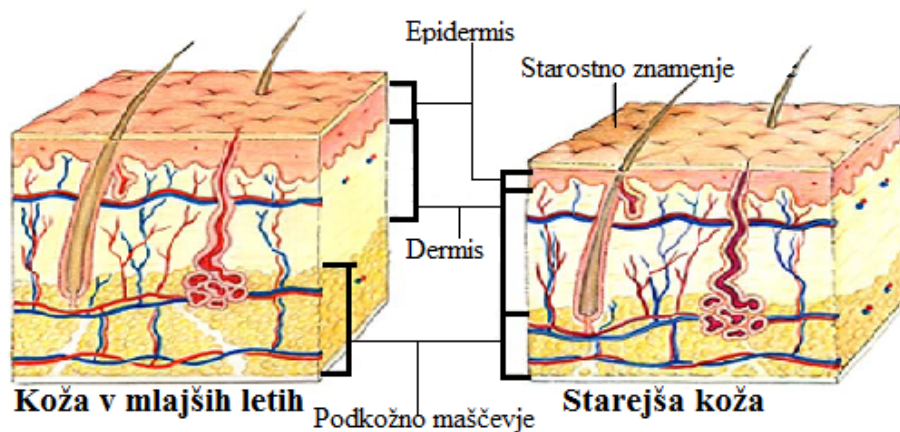
- **Epidermis ali povrhnjica** predstavlja zunanjo plast kože. Zgrajena je iz petih različnih plasti, ki si sledijo od spodaj navzgor: *stratum basale* oz. temeljna plast, *stratum spinosum* oz. trnasta plast, *stratum granulosum* oz. zrnata plast, *stratum lucidum* oz. svetleča plast in *stratum corneum* oz. rožena plast (4,6,7). V glavnem vsebuje keratinocite in manjše populacije melanocitov in imunskih celic (Langerhansove celice). Glavni funkciji epidermisa sta zaščita kože pred zunanjimi vplivi in zadrževanje konstantne ravni vode v notranjih tkivih (2).
- **Dermis ali usnjica** se nahaja med povrhnjico in podkožjem. Je gosta plast vezivnega tkiva, večinsko sestavljena iz fibroblastov, ki proizvajajo kolagenska in elastinska vlakna. Poleg tega vsebuje številne žleze lojnice in znojnice, krvne in limfne žile, živčne končiče ter lasne folikle (7,8). Kolagenska vlakna dajejo koži natezno moč, medtem ko elastinska vlakna zagotavljajo elastičnost in odpornost kože (2).
- **Subkutis ali podkožje** je plast ohlapnega vezivnega tkiva pod usnjico. Vsebuje bogato krvno in limfno žilje in živce, ter podkožno maščevje. Njegova vloga je zaščita notranjih organov pred mehanskimi poškodbami in mrazom, hkrati pa predstavlja tudi pomembno energijsko zalogo telesa (2,3,6,7).

1.1.2 Staranje kože

Staranje kože je proces, ki vodi do postopne izgube strukturne celovitosti in fizioloških funkcij kože (4). Poznamo dve vrsti staranja:

- **Intrinzično (biološko, kronološko)** staranje je neizogibno, saj predstavlja biološki vpliv časa na kožo. Pojavlja se na vseh delih telesa, ne glede na izpostavitve sončni svetlobi. Staranje kože je način naravnega izražanja posameznikovih let, kljub temu pa obstajajo razlike v videzu kože pri ljudeh iste starosti, ker je odvisno tudi od genetike posameznika. Najbolj opazne spremembe kože so posledica raznih strukturnih sprememb v koži, kot so degeneracija elastinskih in kolagenskih vlaken, zmanjšanje števila kolagenskih vlaken ter tanjšanje posameznih plasti kože, kar vodi do postopne izgube elastičnosti, čvrstosti in moči kože ter do nastanka številnih gub. Poleg navedenih sprememb upada tudi delež vlage, spreminja se stopnja poraščenosti, velikost žlez lojnic, pojavljati se začnejo starostna znamenja (8).

- **Ekstrinzično** staranje kože je posledica številnih zunanjih vplivov na kožo. Glavni dejavnik je fotostarjanje, do katerega pride zaradi kronične izpostavljenosti človeške kože UV sevanju, ki prihaja od sonca (3). Poleg fotostaranja so dejavniki ekstrinzičnega staranja tudi kajenje, prekomerno uživanje alkohola in drog, prekomerna izpostavitve mrazu, vetru in okoljskim onesnaževalcem (smog). Izpostavljenost sončnim žarkom in cigaretnemu dimu spodbuja nastajanje kože škodljivih radikalov in reaktivnih kisikovih vrst (ROS) (3).



Slika 2: Proces staranja kože s tanjšanjem in pojavom starostnih znamenj (2)

1.1.3 UV sevanje in fotostarjanje kože

Fotostarjanje je izraz, ki ga uporabljamo za opisovanje kliničnih in histoloških sprememb v koži kot posledici kronološke izpostavitve UV svetlobi (2). UV sevanje je elektromagnetno valovanje s krajšo valovno dolžino, kot je valovna dolžina vidne svetlobe in daljšo kot je valovna dolžina X-žarkov. Obsega območje valovnih dolžin med približno 400 nm in 10 nm. Delitev elektromagnetnega spektra UV sevanja na več območij, je prikazan v tabeli I:

Tabela I: Spekter UV svetlobe in nekateri biološki učinki na kožo (9)

Oznaka	Valovna dolžina [nm]	Energija fotona [eV]	Učinki
UVA	400 - 315	3,10 - 3,94	fotostaranje, ROS
UVB	315 - 280	3,94 - 4,43	fotostaranje, nastanek radikalov, poškodbe kože in DNK, mutacije, rak
UVC	280 - 100	4,43 - 12,4	radikali, poškodbe kože, mutacije

V ozonski plasti se absorbira celoten spekter UVC sevanja in del UVB sevanja, medtem ko UVA in večji delež UVB žarkov pride do Zemlje in povzroča fotostaranje kože (9,10). UV svetloba penetrira skozi kožo in odvisno od valovne dolžine svetlobe interagira z različnimi plastmi kože: UVB sevanje se večinoma absorbira v epidermisu in vpliva na keratinocite, UVA žarki sežejo globlje in interagirajo tudi s fibroblasti v dermisu (4). Predvsem fotoni UVB svetlobe imajo dovolj veliko energijo za homolitsko cepitev vezi, pri čemer nastajajo radikali (10). Fotoni UVA svetlobe pa primarno povzročajo nastanek singlenta kisika in ostalih ROS. Singlenta kisik je visoko reaktivna neradikalna molekula, ki oksidira številne organske spojine (11,12). Ti dodatno nastali radikali in ROS preobremenijo v koži naravno prisotne antioksidante (AO), prihaja do pogostejših okvar DNK in do upadanja funkcije kože v celoti (10). Posledice fotostaranja so pospešena degeneracija elastinskih vlaken, neenakomerna pigmentiranost kože, pojavljanje starostnih znamenj, možen nastanek kožnih tumorjev (3).

1.2 REAKTIVNE ZVRSTI

Reaktivne zvrsti (RS) so spojine, ki so zaradi svoje kemijske strukture visoko reaktivne in imajo posledično kratko življenjsko dobo. Glede same strukture so RS najpogosteje radikali, lahko pa so tudi druge neradikalne reaktivne spojine, predvsem oksidanti (npr. vodikov peroksid). Radikal je definiran kot atom, ion, molekula ali kompleks, ki ima v svoji strukturi vsaj en nesparjen elektron, zaradi katerega imajo radikali značilno visoko reaktivnost (13-16). RS v človeški koži nastajajo neprenehoma kot posledica normalnega celičnega metabolizma, vnetja in sončnega sevanja. So pomemben dejavnik pri signalizacijskih procesih v celici in med celičnimi sistemi. Sodelujejo tudi pri obrambi telesa z uničenjem bakterij in virusov (17). Lahko tudi oksidirajo biološke snovi. Delimo jih na reaktivne kisikove zvrsti (ROS), reaktivne dušikove zvrsti (RNS) itd. (18). Najbolj pogosti predstavniki ROS so superoksidni radikal O_2^- , hidroksilni radikal HO^\cdot , singlenta

kisik $^1\text{O}_2$ in vodikov peroksid H_2O_2 , tipični predstavnik RNS pa je dušikov oksid NO. ROS vplivajo na celoten proces staranja, fotostaranje in vnetje kože (19).

1.2.1 Oksidativni stres

Izraz oksidativni stres predstavlja stanje neravnotežja med nastajanjem RS in antioksidativno obrambo v telesu. Lahko ga definiramo tudi kot motnjo v ravnotežju med prooksidanti in AO, kjer prevladujejo prooksidanti (14,20). Prooksidanti so snovi, ki pospešujejo oksidativni stres s povišano proizvodnjo ROS ali z zaviranjem sistema AO (21). Oksidativni stres v telesu je tudi posledica naravnega procesa staranja, saj z leti upada vsebnost AO in se poveča proizvodnja ROS (14,19). Posledica takega stanja vodi do molekularnih, celičnih in tkivnih poškodb, ki vključujejo poškodbe lipidov, membrane, proteinov in DNK (22,23). Oksidativni stres se po navadi prične z nastankom superoksidnega radikala O_2^- , ki nastane ob redukciji molekularnega kisika z NADPH oksidazo (nikotinamid adenin dinukleotid fosfat oksidaza) ali s pomočjo neencimskih reductentov (npr: semi-ubikinon v mitohondrijskih reakcijah verige prenosa elektronov). Superoksidni radikal lahko nato odstrani v celicah prisoten encim superoksid dismutaza (SOD), ki ga dismutira v kisik in vodikov peroksid H_2O_2 (23,24). Vodikov peroksid se lahko tudi s pomočjo glutathion peroksidaza (GPx) ali encima katalaze (CAT) pretvori do neškodljivega kisika in vode, ob prisotnosti ustreznih kovinskih ionov kot katalizatorjev pa lahko razpade na hidroksidni anion in zelo reaktivni hidroksilni radikal $\text{HO}\cdot$ (19,23,25). Poškodbe, ki jih povzroča oksidativni stres, so lahko reverzibilne ali ireverzibilne, organizem pa se pred njimi brani z različnimi preventivnimi in popravljivimi mehanizmi, fizično obrambo in z antioksidativnim sistemom (19,23).

1.3 ANTIOKSIDANTI

Antioksidanti obsegajo širok spekter spojin, ki lahko donirajo enega od svojih elektronov radikalom, jih tako nevtralizirajo in s tem preprečijo oz. upočasnijo nadaljnjo verižno reakcijo oksidacije (22). Za številne AO je značilno sinergistično delovanje (primer: sinergizem med encimskimi in neencimskimi AO), skupini takih med seboj sodelujočih AO pravimo antioksidativna mreža (19). Glede na lastnosti in izvor jih delimo na encimske in neencimske, ki so lahko eksogeni in endogeni AO:

- **encimski AO:** SOD, GP_x, CAT in glutathion reduktaza (GR)
- **neencimski ali nizkomolekularni AO:**

- **eksogeni:** AO pridobljeni iz hrane, prehranskih dopolnil npr: vitamin C, vitamin E, polifenoli, bioflavonoidi, karotenoidi
- **endogeni:** AO, ki so pomembni biofaktorji pri antioksidativni obrambi, npr: lipoična kislina, koencim Q₁₀ (CoQ₁₀), reducirana oblika glutaciona (GSH), kovine, ki so potrebne za delovanje encimskih AO (selen, baker, cink, mangan in železo)

Mehanizem delovanja AO je lahko direkten, tako da neposredno ustavijo verižno reakcijo oksidacije ali lovijo radikale oz RS, za nekatere pa je značilno posredno delovanje, kar pomeni, da so vpleteni v postopek nastajanja radikalov in ROS npr: kot kelatorji kovinskih ionov ali inhibitorji prooksidativnih encimov (18,19).

1.3.1 Antioksidanti v kozmetiki

Na tržišču obstaja veliko število različnih kozmetičnih izdelkov z AO kot aktivnimi učinkovinami. Ti izdelki naj bi pri topikalnem nanosu preprečevali staranje, z UV sevanjem povzročene poškodbe kože in zmanjševali vidnost gub, kar je pogosto pretiravanje in zavajanje ljudi, saj z izjemo vitamina C AO niso sposobni odstranjevanja že nastalih gub, ampak le preprečujejo oz. upočasnjujejo nastajanje novih. Nekateri AO, uporabljeni v KI, lahko delujejo tudi kot protivnetne učinkovine in sredstva za depigmentacijo kože. Pri vrednotenju učinkovitosti topikalno nanešenih AO je potrebno upoštevati, da se mora učinkovina absorbirati skozi kožo in priti do tarčnega tkiva ter tam ostati dovolj dolgo da ustvari učinek, kar je pogosto težavno, saj so nekateri AO nestabilni in se zlahka oksidirajo ter tako postanejo neaktivni (19). Proizvajalci zato pogosto v KI proti staranju dodajajo še dodatne AO, ki zagotavljajo stabilnost aktivnih učinkovin (26). V kozmetiki se uporabljajo:

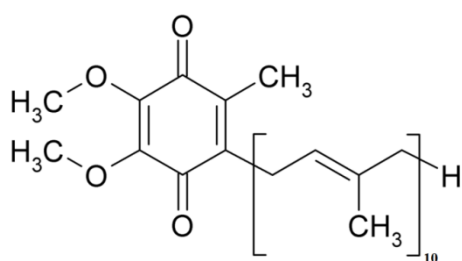
- **Lipofilni AO:** vitamin E, CoQ₁₀ (ubikinon), idebenon, likopen, kurkumin;
- **Hidrofilni AO:** glutation, vitamin C, ekstrakt zelenega čaja (katehini, flavonoidi), silimarin (polifenolni flavonoidni kompleks), resveratrol, ekstrakt grozdnih pešk (vitamin E, flavonoidi) idr.

1.3.2 Koencim Q₁₀

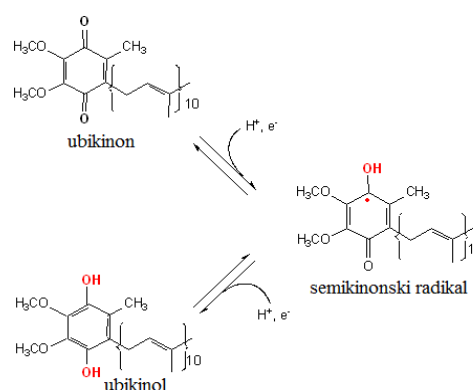
CoQ₁₀ je lipofilna molekula, ki se naravno nahaja v membranah mirohondrijev v večini evkariontskih celic, kjer sodeluje pri proizvodnji energije v obliki ATP (adenozin trifosfat) molekul kot del verige prenosa elektronov v redoks reakcijah dihalne verige. Oznaka Q se nanaša na kinonsko skupino, številka 10 pa predstavlja število izoprenskih enot, ki so vezane nanjo (19,27). Izoprenske enote dajejo molekuli močno lipofilni značaj, zato se v

telesu nahaja izključno v obliki micelarnih agregatov, v lipidnih membranah ali vezan na proteine (28). Njegovo kemijsko ime je 2,3-dimetoksi-5-metil-6-dekapienil benzokinon. Poznan je tudi kot ubikinon in ubidekarenon. Strukturno je podoben vitaminom, čeprav sam ne spada mednje. Pri sobnih pogojih je oranžna kristalinična snov, ki je netopna v vodi, v lipidih pa ima omejeno topnost (27,29). Prisoten je v vseh človeških tkivih, njegova vsebnost pa variira po telesu. Največ ga najdemo v organih z visoko metabolično aktivnostjo, kot so srce, ledvice in jetra (30). Telo potrebuje CoQ₁₀ za pridobivanje energije, poleg tega je bistven obrambni mehanizem telesa proti ROS, saj je edini endogeni maščobotopni AO (28,31). Ocenjujejo, da je v telesu povprečnega odraslega človega med 0,5 in 1,5g CoQ₁₀ (32).

1.3.2.1 Antioksidativno delovanje CoQ₁₀



Slika 4: Koencim Q₁₀ (27)



Slika 3: Redukcija ubikinona preko semikinona do ubikinola (33)

CoQ₁₀ obstaja v treh redoks stanjih: ubikinon (popolnoma oksidirano stanje), semikinon (visoko reaktivni radikalski intermediat pri pretvorbi ubikinola do ubikinona in obratno) in ubikinol (popolnoma reducirano stanje) (27,33-35). Antioksidativno deluje v membranah mitohondrijev in v lipidnih celičnih membranah, kjer nevtralizira radikale, preprečuje oksidativne poškodbe DNK in celic ter regenerira vitamin E (36). *In vitro* so na celičnih kulturah človeških keratinocitov in dermalnih fibroblastov dokazali učinkovito antioksidativno delovanje CoQ₁₀ pri obsevanju z UVA svetlobo, poleg tega naj bi pospeševal nastajanje kolagena, kar naj bi bilo ugodno pri regeneraciji oksidativnih poškodb kože (10,30).

1.3.2.2 Uporaba CoQ₁₀ v kozmetiki

INCI (mednarodna nomenklatura kozmetičnih sestavin) ubikinon klasificira kot AO in "skin conditioning agent" (snov, ki ohranja kožo mehko, gladko, prožno) (37,38).

Nastajanje CoQ₁₀ v organizmu se z leti zmanjšuje. Številni verjamejo, da je to eden glavnih vzrokov staranja ter da nadomeščanje CoQ₁₀ z zdravili, prehranskimi dopolnili in obogatnimi živili zavira pojav znakov staranja ter vrača mladostni videz in vitalnost. Tako lahko CoQ₁₀ najdemo tudi v številnih kozmetičnih izdelkih proti staranju in gubanju kože, izdelkih za zaščito kože pred soncem ter nego po sončenju in v izdelkih za vlaženje kože (36). V različnih virih so različni podatki o dovoljenih oz. priporočenih koncentracijah CoQ₁₀:

- KI proti staranju vsebujejo ponavadi 0,5 - 1,0 % koncentracijo, lahko do 3 % (32).
- Priporočena koncentracija v formulacijah je 0,01 % do 0,3 % (39).
- Pri vgrajevanju v liposome je običajna koncentracija 2 – 6 % (36).

Učinkovitost ubikinona v topikalno apliciranih izdelkih je odvisna od prehajanja skozi kožo. Z vgrajevanjem v liposome je absorpcija v kožo izboljšana (36).

1.4 KOZMETIČNI IZDELKI

Uredba Evropskega Sveta 1223/2009 o kozmetičnih izdelkih definira v 2.členu uredbe kozmetične proizvode kot: "katero koli snov ali zmes, namenjeno stiku z zunanjimi deli človeškega telesa (povrhnjico, lasiščem, nohti, ustnicami in zunanjimi spolnimi organi) ali z zobmi in sluznico ustne votline zaradi izključno ali predvsem njihovega čiščenja, odišavljanja, spreminjanja njihovega videza, njihovega varovanja, ohranjanja v dobrem stanju ali korekcije telesnega vonja."(40).

1.4.1 Vrste kozmetičnih izdelkov

Na tržišču obstaja veliko različnih vrst KI, ki so namenjeni uporabi na različnih delih telesa in **ob** različnih delih dneva ter različnih starostnih obdobjih.

- **Krema** "je poltrdna večfazna farmacevtska oblika iz oljne in vodne faze ter površinsko aktivne snovi" (41). So široko uporabljane za različne namene. Glede na disperzni sistem jih uvrščamo med emulzije.

- **Krema za roke** je krema namenjena negi ter preprečitvi hrapavosti in izsušenosti kože na rokah, ki je lahko posledica pogostega stika rok z vodo in raznimi detergenti. Kremam za roke s pogosto dodani vitamini, protivnetne učinkovine, UV filtri in učinkovine za svetljenje kože, odvisno od želenega učinka (5).

- **Krema za oči** je krema namenjena negi občutljive kože okoli oči. Ponavadi vsebuje hipoalergene sestavine - ne vsebuje določenih dišav, konzervansov in ostalih potencialnih iritantov..
- **Dnevna krema in nočna krema** sta kremi namenjeni negi obraza. Nočne kreme so bolj mastne, okluzivne in hranilne v primerjavi z dnevnimi kremami (4).
- **Losjon** “*je tekoč izdelek za čiščenje in osvežitev kože*” (41). Uporabljajo se tudi za nego kože. Lahko so suspenzije ali emulzije.
- **Mleko** (“*milky lotion*”) se glede na lastnosti nahaja med losjonom in kremo. Večinoma so tekoči, z nizko vsebnostjo oljne faze (5).
- **Gel** je “*trodimenzionalno trdno ogrodje, v katero je mehansko, kemično ali fizikalno vezana tekoča faza*” (41). Delimo jih na oljne in vodne gele.
- **Maska** je KI, ki ga nanesemo na kožo v debelejšem sloju in ga pustimo delovati kratek čas (5).
- **Ampula** je “*zataljen steklen ali plastičen vsebnik z značilnim zoženim vratom*”, ki se v kozmetiki uporablja za topikalen nanos (41). Lahko vsebuje večje količine aktivnih učinkovin.
- **Kapsula** je enodimenzionalna kozmetična oblika, sestavljena iz mehke ovojnice in tekoče vsebine (npr. želatinasta ovojnica in oljna vsebina). Lahko vsebuje večje količine aktivnih učinkovin.
- **Serum in koncentrat** v strokovni literaturi nista posebej definirana. Različni proizvajalci KI ponavadi navajajo, da vsebujeta večje koncentracije aktivnih učinkovin v primerjavi z ostalimi izdelki.

1.4.2 Stabilnost kozmetičnih izdelkov

Namen testiranja stabilnosti KI je zagotoviti, da bo izdelek skozi čas uporabe obdržal svoje fizikalne, kemijske ter mikrobiološke lastnosti, funkcionalnost in izgled pri ustreznih pogojih shranjevanja (42). Teste stabilnosti lahko izvajamo v realnem času ali pod stresnimi pogoji, s čimer želimo zagotoviti:

- **fizikalno** stabilnost: ločitev faz, sedimentacija, agregacija, neenakomerno porazdeljena učinkovina, geliranje, sprememba v strukturi, sprememba mase, viskoznosti itd.
- **kemijsko** stabilnost: sprememba pH, barve, vonja, obstojnost učinkovine itd.
- **mikrobiološko** stabilnost: preprečevanje razrasta mikroorganizmov tekom uporabe KI skozi ves čas shranjevanja, transporta in uporabe KI.

Zaradi velike pestrosti izbire KI je nemogoče predpisati “standardne” stabilnostne teste, ki bi ustrezali vsem KI, zato jih ponavadi določijo in opravijo kar proizvajalci izdelkov, pri tem morajo predvideti pogoje, katerim bo proizvod izpostavljen. Testi vključujejo oceno obnašanja zaprtega izdelka med shranjevanjem, oceno stabilnosti občutljivih sestavin (termolabilne sestavine, dišave, arome), oceno interakcij med embalažo in izdelkom (adsorpcija na steno vsebnika, korozija, kemijske reakcije, učinkovitost vsebnika pri zaščiti produkta), ocena mikrobiološke stabilnosti pred in med uporabo izdelka, ocena odpornosti izdelka na svetlobo ter mehanski in temperaturni stres (5,42).

1.5 VALIDACIJA ANALIZNE METODE

Validacija je dokumentiran postopek preizkušanja in potrjevanja karakteristik zmogljivosti in omejitev metode ter ugotovitev vplivov, ki lahko spremenijo te karakteristike. Z validacijo dokažemo, da je metoda ustrezna za reševanje določenega analiznega problema - daje natančne, točne in zanesljive rezultate (43-45)

Med tipične karakteristike analizne metode, ki jih vrednotimo tekom validacijskega postopka in so predpisane z ICH smernico Q2 (R1) spadajo: točnost, natančnost/preciznost, specifičnost, meja zaznave, meja določitve, območje linearnosti, mersko območje metode in robustnost (45).

1.5.1 Točnost (pravilnost)

Točnost analizne metode nam pove, kako dobro se rezultati metode ujemajo s pravo vrednostjo. Točnost lahko določimo z dodatkom znane količine analita k zmesi vseh ostalih sestavin v vzorcu ali s primerjavo rezultatov metode z rezultati, pridobljenimi z analizo certificiranega referenčnega standarda s poznano vsebnostjo analita. V primeru, da so dokazane natančnost, linearnost in specifičnost, lahko točnost predpostavimo. Izrazimo jo lahko kot izkoristek metode (“*recovery*”) med vrednostjo, določeno z analitsko metodo, in pravo vrednostjo (enačba 1) ali pa kot % odstopanja (“*bias*”) določene vrednosti od prave vrednosti (enačba 2) (44,45).

Enačba 1 - izkoristek

$$\text{Izkoristek} = \frac{x_i}{\mu_i} \times 100\%$$

x_i določena vrednost

μ_i prava vrednost

Enačba 2 - odstopanje od prave vrednosti

$$\text{Odstopanje} = \frac{x_i - \mu_i}{\mu_i} \times 100\%$$

1.5.2 Natančnost, preciznost

Natančnost analizne metode je merilo za stopnjo ujemanja posameznih rezultatov serije analiz istega vzorca pri enakih pogojih. Natančnost podajamo kot standardni odklon oz. standardno deviacijo (enačba 3) ali relativno standardno deviacijo (enačba 4).

Enačba 3 - standardni odklon

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

SD standardna deviacija
 X_i vrednosti posameznih meritev
 \bar{x} povprečna vrednost vseh meritev
n število meritev

Enačba 4 - relativni standardni odklon

$$RSD (\%) = \frac{SD \times 100 \%}{\bar{x}}$$

\bar{x} povprečna vrednost vseh meritev
SD standardna deviacija

1.5.3 Specifičnost

Specifičnost metode pomeni, da je metoda sposobna nedvoumno določiti prisotnost analita ob prisotnosti drugih snovi, kot so sorodne snovi ali pa ostale komponente vzorca (matriks). Specifičnost najpogosteje določamo z uporabo separacijskih tehnik, ki ločijo analit od ostalih komponent (44,45).

1.5.4 Meja zaznave

Meja zaznave (*LOD limit of detection*) je najnižja koncentracija analita, za katero dobimo signal, ki se razlikuje od šuma na bazni liniji (ponavadi vsaj trikrat večji signal od šuma), ni pa nujno, da lahko analit kvantitativno ovrednotimo.

1.5.5 Meja določitve

Meja določitve (*LOQ limit of quantification*) predstavlja najnižjo koncentracijo analita, pri kateri daje izbrana metoda dovolj točen in natančen rezultat (ponavadi vsaj desetkrat večji signal od šuma).

1.5.6 Linearnost

Linearnost analizne metode je sposobnost, ki nam pove, ali so izmerjeni signali v določenem koncentracijskem območju, direktno ali po definirani matematični operaciji, sorazmerni koncentraciji analizirane snovi v vzorcih. Zaželeno je, da je zveza med odzivom metode in koncentracijo linearna, ni pa nujno. Linearnosti določimo z analizo

različnih koncentracij, ki pokrivajo delovno območje metode vsaj od 80 % najnižje pričakovane koncentracije do vsaj 120 % najvišje pričakovane koncentracije. Izražamo jo z enačbo regresijske premice (enačba 5) in korelacijskim koeficientom (44-46).

Enačba 5- enačba regresijske premice: $y = k \times x + b$

k naklon regresijske premice

1.5.7 Območje metode

Območje analizne metode je interval med najnižjo in najvišjo koncentracijo analita v merjenem vzorcu, za katerega so bile dokazane linearnost, točnost in natančnost. Po navadi ga določamo iz območja linearnosti metode. Podajamo ga v enotah, s katerimi podajamo rezultate same analize (44,45).

1.5.8 Robustnost

Robustnost analizne metode je merilo zanesljivosti analize med normalno uporabo. Določimo jo tako, da opazujemo vpliv majhnih in namernih sprememb v parametrih metode na rezultat. Primeri tipičnih variacij: spremembe sestave MF, pH MF, temperature kolone, v pretoku skozi kolono itd. Izražamo jo s primerjavo rezultatov pri običajnih in spremenjenih pogojih (45,46).

2. NAMEN DELA

Na trgu obstaja veliko število kozmetičnih izdelkov, namenjenih negi zrele kože. Ti izdelki obljublajo zmanjšanje opaznosti znakov staranja, ter zagotavljajo večno lepo in mlado kožo. Obljube slonijo na uporabi kozmetično aktivnih učinkovin, ki so namenjene zmanjševanju opaznosti gub, starostnih znamenj in ostalih znakov staranja. Med pogosto uporabljanimi kozmetično aktivnimi sestavinami za nego zrele kože je tudi koencim Q_{10} .

V okviru diplomske naloge bomo ovrednotili vsebnost koencima Q_{10} v različnih kozmetičnih izdelkih. Pri sami izbiri izdelkov se bomo osredotočili na tiste, pri katerih je poudarjeno, da vsebujejo koencim Q_{10} , iz česar bi uporabniki lahko sklepali, da je koencim Q_{10} najpomembnejša aktivna učinkovina v izdelku. Kozmetične izdelke bomo izbrali tako, da bomo pokrili čim večje število različnih vrst izdelkov, iz različnih cenovnih razredov ter od različnih proizvajalcev.

Vsebnost koencima Q_{10} bomo v vseh vzorcih določili z visokoločljivostno tekočinsko kromatografijo. Pri razvoju oziroma optimizaciji metode bomo izhajali iz postopka za določanje vsebnosti ubidekarena v monografiji "*Ubidecarenone Capsules*" ameriške farmakopeje USP 37 (47). Postopek bomo prilagodili našim vzorcem ter ga verificirali, tako da bomo preverili ustrezno specifičnost, točnost, natančnost in linearnost v našem delovnem območju.

Rezultate bomo primerjali glede na izbrane parametre. V določenih kozmetičnih izdelkih bomo vrednotili tudi morebitno spreminjanje vsebnosti koencima Q_{10} . Le te si bomo izbrali glede na sestavo kozmetičnih izdelkov tako, da bomo določili stabilnost koencima Q_{10} v izdelku z večjo vsebnostjo vodne faze, v izdelku z večjo vsebnostjo oljne faze ter v izdelku, ki glede na sestavo spada pod emulzije. Izbrane izdelke bomo en mesec umetno starali v stabilnostni komori pri stresnih pogojih (40°C in 70 % RV), ter predvidoma določili vsebnost koencima Q_{10} po 2 in 4 tednih pospešenega staranja.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Reagenti in topila

- acetonitril za HPLC; J.T.Baker (Nizozemska)
- tetrahidrofuran za HPLC; J.T.Baker (Nizozemska)
- bidestilirana voda pridobljena na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani
- brezvodni etanol $\geq 99,8\%$, p.a; Sigma-Aldrich (Nemčija)
- n-heksan za HPLC, J.T.Baker (Nizozemska)

3.1.2 Aparature

- precizna tehtnica EG220-3NM (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Nemčija)
- analitska tehnica AG245/A (Mettler Toledo International inc., Greifensee, Švica)
- aparatura za pridobivanje bidestilirane vode Millipore Q-POD (Millipore; Bedford, ZDA)
- ultrazvočna kopel SONIS 4 GT (Iskra Pio d.o.o., Šentjernej, Slovenija)
- laboratorijska centrifuga Centric 150 (Tehtnica Železniki, Železniki, Slovenija)
- laboratorijska centrifuga Centric 400R (Tehtnica Železniki, Železniki, Slovenija)
- klimatska komora Vötsch, tip: VC 4034 (Vötsch Industrietechnik, Reiskirchen-Lindenstruth, Nemčija)
- grelna kopel Büchi b-491 (Büchi Labortechnik AG, Buchi, Švica)
- aparatura za HPLC: Agilent 1100 sistem s kvarterno črpalko, avtomatskim vzorčevalnikom, termostatom za kolono in MWD (*Multiple Wavelength Detector*) detektorjem (Agilent Technologies, Santa Carla, ZDA)
- laboratorijski material: filtri za HPLC; Chromafil® RC-45/25 (Macherey – Nagel, Nemčija)






3.1.3 Standardi








- ubikinon (oksidirana oblika koencima Q₁₀): oznaka: RICLC-GC, vsebnost: 98,7%; TCI (Japonska)
- ubikinol (reducirana oblika Q₁₀): pripravljen na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani

3.1.4 Vzorci




Kot vzorce smo uporabili 24 različnih kozmetičnih izdelkov namenjenih negi obraza, rok in telesa, ki smo jih kupili v drogeriji Müller v Ljubljani. Na vseh izdelkih je bilo jasno označeno, da vsebujejo CoQ₁₀.

Tabela II: Analizirani kozmetični izdelki

Št.vzorca	Ime vzorca	Vrsta KI	Cena	Slika
1	NIVEA: Body performance, Mleko za telo Q ₁₀	mleko za telo	6,59 € (za 400 mL)	
2	NIVEA: Losjon za telo Q10 performance	losjon za telo	6,59€ (za 400 mL)	
3	NIVEA Body performance, Olje za prožnostno kožo Q10	olje za telo	6,99€ (za 200 mL)	
4	NIVEA krema za roke s Q10	krema za roke	3,35€ (za 100 mL)	
5	NIVEA Visage Q10 plus dnevna krema	krema za obraz	10,99€(za 50 mL)	
6	NIVEA Visage Q ₁₀ plus nočna krema	krema za obraz	10,99€(za 50 mL)	

7	NIVEA Visage Q ₁₀ plus gel serum za obraz	serum za obraz	10,59€(za 30 mL)	
8	NIVEA Visage Q ₁₀ krema za predel okoli oči s kroglico	krema za predel okoli oči	9,99€ (za 10 mL)	
9	CADEAVERA Vital dnevna krema proti gubicam s Q ₁₀	krema za obraz	2,55€ (za 50 mL)	
10	CADEAVERA Vital nočna krema proti gubicam s Q ₁₀	krema za obraz	2,55€ (za 50 mL)	
11	CADEAVERA Vital krema za predel okoli oči proti gubicam s Q ₁₀	krema za predel okoli oči	3,29€ (za 15 mL)	
12	CADEAVERA Vital serum proti gubicam s Q ₁₀	serum za obraz	3,99€ (za 30 mL)	
13	CADEAVERA Vital kapsule proti gubicam s Q ₁₀	koncentrat za obraz	1,55€ (za 7 x kapsula)	

14	CADEAVERA Vital ampula s takojšnjim učinkom	koncentrat za obraz	0,69€ (za 2 mL)	
15	CADEAVERA Vital maska proti gubam s Q ₁₀	maska za obraz	0,65€ (za 2 x 7,5 mL)	
16	CADEAVERA Vital maska proti gubicam s Q ₁₀ za predel okoli oči	maska za predel okoli oči	0,69€ (za 4 x 1,5 mL)	
17	SEBAMED Anti-ageing losjon za čvrsto kožo	losjon za telo	5,99€ (za 200 mL)	
18	SEBAMED Anti-ageing krema Q ₁₀ za obnovitev kože	krema za obraz	9,99€ (za 50 mL)	
19	SEBAMED Anti-ageing krema za oči	krema za predel okoli oči	9,99€ (za 15 mL)	
20	DECLARE Age control krema s Q ₁₀	krema za obraz	35,5€ (za 50 mL)	
21	EVELINE Anti-wrinkles krema proti gubam okoli oči	krema za predel okoli oči	4,99€ (za 15 mL)	

22	SCHAEBENS koncentrat za zrelo kožo s Q ₁₀	koncentrat za obraz	2,15€ (za 7 x kapsula)	
23	KAMILL krema za roke in nohte anti age s Q ₁₀	krema za roke	1,59€ (za 75 mL)	
24	AVEO: Krema za roke Anti age Q ₁₀	krema za roke	1,29€ (za 100 mL)	

3.2 METODE

3.2.1 Priprava topil za vzorce

Tekom postopka optimizacije priprave raztopin vzorcev smo uporabili naslednja topila, katerih sestave so navedene v tabeli III.

Tabela III: Uporabljena topila in njihova sestava

	Sestava
Topilo 1	brezvodni etanol : n-heksan 5 : 2 (v/v)
Topilo 2	acetonitril : tetrahidrofuran : bidestilirana voda 55 : 45 : 5 (v/v/v) %
Topilo 3	acetonitril : tetrahidrofuran 40 : 60 (v/v) %

3.2.2 Priprava raztopine standarda CoQ₁₀; RS_{Q10}

V tehtalni čolniček smo natančno natehtali približno 10 mg standarda CoQ₁₀ in ga kvantitativno prenesli v 50,0 mL bučko s topilom 2, dopolnili do oznake in dobro premešali. Nato smo z avtomatsko pipeto prenesli 1,0 mL tako pripravljene raztopine v 20,0 mL bučko in ponovno dopolnili s topilom do oznake, ter dobro premešali. Koncentracija ubikinona v raztopini standarda RS_{Q10} je bila približno 10 µg/mL. Raztopine standardov smo vsakič pripravili sveže in v dveh paralelah, pri čemer smo eno raztopino

uporabili kot kalibracijski standard (za določitev RSD in izračun vsebnosti), drugo pa kot kontrolni standard za preverjanje točnosti analize.

3.2.3 Priprava raztopin vzorcev za preliminarno oceno vsebnosti CoQ₁₀ (“screening”)

Za določitev približnega koncentracijskega območja posameznega vzorca smo pripravili raztopine **vzorcev 1-24** tako, da smo natančno zatehtali približno 1g vzorca v 25,0 mL bučko, dopolnili do oznake s topilom 2, ter postavili na ultrazvok za 10 min. Raztopine smo ohladili na sobno temperaturo in jih nato centrifugirali 5 min pri 5000 obratih/min.

3.2.4 Priprava raztopin vzorcev za določanje vsebnosti CoQ₁₀

V volumetrične bučke smo natančno zatehtali približne mase vzorcev, kot je navedeno v tabeli IV. Bučke smo nato dopolnili z ustreznim topilom do $\frac{3}{4}$, dobro premešali in jih dali za 10 min v ultrazvočno kopel, ohladili na sobno temperaturo, dopolnili s topilom do oznake ter dobro premešali.

Tabela IV: Pregled postopka priprave raztopin vzorcev

Št.vzorca	m _{zatehte}	V _{bučke}	Topilo
5, 6, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 24	1,000 g	25,0 mL	topilo 2
20, 21, 23	2,000 g	25,0 mL	topilo 2
2, 4	3,000 g	25,0 mL	topilo 2
1	3,000 g	25,0 mL	topilo 3
3	4,000 g	25,0 mL	topilo 3
8, 22	0,400 g	10,0 mL	topilo 2
7	0,500 g	25,0 mL	topilo 2
13	0,800 g	10,0 mL	topilo 2

Del pripravljenih raztopin (cca 10 mL) smo prelili v centrifugirke in jih centrifugirali 5 min pri 5000 obratih/min. Bistri del raztopine smo nato filtrirali skozi filter 0,45 µm filter v 1,5 mL vialo za HPLC, pri čemer smo prvih nekaj mL filtrata zavrgli. Vse raztopine vzorcev smo pripravili v dveh paralelah. Posebej smo pripravili dodatno paralelo vzorca 9 in 14, ki smo ju pred centrifugiranjem segrevali na grelni kopeli cca 5 min pri 65°C, da se je mazilna podlaga v celoti raztopila. Naprej smo jih pripravili po enakem postopku.

Določanje mase vsebine enoodmernih oblik vzorcem 13, 14, 15, 16 in 22

Vzorcem 13, 14, 15, 16 in 22 smo določili maso vsebine tako, da smo najprej stehali tri enoodmerne oblike (ampule, kapsule in maske), jih nato odprli ter odlili vsebino, stene dobro sprali z acetonom, jih posušili in stehali prazne ovojnine enoodmernih oblik, katerih maso smo odšteli od začetne. Vsebnost CoQ₁₀ smo tako preračunali na posamezno enoodmerno obliko.

Enačba 6: Izračun povprečne mase vsebine enoodmerne oblike (kapsula, ampula, maska)

$$m_x = \frac{m_{\text{polna}} - m_{\text{prazna}}}{N}$$

m_{polna} masa polnih enoodmernih oblik [g]
 m_{prazna} masa praznih ovojnin enoodmernih oblik [g]
 N število enoodmernih oblik (3)

3.2.5 Priprava raztopin standarda in vzorcev za verifikacijo metode določanja vsebnosti CoQ₁₀

Priprava raztopin vzorca za vrednotenje natančnosti metode

Za vrednotenje natančnosti metode določanja vsebnosti CoQ₁₀ smo pripravili raztopino **vzorca 1** po postopku 3.2.4 za določanje vsebnosti CoQ₁₀. Ponovljivosti HPLC sistema smo ovrednotili tako, da smo 6x zaporedoma injicirali isto raztopino standarda.

Priprava raztopin za vrednotenje točnosti metode

Za vrednotenje točnosti metode smo po postopku 3.2.4 za določanje vsebnosti CoQ₁₀ pripravili raztopine **vzorcev 3, 7 in 10** ter jim dodali 1,0 mL, 2,0 mL in 2,5 mL RS_{Q10}.

Priprava raztopin standarda za vrednotenje linearnosti metode

Za vrednotenje linearnosti metode smo natančno zatehtali približno 10,00 mg standarda CoQ₁₀ in ga kvantitativno prenesli v 200,0 mL bučko, dopolnili do oznake s topilom 2 in dobro premešali (RS_{Q10,line}). Koncentracija CoQ₁₀ v raztopini standarda RS_{Q10,line} je bila približno 50,0 µg/mL. Iz raztopine standarda RS_{Q10,line} smo nato z redčitvami pripravili naslednje raztopine v območju od 50 do 150 % delovne koncentracije.

1. 2,0 mL RS_{Q10,line} / 20,0 mL; $c = 5,0 \mu\text{g} / \text{mL}$ (50 %)
2. 3,0 mL RS_{Q10,line} / 20,0 mL; $c = 7,5 \mu\text{g} / \text{mL}$ (75 %)
3. 4,0 mL RS_{Q10,line} / 20,0 mL; $c = 10,0 \mu\text{g} / \text{mL}$ (100 %)
4. 5,0 mL RS_{Q10,line} / 20,0 mL; $c = 12,5 \mu\text{g} / \text{mL}$ (125 %)
5. 6,0 mL RS_{Q10,line} / 20,0 mL; $c = 15,0 \mu\text{g} / \text{mL}$ (150 %)

3.2.6 Umetno staranje vzorcev za preverjanje stabilnosti

Vzorci 3,7 in 10 smo 4 tedne umetno starali v klimatski komori pri 40°C in 70 % RV. Vzorcem smo določili vsebnost CoQ₁₀ na začetku, po 2 in 4 tednih staranja, ter tako preverili stabilnost CoQ₁₀ v navedenih kozmetičnih izdelkih.

3.2.7 Kromatografski pogoji za določanja vsebnosti

Kolona: Agilent Eclipse plus C18, 150 x 4,6 mm, 5 μm delci (Agilent, ZDA)

Pretok: 1,5 mL/min

Valovna dolžina detekcije: 280 nm

Čas analize: 8 min

Volumen injiciranja: 10 μL

Temperatura kolone: 25°C

Mobilna faza 1: acetonitril/tetrahidrofuran/bidestilirana voda = 55/45/5 (v/v/v)

Mobilno fazo smo pred uporabo dobro premešali in razplinili s pomočjo ultrazvoka.

Pogoji za ustreznost kromatografskega sistema:

- Ponovljivost med tremi zaporednimi injiciranjmi raztopine standarda RS_{Q10}:
RSD ≤ 5,0%
- Ujemanje kalibracijskega in kontrolnega standarda: 95,0 % - 105,0 % (*recovery*)
- Vrh CoQ₁₀ v kromatogramu jasno ločen od ostalih vrhov

3.2.8 Določanje vsebnosti CoQ₁₀

Vsebnost CoQ₁₀ v vzorcih smo podali v μg/g izdelka. Izračunali smo jo s pomočjo enačbe 7. Kadar se je vsebnost, ki smo jo določili obema paralelama raztopin vzorca, medsebojno razlikovala za več kot 5 %, rezultata nismo upoštevali, pač pa smo celotno analizo ponovili, pri čemer smo bili pozorni, da se je tekom priprave raztopine vzorca izdelek ustrezno dispergirala.

Izračun vsebnost CoQ₁₀ v kozmetičnem izdelku

Enačba 7:
$$\text{vsebnost CoQ}_{10} / \text{g (kozmetičnega izdelka)} = \frac{A_{\text{vz.}} \times c_{\text{st.}} \times V_{\text{vz.}}}{A_{\text{st.}} \times m_{\text{vz.}}} \quad [\mu\text{g/g KI}]$$

- A_{vz.} površina kromatografskega vrha CoQ₁₀ v raztopini vzorca
A_{st.} površina kromatografskega vrha CoQ₁₀ v raztopini standarda
c_{st.} koncentracija CoQ₁₀ v raztopini standarda [μg/mL]
V_{vz.} volumen raztopine vzorca [mL]
m_{vz.} zatehtana masa vzorca [g]

Enačba 8:
$$\text{vsebnost CoQ}_{10}/\text{odmerek} = \frac{A_{\text{vz.}} \times c_{\text{st.}} \times V_{\text{vz.}} \times m_x}{A_{\text{st.}} \times m_{\text{vz.}}} [\mu\text{g}/\text{odmerek}]$$

$A_{\text{vz.}}$ površina kromatografskega vrha CoQ₁₀ v raztopini vzorca

$A_{\text{st.}}$ površina kromatografskega vrha CoQ₁₀ v raztopini standarda

$c_{\text{st.}}$ koncentracija CoQ₁₀ v raztopini standarda [$\mu\text{g}/\text{mL}$]

$V_{\text{vz.}}$ volumen raztopine vzorca [mL]

$m_{\text{vz.}}$ zatehtana masa vzorca [g]

m_k povprečna masa vsebine enoodmerne oblike (kapsula, ampula, maska) [g]

4. REZULTATI

4.1 VERIFIKACIJA METODE DOLOČANJA KOENCIMA Q₁₀ V KOZMETIČNIH IZDELKIH

4.1.1 Natančnost metode

Natančnost metode smo ovrednotili z določanjem vsebnosti CoQ₁₀ pri trikranemu injiciranju treh paralel **vzorca 1** in kot ponovljivost HPLC sistema pri šestkratnem injiciranju iste raztopine standarda s koncentracijo 10,52 µg/mL. Natančnost metode smo podali s standardnim odklikom (SD) in relativnim standardnim odklikom (RSD).

Tabela V: Ponovljivost kromatografskega sistema za raztopino standarda

Zaporedno število injiciranja	c _{st} [µg / mL]	A _{st} [mAU*s]
1	10,56	57,00
2		56,14
3		57,08
4		56,98
5		56,83
6		57,01
	\bar{x}	56,84
	SD	$\sigma = 0,3526$
	RSD [%]	0,6203

Tabela VI: Natančnost metode pri določanju vsebnosti CoQ₁₀ v vzorcu 1

Št. paralele	m _{vz} [g]	A _{vz} [mAU*s]	Vsebnost CoQ ₁₀ [µg/g KI]
1.	3,03006	30,40	46,6
2.	3,03590	31,72	48,6
3.	3,07657	32,04	48,4
\bar{x}			47,9
SD			1,10
RSD [%]			2,296

Metoda za določanje CoQ₁₀ v KI je natančna, kar smo dokazali z RSD, ki je ≤ 5,0 %.

4.1.2 Točnost metode

Točnost metode smo določili z metodo standardnega dodatka. Vzorce za vrednotenje točnosti smo si izbrali tako, da smo določili točnost v različnih tipih vzorcev in sicer v emulziji - kremi (**vzorec 10**), v vzorcu z večjim deležem vodne faze - serum (**vzorec 7**) in v vzorcu z večjim deležem oljne faze - olje za telo (**vzorec 3**). Vzorcem smo dodali določeno količino raztopine standarda CoQ₁₀ z znano koncentracijo, ki je ustrezala približno 100, 200 in 250 % običajnega delovnega območja. Vsako koncentracijo smo pripravili v dveh ponovitvah. Točnost smo podali kot izkoristek (razmerje med določeno in pravo vrednostjo v odstotkih) in kot odstopanje od prave vrednosti (*bias*).

Tabela VII: Točnost metode za določanje CoQ₁₀ v emulziji

Vzorec 10	Volumen dodane raztopine standarda [mL]	Dodana količina CoQ ₁₀ [µg]	Določena količina CoQ ₁₀ [µg]	Odstopanje (bias) [%] $\frac{x_i - \mu_i}{\mu_i} \times 100$	Izkoristek (recovery) [%]
	1,0	10,58	10,46	-1,16	98,84
	2,0	21,16	20,96	-0,96	99,04
	2,50	26,45	25,38	-4,04	95,96
\bar{x}				- 2,05	97,95

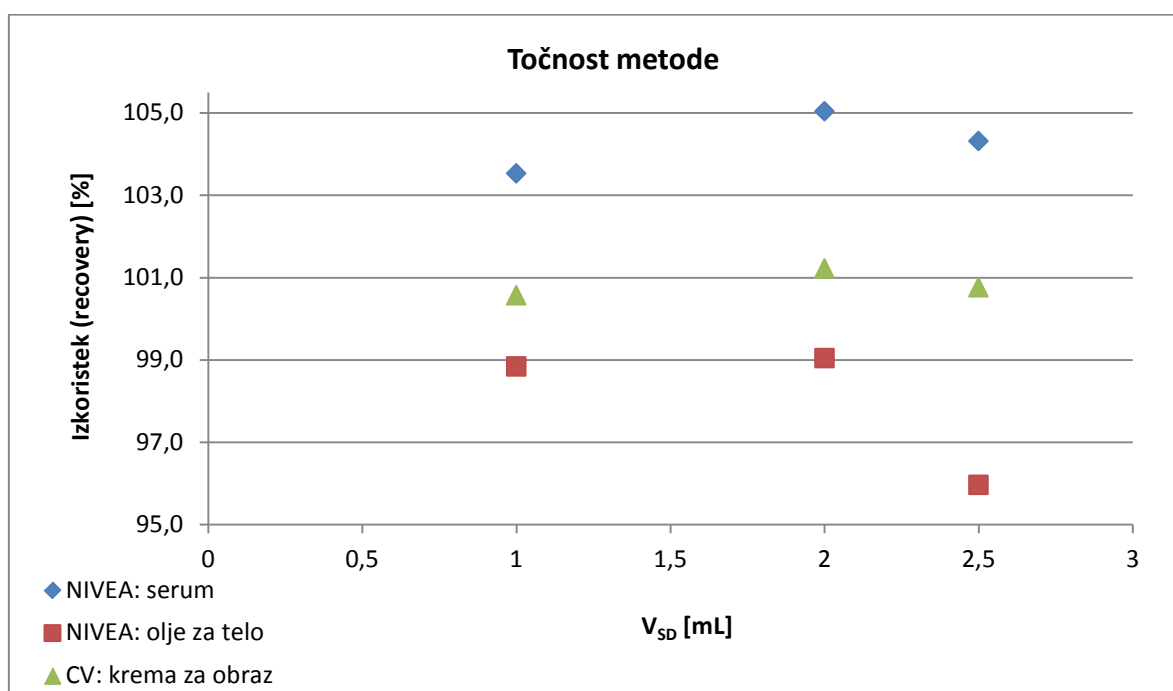
Tabela VIII: Točnost metode v vzorcu z večjim deležem vodne faze

Vzorec 7	Volumen dodane raztopine standarda [mL]	Dodana količina CoQ ₁₀ [µg]	Določena količina CoQ ₁₀ [µg]	Odstopanje (bias) [%] $\frac{x_i - \mu_i}{\mu_i} \times 100$	Izkoristek (recovery) [%]
	1,0	10,58	10,89	3,53	103,5
	2,0	21,16	22,10	5,04	105,0
	2,50	26,45	27,43	4,31	104,3
\bar{x}				4,29	104,3

Tabela IX: Točnost metode v vzorcu z večjim deležem oljne faze

Vzorec 3	Volumen dodane raztopine standarda [mL]	Dodana količina CoQ ₁₀ [μg]	Določena količina CoQ ₁₀ [μg]	Odstopanje (bias) [%] $\frac{x_i - \mu_i}{\mu_i} \times 100$	Izkoristek (recovery) [%]
	1,0	10,58	10,64	0,57	100,6
	2,0	21,16	21,42	1,22	101,2
	2,50	26,45	26,65	0,76	100,8
\bar{x}				0,85	100,9

Graf 1: Točnost metode določanja vsebnosti CoQ₁₀

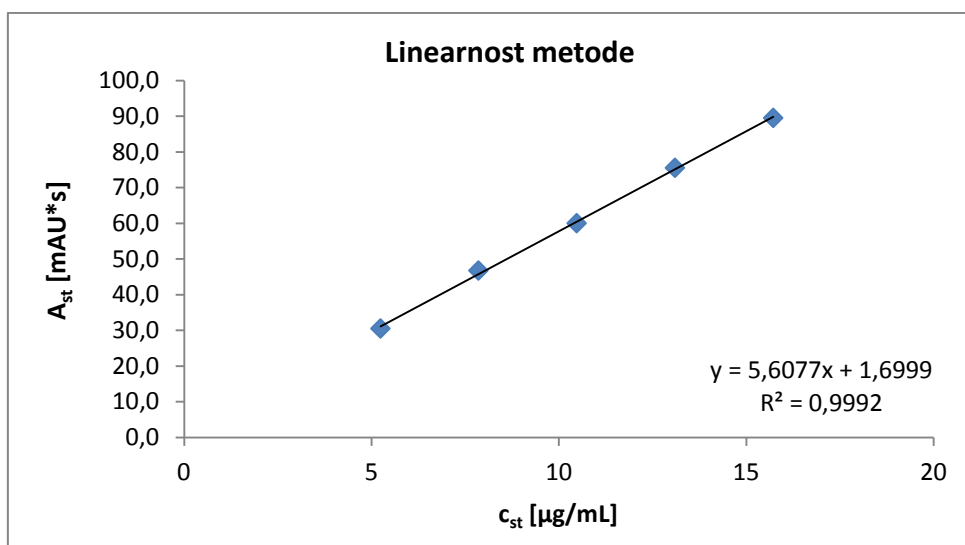


Vsi izkoristki so bili znotraj $100 \pm 5\%$, kar nam potrjuje točnost metode in ustreznost za določanje CoQ₁₀ v različnih tipih KI.

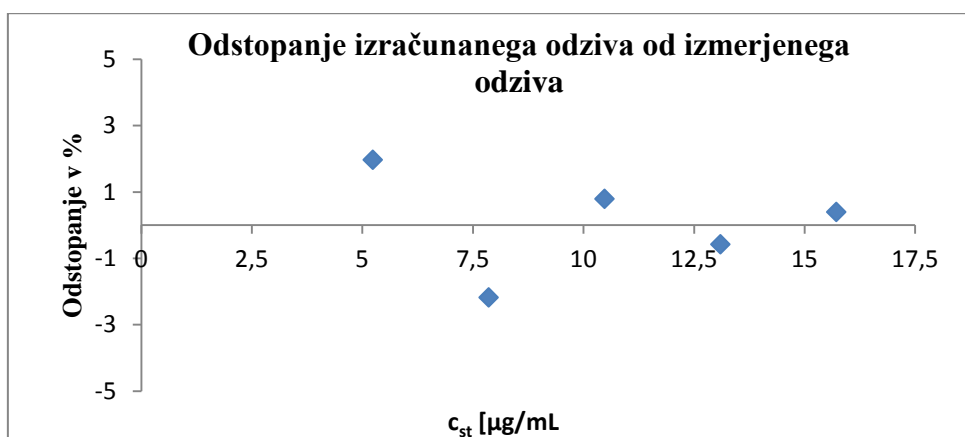
4.1.3 Območje linearnosti metode

Območje linearnosti metode smo določili s petimi raztopinami standarda v koncentracijskem območju od 50 % do 150 % običajnega delovnega območja. Koncentracije raztopin standarda so bile 5,24, 7,86, 10,48, 13,1 in 15,72 $\mu\text{g/mL}$. Linearnost smo podali s korelacijskim koeficientom in enačbo regresijske premice, ter kot odstopanje med izračunanim in izmerjenim odzivom v odstotkih.

Graf 2: Območje linearnosti metode določanja vsebnosti CoQ₁₀



Graf 3: Odstopanje izračunanega odziva od izmerjenega odziva



Metoda je linearna v območju od približno 5 do približno 15 $\mu\text{g/mL}$, to ustreza območju med 50 in 150 % delovnega območja, kar smo dokazali s korelacijskim koeficientom (R^2), ki je $\geq 0,99$.

4.2 Vsebnost koencima Q₁₀ v kozmetičnih izdelkih

Vsebnost CoQ₁₀ smo določili vsem 24 izdelkom. V nekaterih KI smo ovrednotili tudi stabilnost CoQ₁₀ po 2 in 4 tednih staranja v klimatski komori. Za vsako vrednotenje vzorcev smo preverili ustreznost kromatografskega sistema, tako da smo preverili ponovljivost z ustreznim RSD-jem treh injiciranj raztopine standarda. Kriterij za ustreznost je zapisan v poglavju 3.2.7.

4.2.1 Vsebnost koencima Q₁₀ v kozmetičnih izdelkih

Kozmetični izdelki, v katerih smo določali vsebnost CoQ₁₀, so bili različnega tipa (krema, losjon, maska itd.) in od različnih proizvajalcev. Pri vseh je bilo na embalaži poudarjeno, da vsebujejo CoQ₁₀. Vsebnost smo podali v µg učinkovine na g kozmetičnega izdelka, pri **vzorcema 13 in 22** tudi v µg učinkovine na kapsulo, pri **vzorcu 14** tudi v µg učinkovine na ampulo in pri **vzorcema 15 in 16** tudi v µg učinkovine na masko.

Tabela X: Vsebnost CoQ₁₀ v vzorcih

Št. vzorca	Vzorec	Določena vsebnost CoQ ₁₀ [µg/g KI]
1	NIVEA Body performance: Mleko za telo Q ₁₀	47,9
2	NIVEA: Losjon za telo Q ₁₀ performance	33,8
3	NIVEA Body performance: Olje za prožnostno kožo Q ₁₀	45,2
4	NIVEA: Krema za roke s Q ₁₀ proti staranju	50,5
5	NIVEA Visage Q ₁₀ plus: Dnevna krema	308
6	NIVEA Visage Q ₁₀ plus: Nočna krema	303
7	NIVEA Visage Q ₁₀ plus: Gel serum za obraz	682
8	NIVEA Visage Q ₁₀ : Krema za predel okoli oči s kroglico	319
9	CADEAVERA Vital: Dnevna krema proti gubicam s Q ₁₀	263
10	CADEAVERA Vital: Nočna krema proti gubicam s Q ₁₀	253
11	CADEAVERA Vital: Krema za predel okoli oči proti gubicam s Q ₁₀	329
12	CADEAVERA Vital: Serum proti gubicam Q ₁₀	238
13	CADEAVERA Vital: Kapsule proti gubicam s Q ₁₀	140
	Določena vsebnost CoQ ₁₀ / kapsulo	52,4
14	CADEAVERA Vital: Ampula s takojšnjim učinkom	247
	Določena vsebnost CoQ ₁₀ / ampulo	562

15	CADEAVERA Vital: Maska proti gubam s Q ₁₀	246
	Določena vsebnost CoQ ₁₀ / masko	2120
16	CADEAVERA Vital: Maska proti gubicam s Q ₁₀ za predel okoli oči	265
	Določena vsebnost CoQ ₁₀ / masko	400
17	SEBAMED Anti-ageing: Losjon za čvrsto kožo	180
18	SEBAMED Anti-ageing: Krema Q ₁₀ za obnovitev kože	201
19	SEBAMED Anti-ageing: Krema za oči	193
20	DECLARE Age control: Krema s Q ₁₀	91,3
21	EVELINE Anti-wrinkles: Krema proti gubam okoli oči	0,0
22	SCHAEBENS: Koncentrat za zrelo kožo	112
	Določena vsebnost CoQ ₁₀ / kapsulo	39,8
23	KAMILL: Krema za roke in nohte anti age s Q ₁₀	101
24	AVEO: Krema za roke anti age Q ₁₀	264

4.2.2 Stabilnost koencima Q₁₀

V vzorcih 3, 7 in 10 smo ovrednotili stabilnost CoQ₁₀ tako, da smo določili vsebnost CoQ₁₀ na začetku ter po dveh in štirih tednih staranja v klimatski komori, kjer so bili ti izdelki izpostavljeni stresnim pogojem (40°C in 70 % RV).

Tabela XI: Vsebnost CoQ₁₀ tekom staranja v klimatski komori

Vzorec	Določena vsebnost CoQ ₁₀ na začetku [µg/g KI]	Določena vsebnost CoQ ₁₀ po 2 tednih [µg/g KI]	Določena vsebnost CoQ ₁₀ po 4 tednih [µg/g KI]
3	45,2	/	44,9
7	683	678	678
10	253	254	253

Iz tabele XI je razvidno, da se vsebnost CoQ₁₀ v KI tekom umetnega staranja v klimatski komori ne spreminja, kar pomeni da je CoQ₁₀ v analiziranih izdelkih pri opazovanih pogojih stabilen.

5. RAZPRAVA

5.1 Optimizacija in verifikacija analizne metode določanja CoQ₁₀ v kozmetičnih izdelkih

Pri metodi za določanje vsebnosti CoQ₁₀ smo izhajali iz metode za vrednotenje vsebnosti ubidekarenona v želatinastih kapsulah, kot je predpisana v monografiji *Ubidecarenone capsules* ameriške farmakopeje 37 (47). Ker za farmakopejske metode velja, da so že validirane, nam metode ni bilo potrebno v celoti validirati, temveč smo jo le verificirali - potrdili njeno ustreznost za naše vzorce. Metoda po kateri smo se zgledovali, je prvenstveno namenjena določanju CoQ₁₀ v mehkih želatinastih kapsulah, ker smo imeli drugačne vzorce, smo najprej optimizirali postopek priprave raztopin vzorcev.

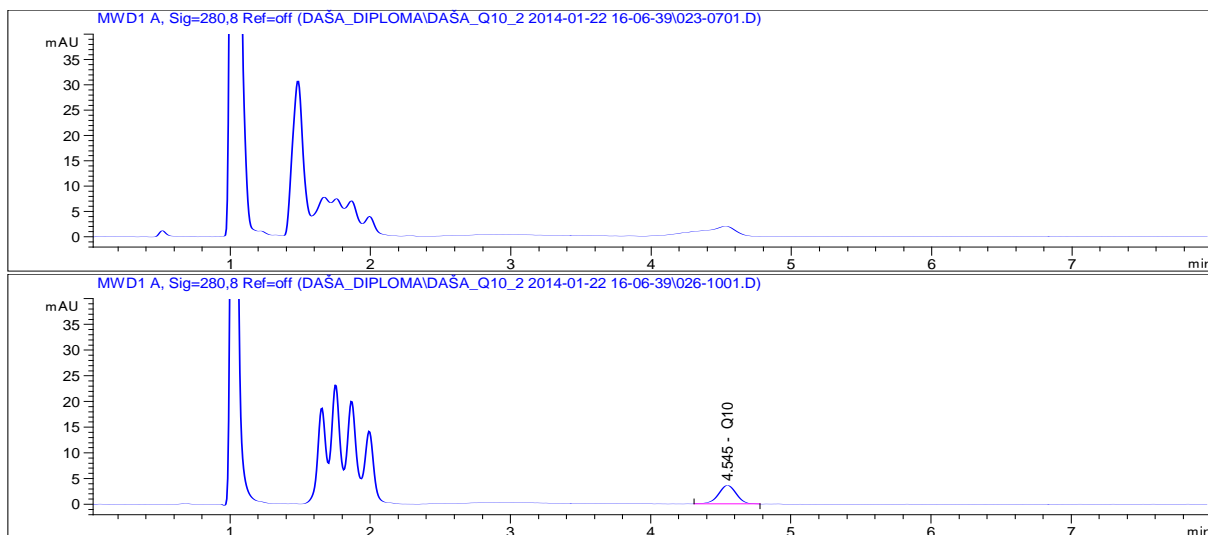
5.1.1 Optimizacija postopka priprave raztopin vzorcev in standardov

Optimizacija postopka priprave raztopine standarda

Zaradi relativno nizkih koncentracij CoQ₁₀ v vzorcih smo delovno koncentracijo znižali na 10,0 µg/mL. V nadaljevanju smo prilagodili mase zateht in volumne za raztapljanje vzorcev tako, da smo prišli v območje delovne koncentracije - preglednica IV v poglavju 3.2.2.

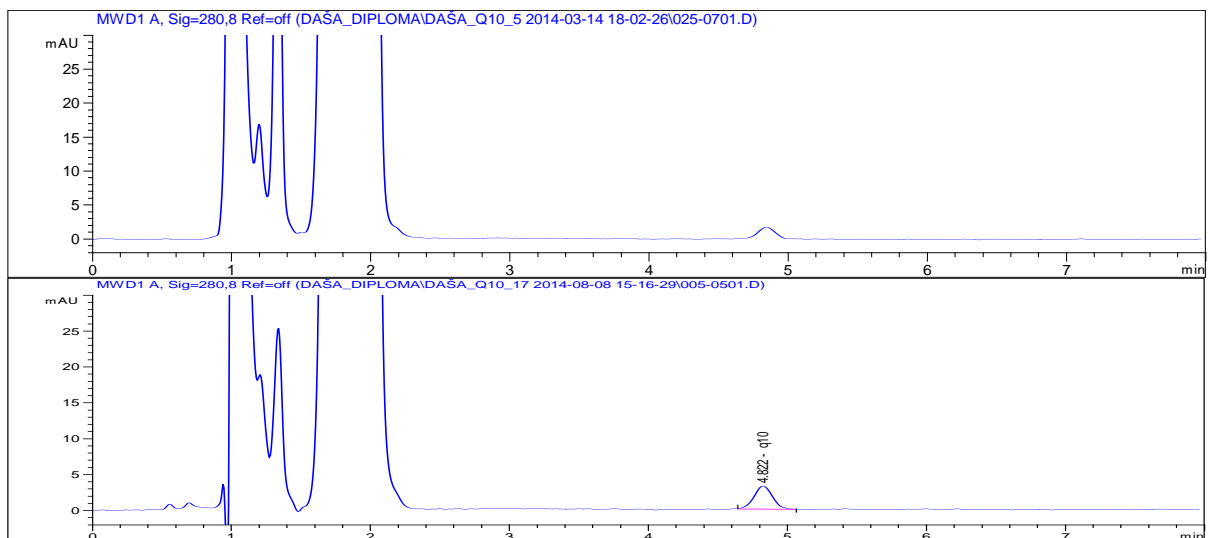
Optimizacija postopka priprave raztopin vzorcev

- Pri optimizaciji postopka priprave raztopin vzorcev smo preverili, če vsebujejo poleg oksidirane (kinonske) tudi reducirano (kinolno) obliko CoQ₁₀, le ta je manj obstojna in se hitro oksidira nazaj do kinona. V primeru, če bi bila prisotna tudi kinolna oblika CoQ₁₀, bi se to na kromatogramu odrazilo kot dodatni kromatografski vrh pred vrhom kinona. S tem namenom smo poleg spremljanja odziva pri 280 nm spremljali tudi signal pri 290 nm, vendar pri nobenem vzorcu nismo opazili prisotne reducirane oblike CoQ₁₀.
- V izvorni metodi je kot topilo za pripravo raztopin vzorcev in raztopin standardov uporabljeno topilo 1 (zmes brezvodnega etanola in n-heksana). Naredili smo primerjavo med raztapljanjem vzorcev v topilu 1 in topilu 2 (MF). Pri raztopinah vzorcev, za katere smo kot topilo uporabili MF, smo v kromatogramu dobili ostrejše, boljše ločene in bolj simetrične vrhove kot pri raztopinah pripravljenih s topilom 1, ki je bolj nepolarno zato smo se odločili, da bomo vzorce raztapljali v topilu 2.



Slika 5: Kromatogram raztopine vzorca, pripravljenega s topilom 1 (zgoraj) in s topilom 2 (spodaj)

- Vzorca 1 in 3 vsebujeta večji delež lipofilnih spojin kot ostali vzorci in tako pri uporabi topila 2 za pripravo raztopin vzorcev nista dajala zadovoljivih rezultatov, zato smo kot topilo za pripravo raztopin vzorcev uporabili topilo 3 (brezvodno topilo, zmes tetrahidrofurana in acetonitrila).



Slika 6: Kromatogram raztopine vzorca, pripravljenega s topilom 2 (zgoraj) in s topilom 3 (spodaj)

- S segrevanjem vzorcev bi načeloma lahko izboljšali raztapljanje vzorcev, vendar nam je primerjava rezultatov pokazala, da segrevanje ni potrebno.

Tabela XII: Vsebnost CoQ₁₀ v vzorcih brez in s segrevanjem

	Vsebnost CoQ ₁₀ [µg/mL] brez segrevanja	Vsebnost CoQ ₁₀ [µg/mL] s segrevanjem
Vzorec 9	259,9	260,1
Vzorec 14	247,4	243,7

5.1.2 Optimizacija kromatografskih pogojev

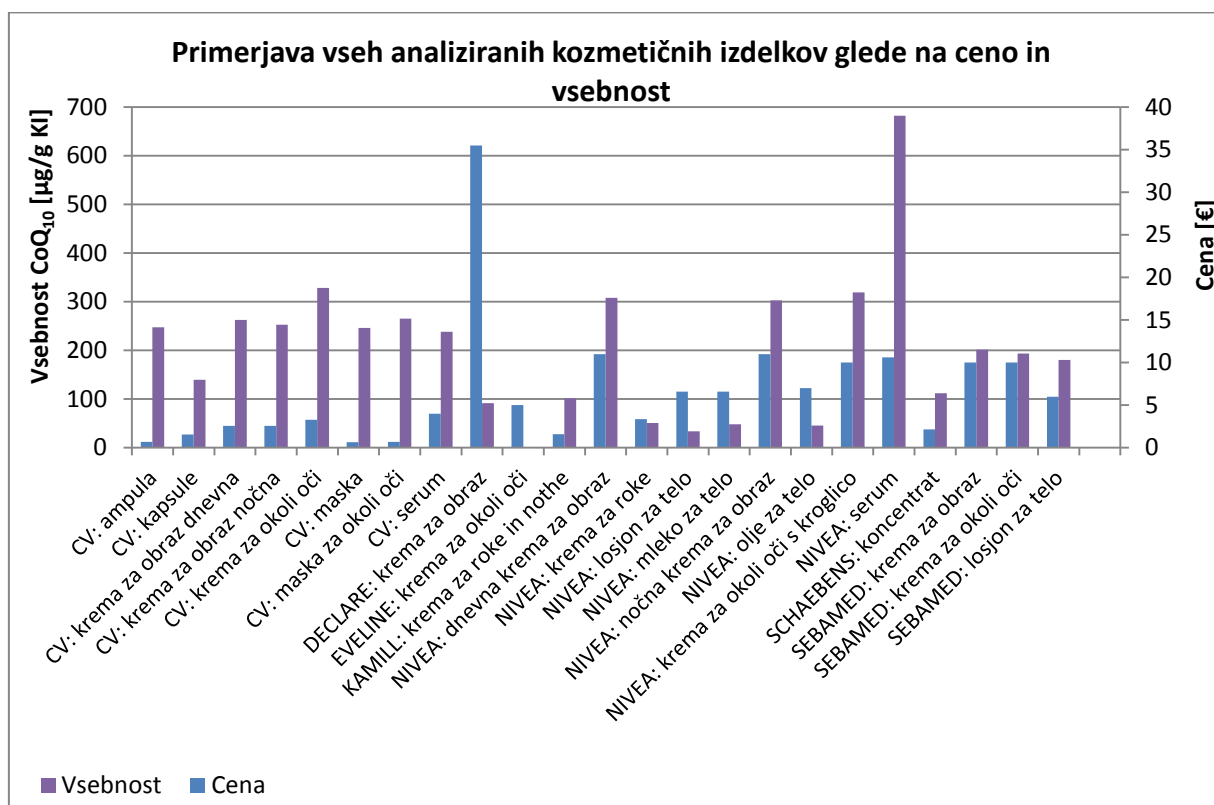
Namesto kolone uporabljene v metodi v ameriški farmakopeji (8 mm x 10 cm), smo uporabili kolono z enako stacionarno fazo (C18) in velikostjo delcev (5µm) drugih dimenzij (4,6 mm x 150 mm) ter ustrezno zmanjšali pretok mobilne faze na 1,5 mL/min (namesto 2,5 mL/min). Kromatogrami posameznih vzorcev so v prilogi 1.

5.2 Primerjava vsebnosti koencima Q₁₀ v KI

Vsebnosti CoQ₁₀ se v posameznih kozmetičnih izdelkih med seboj precej razlikujejo, kot je razvidno iz preglednice XII v poglavju 4.2.1. Dobljene rezultate smo primerjali glede na proizvajalca, vrsto kozmetičnega izdelka ter glede na ceno.

5.2.1 Primerjava vseh analiziranih KI

Diagram 1: Primerjava vsebnosti CoQ₁₀ v vseh vzorcih



Analizirani KI vsebujejo med 30 in 300 $\mu\text{g CoQ}_{10}$ na g KI z izjemo seruma proizvajalca NIVEA, pri katerem je vsebnost CoQ_{10} približno dvakrat višja. Glede na ceno izstopa DECLARE krema za obraz, ki je najdražja med analiziranimi izdelki, ki pa po drugi strani ne vsebuje prav veliko CoQ_{10} . Če primerjamo izdelke blagovne znamke CADEAVERA, ki so splošno cenejši kot izdelki proizvajalca NIVEA, ti v povprečju vsebujejo več CoQ_{10} .

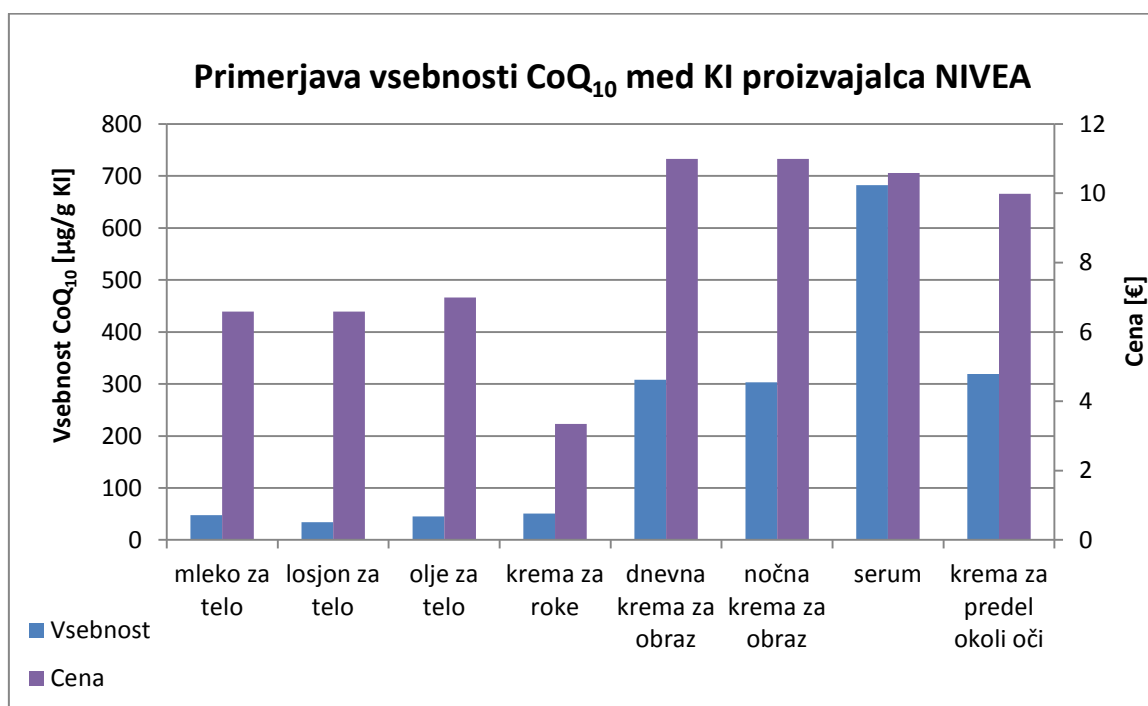
5.2.2 Primerjava vsebnosti koencima Q_{10} med različnimi KI istega proizvajalca

Primerjava kozmetičnih izdelkov proizvajalca NIVEA

Analizirane izdelke proizvajalca NIVEA lahko glede na vsebnost CoQ_{10} razdelimo na tri koncentracijska območja:

- KI z vsebnostjo $\text{CoQ}_{10} < 100 \mu\text{g/g KI}$
- KI z vsebnostjo CoQ_{10} med 100 in 400 $\mu\text{g/g KI}$
- KI z vsebnostjo $\text{CoQ}_{10} > 400 \mu\text{g KI}$.

Diagram 2: Primerjava vsebnosti CoQ_{10} v KI proizvajalca NIVEA



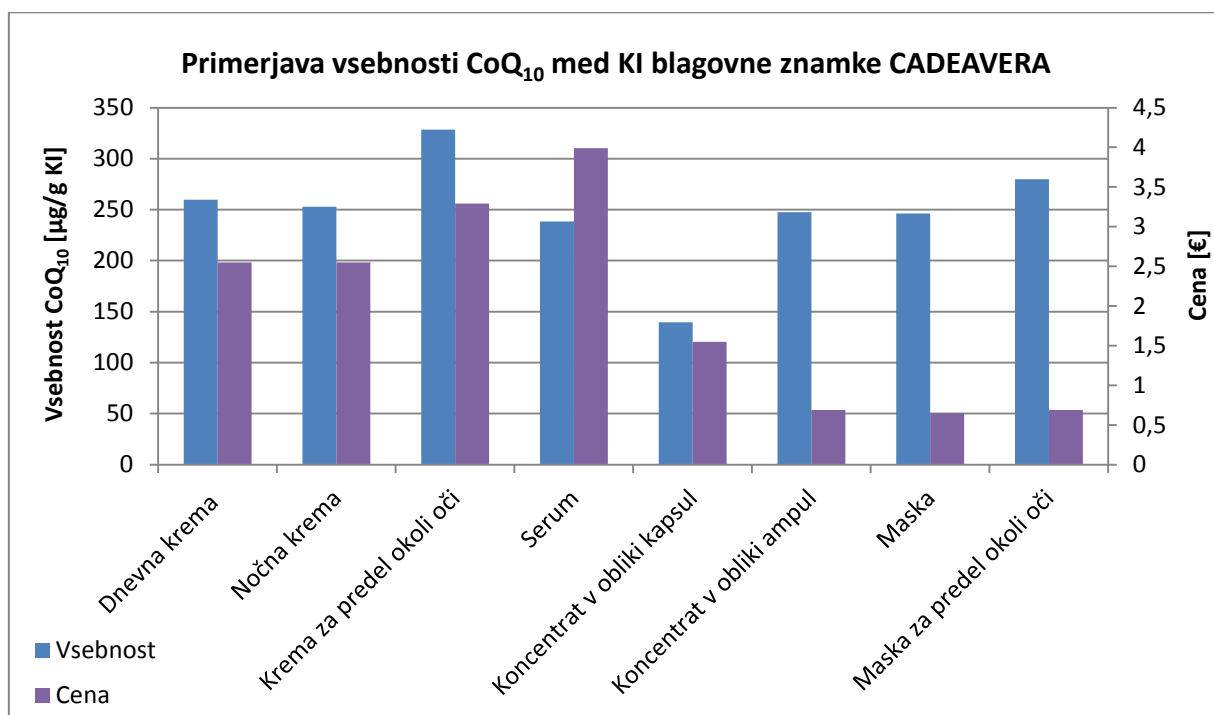
V skupino izdelkov z nižjo vsebnostjo spadajo KI namenjeni negi telesa kot so losjon, olje in mleko za telo ter krema za roke. Ti izdelki se nanašajo na večjo površino kože, posledično jih za enkratni nanos uporabimo več, zaradi česar so pakirani v večjih količinah in so cenejši v primerjavi s KI namenjenih negi obraza. V vmesno koncentracijsko območje spadajo KI namenjeni negi obraza kot sta nočna in dnevna krema za nego obraza ter krema za predel okoli oči. Le ti se uporabljajo na manjši površini kože, v manjših

količinah, zato so pakirani v manjših količinah in so dražji od KI namenjenih negi telesa. Najvišjo vsebnost CoQ₁₀ med analiziranimi izdelki proizvajalca NIVEA ima serum za nego obraza, kar je v skladu z razlago kozmetične oblike seruma, ki je napisana v poglavju 1.4.1.

Primerjava kozmetičnih izdelkov blagovne znamke CADEAVERA

Analizirani KI blagovne znamke CADEAVERA se nahajajo v približno istem cenovnem razredu in koncentracijskem območju glede na vsebnost CoQ₁₀, glede mesta uporabe pa vsi spadajo pod KI namenjene negi obraza. Med analiziranimi izdelki so bili tudi serum, ter koncentrata v obliki kapsul in amuple za katere bi pričakovali opazno višjo vsebnost aktivne učinkovine glede na ostale KI. Najvišjo ceno in vsebnost CoQ₁₀ ima krema za predel okoli oči, najmanjšo ceno ter vsebnost CoQ₁₀ pa ima koncentrat v obliki kapsul, kar se ne sklada z razlago izrazov v poglavju 1.4.1.

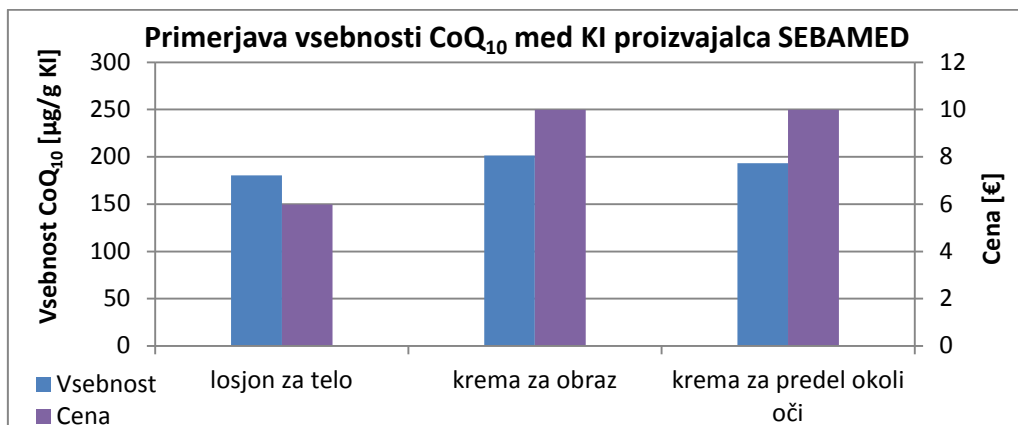
Diagram 3: Primerjava vsebnosti CoQ₁₀ blagovne znamke CADEAVERA



Primerjava kozmetičnih izdelkov proizvajalca SEBAMED

Pri KI proizvajalca SEBAMED ni tako velikih razlik pri vsebnosti CoQ₁₀ v različnih vrstah KI kot pri KI proizvajalca NIVEA. Izdelek, namenjen negi telesa je cenejši in vsebuje nekoliko manj CoQ₁₀ kot KI namenjeni negi obraza, vendar so vsebnosti še vedno v istem velikostnem razredu.

Diagram 4: Primerjava vsebnosti CoQ₁₀ v KI proizvajalca SEBAMED

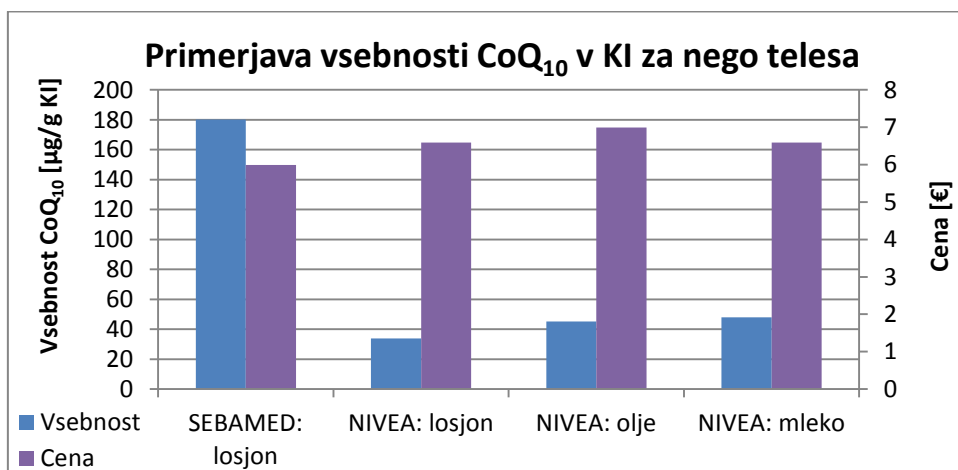


5.2.3 Primerjava vsebnosti koencima Q₁₀ glede na vrsto KI in ceno

Primerjava kozmetičnih izdelkov za nego telesa

Cenovno se analizirani KI namenjeni negi telesa gibljejo v približno istem cenovnem razredu, glede vsebnosti CoQ₁₀ pa z izjemo losjona proizvajalca SEBAMED, ki ima bistveno višjo vsebnost CoQ₁₀ kot ostali, ne presegajo 100 µg/g KI.

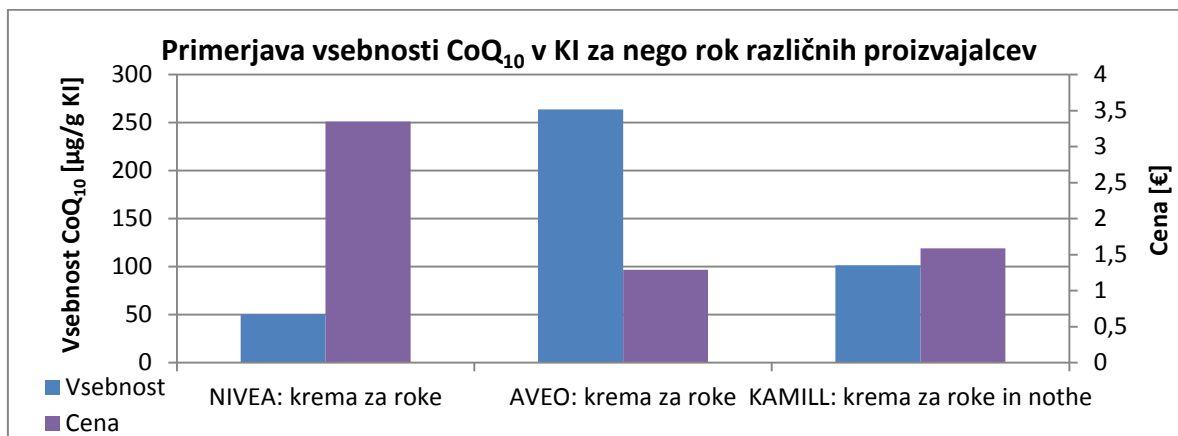
Diagram 5: Primerjava vsebnosti CoQ₁₀ v KI za nego telesa



Primerjava krem za nego rok

Analizirani KI za nego rok vsebujejo od približno 50 µg do 300 µg CoQ₁₀ na g KI, pri čemer vrednosti precej variirajo glede na proizvajalca. Najnižjo vsebnost CoQ₁₀ ima krema za roke proizvajalca NIVEA, kljub temu da je najdražja med primerjanimi izdelki.

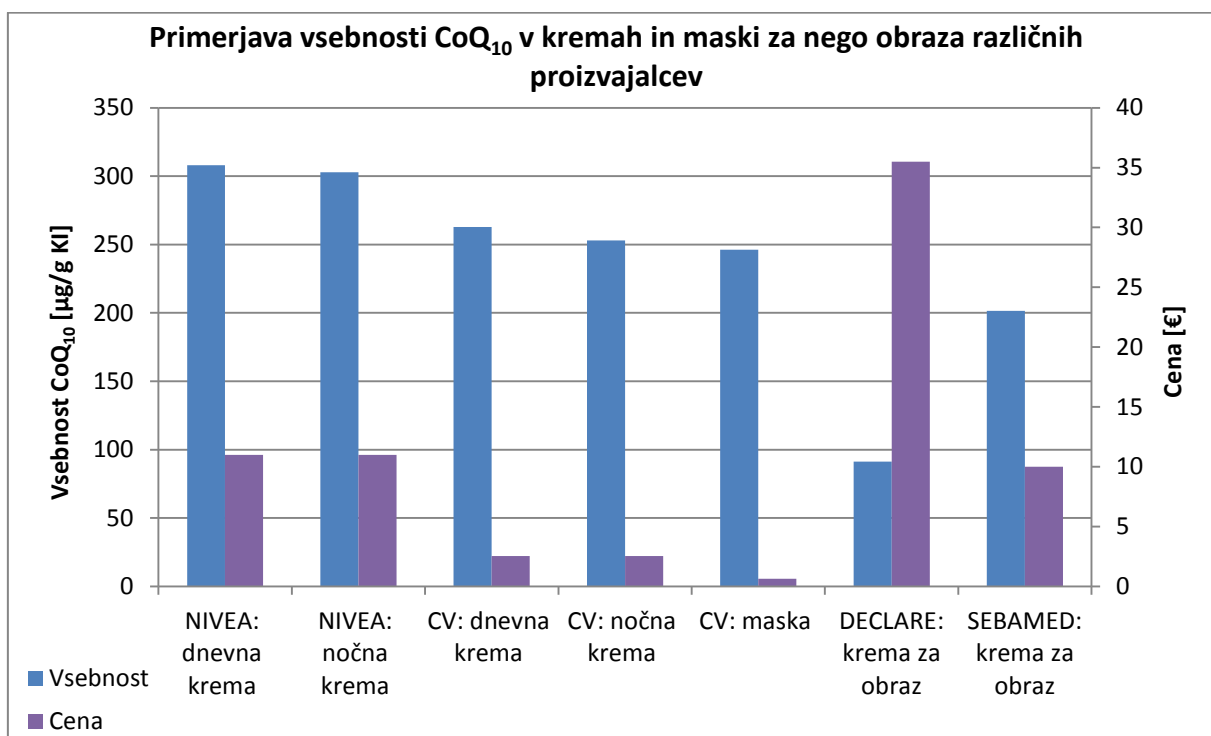
Diagram 6: Primerjava vsebnosti CoQ₁₀ v kremah za roke



Primerjava krem in maske za nego obraza

Splošno se koncentracija CoQ₁₀ v KI namenjenih negi obraza giblje med 200 do 350 µg/g. Bistveno izstopa izdelek proizvajalca DECLARE, ki poleg tega da je najdražji analizirani KI, vsebuje najmanj CoQ₁₀ med negovalnimi KI za obraz. Cenovno izstopajo KI blagovne znamke CADEAVERA, ki so najcenejši med analiziranimi izdelki, po vsebnosti CoQ₁₀ pa kljub temu ne zaostajajo bistveno za ostalimi proizvajalci.

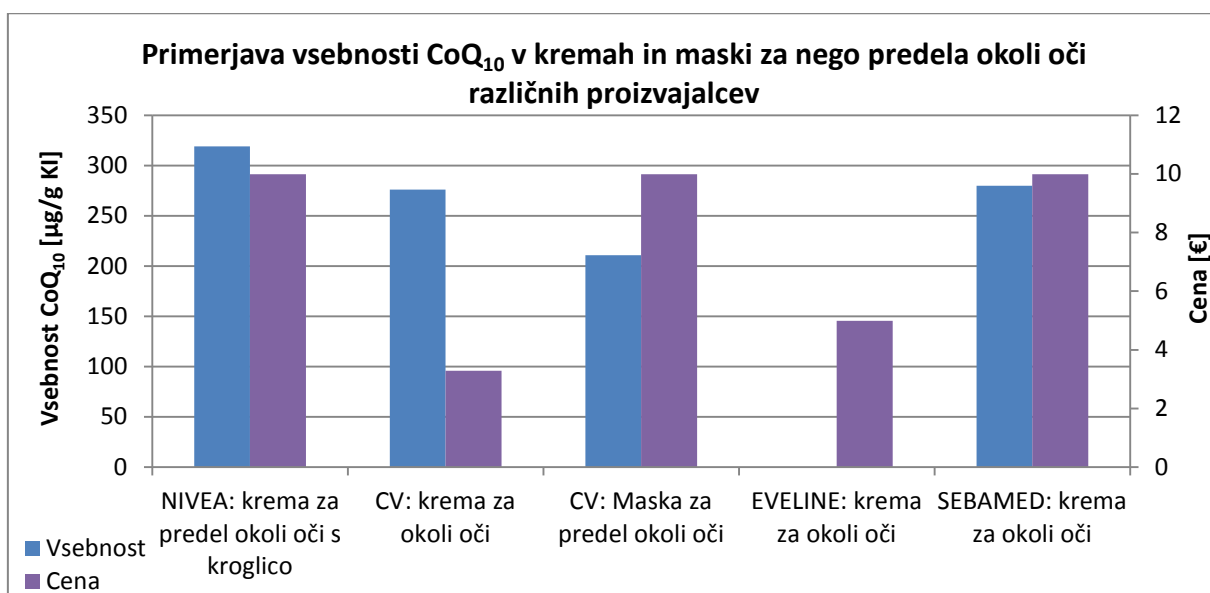
Diagram 7: Primerjava vsebnosti CoQ₁₀ v kremah in maski za nego obraza različnih proizvajalcev



Primerjava krem in maske za nego kože na predelu okoli oči

Analizirani KI namenjeni negi predela okoli oči vsebujejo med 150 µg do 350 µg CoQ₁₀ na g KI. Cene teh izdelkov precej nihajo od proizvajalca do proizvajalca. Med vrednotenimi izdelki je tudi krema, v kateri je vsebnost CoQ₁₀ prenizka, da bi jo uspeli določiti (če ga sploh vsebuje), čeprav je naveden med sestavinami, ki naj bi jih izdelek vseboval. V kolikor izdelek CoQ₁₀ ne vsebuje kljub navedbi na embalaži, to ni v skladu z Uredbo Evropskega Sveta 1223/2009 (Poglavje VI, člen 19) (40).

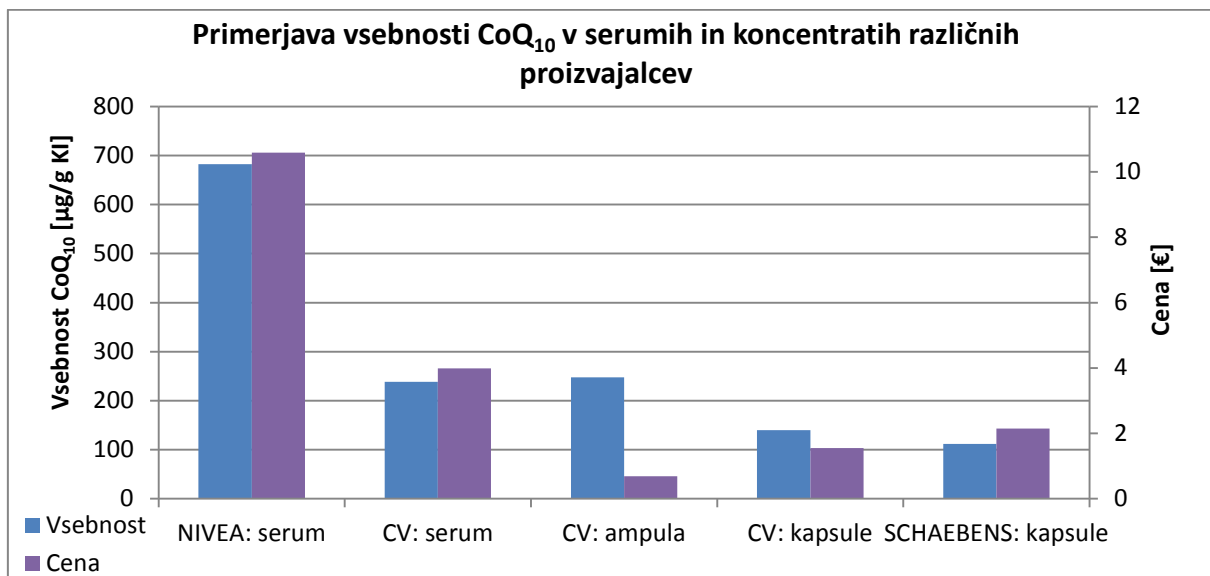
Diagram 8: Primerjava vsebnosti CoQ₁₀ v kremah in maski za predel okoli oči



Primerjava serumov in koncentratov

Vsebnosti CoQ₁₀ v serumih in koncentratih imajo širok razpon vsebnosti, ki se gibljejo med 100 in 700 µg CoQ₁₀ na g KI. Tako po ceni kot vsebnosti aktivne učinkovine najbolj izstopa serum proizvajalca NIVEA, vsi ostali pa se nahajajo v približno enakem cenovnem razredu ter koncentracijskem območju.

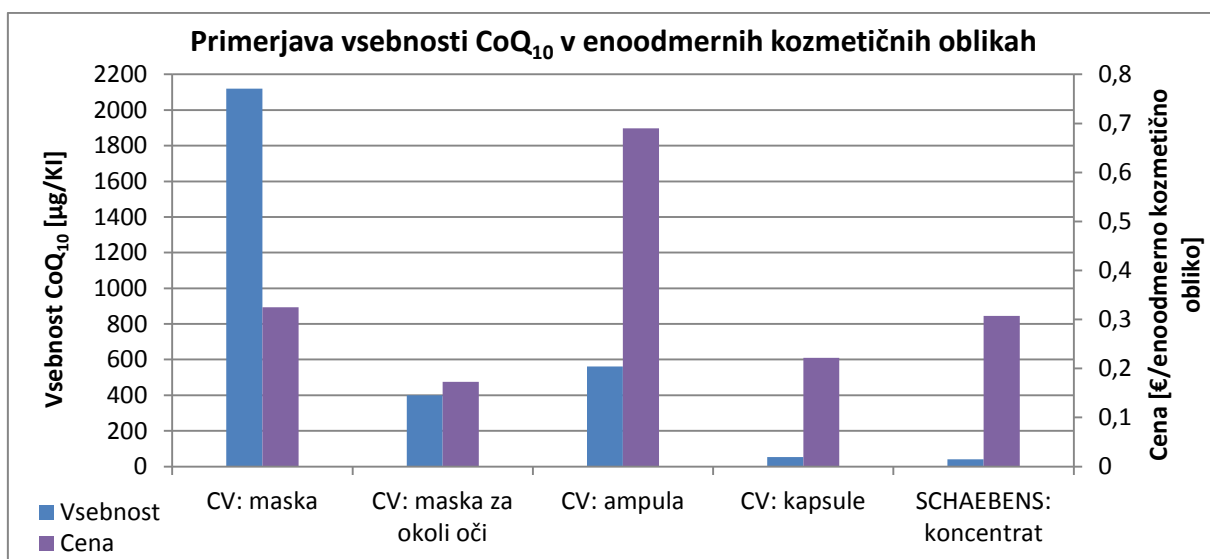
Diagram 9: Primerjava vsebnosti CoQ₁₀ v serumih in koncentratih



Primerjava enodmernih kozmetičnih oblik

Vsebnost CoQ₁₀ v enodmernih kozmetičnih oblikah na prvi pogled precej niha, vendar je potrebno upoštevati, da so precej različne tudi same mase KI. Primerjani izdelki so namenjeni negi kože na predelu okoli oči z izjemo maske proizvajalca CADEAVERA, ki je namenjena nanosu na obraz in vrat - večjo površino kože, zaradi česar je količina samega izdelka večja in posledično je bistveno večja tudi vsebnost CoQ₁₀ na enkratni nanos.

Diagram 10: Primerjava vsebnosti CoQ₁₀ v enodmernih kozmetičnih oblikah



6. SKLEP

V diplomskem delu smo določili vsebnost koencima Q_{10} v različnih vrstah kozmetičnih izdelkov. Analizno metodo smo najprej optimizirali, predvsem postopek priprave raztopin vzorcev glede na vrsto kozmetičnega izdelka. Ustreznost postopka smo potrdili tako, da smo dokazali ustrezno točnost, natančnost in linearnost. Kromatografski vrh koencima Q_{10} je bil v vseh kromatogramih jasno ločen od ostalih. Tekom diplomske naloge smo prišli do naslednjih rezultatov in zaključkov:

- Koencim Q_{10} se nahaja v kozmetičnih izdelkih v mikrogramskih količinah.
- Med analiziranimi izdelki je vsebnost koencima Q_{10} samo v enem primeru večja od $600 \mu\text{g/g KI}$, pri 4 izdelkih je manjša od $400 \mu\text{g/g KI}$ in večja od $300 \mu\text{g/g KI}$, pri 7 izdelkih je manjša od 300 in večja od $200 \mu\text{g/g KI}$, ter pri 5 izdelkih je manjša od 200 in večja od $100 \mu\text{g/g KI}$, pri ostalih 7 izdelkih pa je vsebnost manjša od $100 \mu\text{g/g KI}$.
- V **vzorcu 21** kljub predpisom Uredbe Evropskega Sveta 1223/2009 (Poglavje VI, Člen 19) (40), da morajo biti na embalaži kozmetičnih proizvodov navedene samo sestavine, ki jih izdelek dejansko vsebuje, nismo zasledili koencima Q_{10} .
- Vsebnost koencima Q_{10} v analiziranih kozmetičnih izdelkih proizvajalca NIVEA variira glede vrsto in namen uporabe izdelka v skladu s pričakovanji.
- Analizirani izdelki blagovne znamke CADEAVERA vsebujejo približno enako količino koencima Q_{10} ne glede na vrsto kozmetičnega izdelka in namen uporabe.
- Izdelki, ki se prodajajo kot serumi in koncentraciji v kapsulah ali ampulah, ne vsebujejo nujno večjih količin aktivne učinkovine kot ostali kozmetični izdelki, čeprav bi to pričakovali.
- Analizirani izdelki za nego telesa vsebujejo manjše količine koencima Q_{10} kot kozmetični izdelki namenjeni negi kože obraza ter kože na predelu okoli oči.
- Ovrednotene kreme za roke so vsebovale več koencima Q_{10} kot večina izdelkov namenjenih negi telesa in manj kot kozmetični izdelki namenjeni negi obraza.
- Kreme za obraz in kreme za predel okoli oči vsebujejo približno enake koncentracije koencima Q_{10} .

Rezultati pridobljeni s testiranjem stabilnosti koencima Q_{10} med staranjem v stabilnostni komori pri stresnih razmerah nam potrjujejo stabilnost učinkovine pod preučevanimi pogoji, kar pomeni, da tekom uporabe ne prihaja do interakcij med učinkovino ter ostalimi sestavinami ali z embalažo kozmetičnih izdelkov.

7. LITERATURA

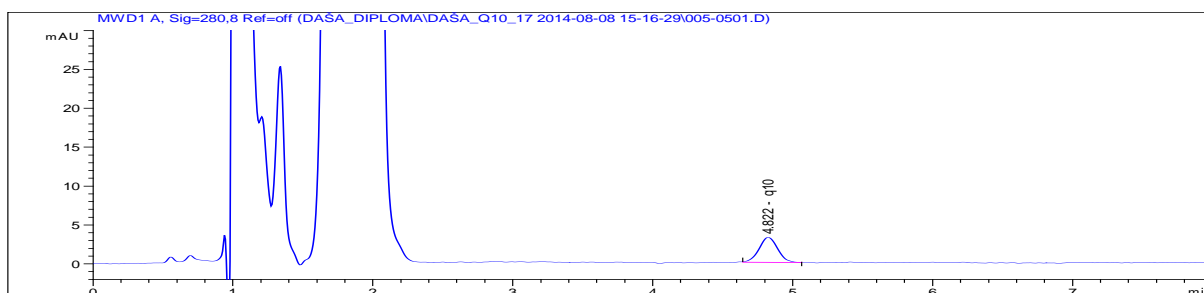
1. Norman R. A: 100 Questions & Answers About Aging Skin, Jones and Bartlett publishers, Sudbury, Massachusetts, 2010, 2-5
2. Farage M. A, Miller K. W, Maibach H. I: Textbook of Aging Skin, Springer - Verlag, Berlin Heidelberg, 2010, 25-31
3. Barel O. A, Paye M, Maibach H. I: Handbook of cosmetic science and technology, third edition, Informa Healthcare USA, New York, 2009, 291-293
4. Shai A, Maibach I. H, Baran R: Handbook of Cosmetics Skin Care, second edition, Informa healthcare, United Kingdom, 2009, 4-13, 46-56
5. Mitsui T: New Cosmetic Science, First edition, Elsevier, Amsterdam, Nizozemska, 1997, 13, 38-46,
6. Amirlak B, Shahabi L: Skin anatomy; Medscape
(<http://emedicine.medscape.com/article/1294744-overview#showall> dostop: 26.7.2014)
7. Martinčič Š. D, Cör A, Cvetko E: Anatomija, Histologija, Fiziologija, druga izdaja, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija, 2008, 23 - 29
8. Tabor A, Blair R: Nutritional Cosmetics: Beauty from Within, first edition, Elsevier Inc., Burlington, USA, 2009, 8-18
9. <http://en.wikipedia.org/wiki/Ultraviolet> dostop: 27.7.2014
10. Kočevar Glavač N, Zvonar A: KOZMETOLOGIJA II: Koža in sonce: Kozmetično aktivne sestavine: izdelki za zaščito in aktivno nego kože: strokovno izobraževanje, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2012, 8 - 31, 69
11. http://en.wikipedia.org/wiki/Singlet_oxygen dostop: 28.7.2014
12. Pečar S: Radikali v našem življenju, Kemija v šoli, letnik 18, št.3, oktober 2006
13. Pratt W. C, Cornely K: Essential Biochemistry, Third Edition, John Wiley and Sons, Inc., USA, 2014, 407-415
14. [http://sl.wikipedia.org/wiki/Radikal_\(kemija\)#Nastanek](http://sl.wikipedia.org/wiki/Radikal_(kemija)#Nastanek) dostop: 29.7.2014
15. Pečar S: Radikali v našem okolju, Kemija v šoli, letnik 18, št.2, junij 2006
16. Halliwell B: Free Radicals and other reactive species in Disease, Encyclopedia of life science, Nature Publishing Group, 2001
(http://web.sls.hw.ac.uk/teaching/level4/bcm1_2/reading/oxidative_stress/files/Oxidative_stress.pdf dostop: 29.7.2014)

17. Pappas A: Nutrition and Skin Lessons for Anti-Aging, Beauty and Healthy Skin, Springer, USA, 2011, 80 - 87
18. Mravljak J, Peterlin Mašič L: Antioksidanti, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za farmacevtsko kemijo
19. Baumann L: Cosmetic Dermatology, Principles and Practice, Second Edition, The McGraw-Hill Companies Inc, 2009, 292-295
20. Armstrong D: Methods in molecular biology: Oxidative Stress Biomarkers and Antioxidant Protocols, Humana Press, New Jersey, 2002. 241-246
21. <http://en.wikipedia.org/wiki/Pro-oxidant> dostop: 29.7.2014
22. Surh Y. J, Packer L: Oxidative stress, inflammation and health, Taylor & Francis, USA, 2005, 2-9
23. Valko M, Leibfritz D, Moncol J: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, vol.39, 2007, 44-84
24. Nelson L. D, Cox M. M: Lehninger Principles of Biochemistry, Sixth edition, Macmillan, USA, 2012, 722
25. Manahan E. S: Toxicological Chemistry and Biochemistry, Third Edition, Lewis Publishers, USA, 2003, 242-244
26. Denisov T. Evgeny, Afanas'ev B. I: Oxidation and Antioxidants in Organic Chemistry and Biology, Taylor & Francis Group, USA, 2005, 849-861
27. http://en.wikipedia.org/wiki/Coenzyme_Q10 dostop:31.7.2014
28. Žmitek J, Žmitek K: Koencim Q₁₀ kot prehransko dopolnilo in zdravilo, Farm. Vestn vol 60, 2009, 150 - 157
29. <http://sl.wikipedia.org/wiki/Ubikinon> dostop: 31.7.2014
30. Hoppe U, Bergemann J: Coenzyme Q₁₀, a cutaneous antioxidant and energizer, BioFactors 9, IOS Press, Amsterdam, 1999, 371-378
31. Orellana J: Use and abuse of coenzyme Q₁₀, The Healthy Skin Blog (<http://www.thehealthyskinblog.org/use-and-abuse-of-coenzyme-q10/> dostop: 31.7.2014)
32. http://www.mattilsynet.no/kosmetikk/stoffer_i_kosmetikk/risk_profile_of_coq10_and_idebenone_0110.11369/binary/Risk%20Profile%20of%20CoQ10%20and%20Idebenone%200110 dostop: 31.7.2014
33. <http://www.ucl.ac.uk/~ucbcdab/oxphos/carriers.htm> dostop: 11.8.2014

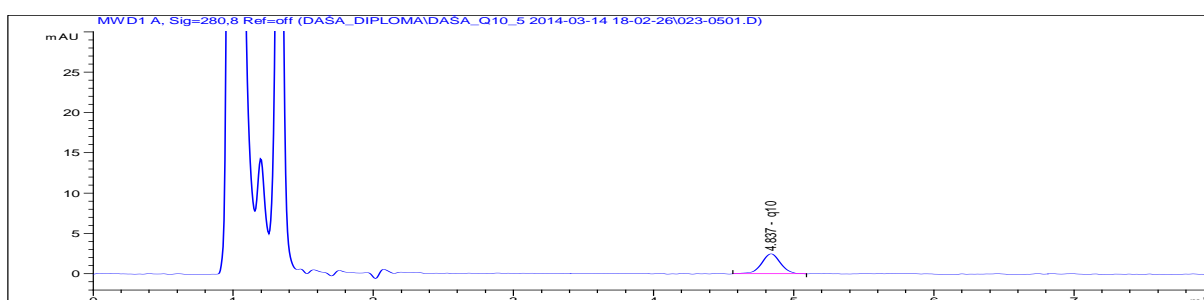
34. <http://en.wikipedia.org/wiki/Semiquinone> dostop: 31.7.2014
35. Vollhardt P, Schore N: Organic Chemistry Structure and Function, Sixth Edition, W. H. Freeman and Company, New York, 2010, 1054-1055
36. Coenzyme Q₁₀ in cosmetic (<http://www.makingcosmetics.com/articles/34-coenzyme-q10-in-cosmetics.pdf> dostop: 31.7.2014)
37. <http://www.specialchem4cosmetics.com/services/inci/ingredient.aspx?id=14390> dostop: 1.8.2014
38. http://www.unilever.com/PIOTI/EN/confidence/Ingredient_definitions.asp?selectCountry=UK&language=EN dostop: 1.8.2014
39. http://www.kyowa.eu/files/pdfs/Coenzyme_Q10.pdf dostop: 31.7.2014
40. Uredba (ES) št.1223/2009 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 30. novembra 2009 o kozmetičnih izdelkih (<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:342:0059:0209:sl:PDF> dostop: 1.8.2014)
41. Humar M, Šmid Korbar J, Obreza A: Farmacevtski terminološki slovar, 2011 (<http://isjfr.zrc-sazu.si/sl/terminologisce/slovarji/farmacevtski#v> dostop: 2.8.2014)
42. COLIPA, CTFA: Guidelines on stability testing of cosmetic products, 2004 (<https://www.cosmeticseurope.eu/publications-cosmetics-europe-association/guidelines.html> 3.8.2014)
43. Slovenska Akreditacija 0A03: Merilna negotovost pri kemijskem preskušanju v skladu s standardom SIST EN ISO/IEC 17025, izdaja 3, 13.12.2006, 5
44. I. N. Papadoyannis, V. F. Samanidou: HPLC Instrumentation: Validation, Encyclopedia of chromatography, Third edition, Volume II, 2010, 1118-1132
45. ICH Harmonised Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1), November 2005
46. EuroChem: The fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 1998
47. Ubidecarenone Capsules. United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 37-NF 32). Vol 1. Rockville, MD: United States Pharmacopeia Convetion; 2014:1461-1462

PRILOGE

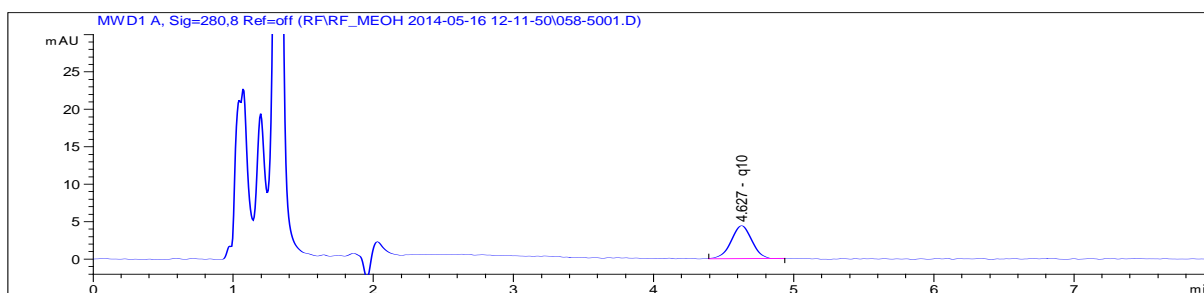
PRILOGA 1: KROMATOGRAMI VZORCEV



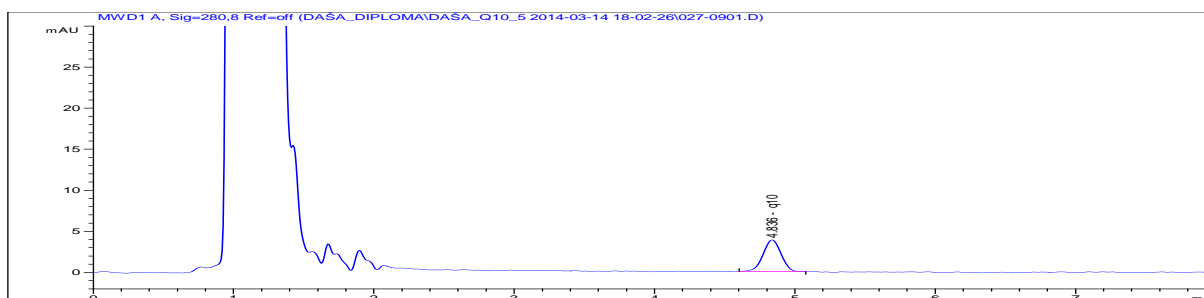
Slika 7: Kromatogram vzorca 1 (NIVEA Body performance Mleko za telo Q₁₀)



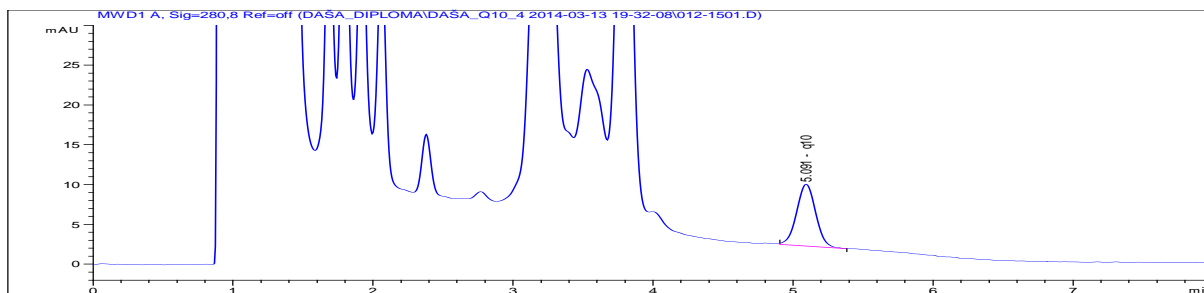
Slika 8: Kromatogram vzorca 2 (NIVEA Losjon za telo Q₁₀ performance)



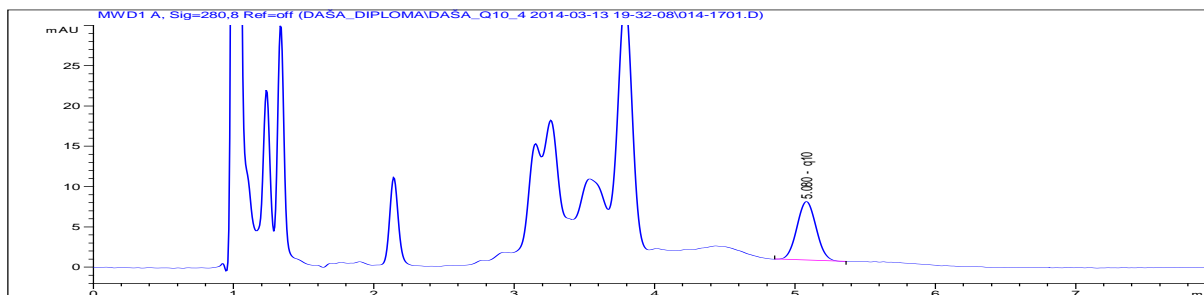
Slika 9: Kromatogram vzorca 3 (NIVEA Body performance Olje za prožnostno kožo Q₁₀)



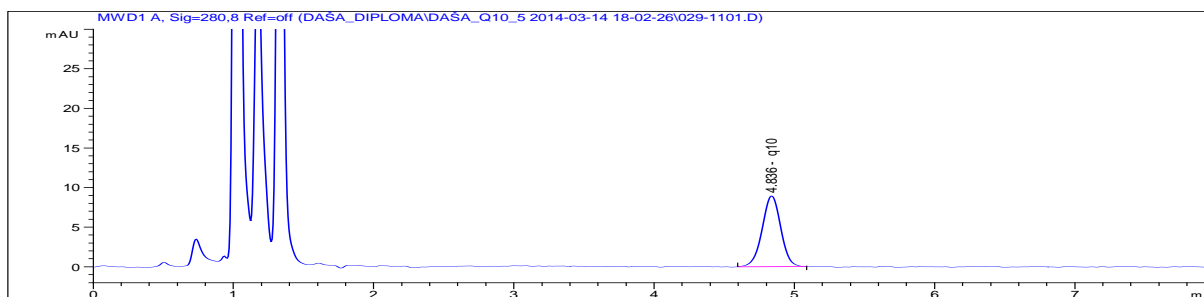
Slika 10: Kromatogram vzorca 4 (NIVEA Krema za roke s Q₁₀ proti staranju)



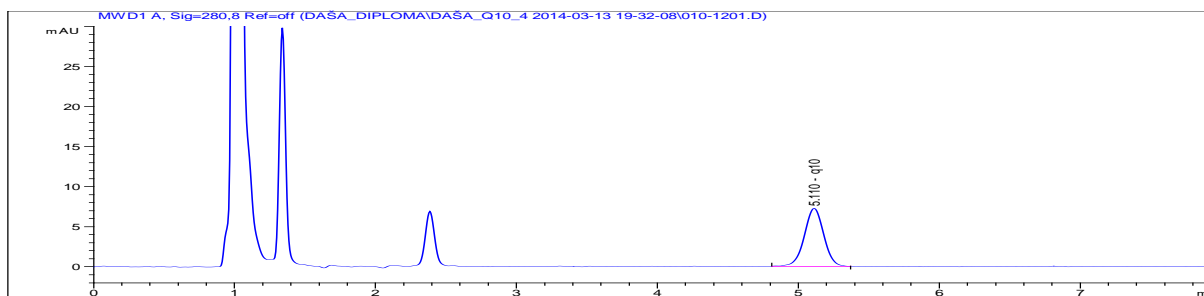
Slika 11: Kromatogram vzorca 5 (NIVEA Visage Q₁₀ plus Dnevna krema)



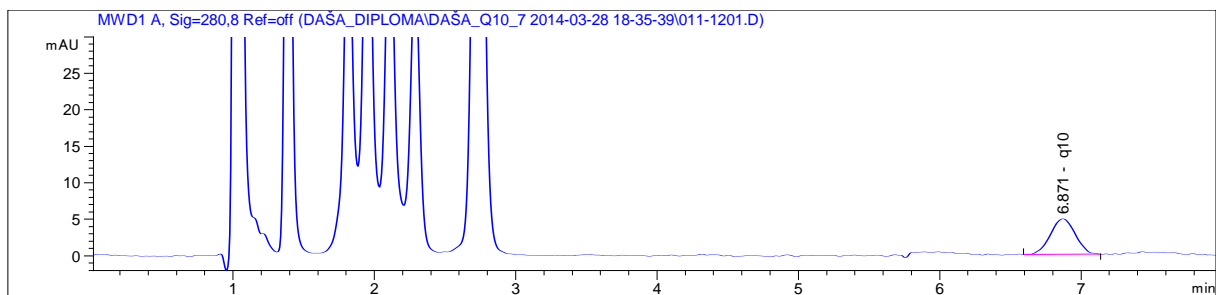
Slika 12: Kromatogram vzorca 6 (NIVEA Visage Q₁₀ plus Nočna krema)



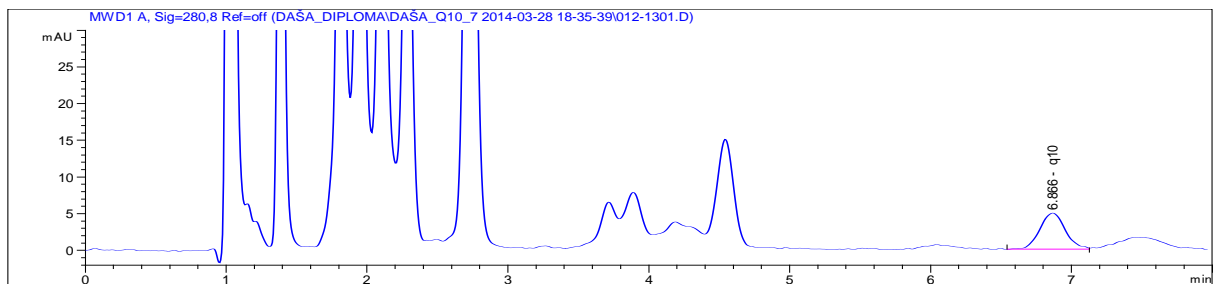
Slika 13: Kromatogram vzorca 7 (NIVEA Visage Q₁₀ plus Gel serum za obraz)



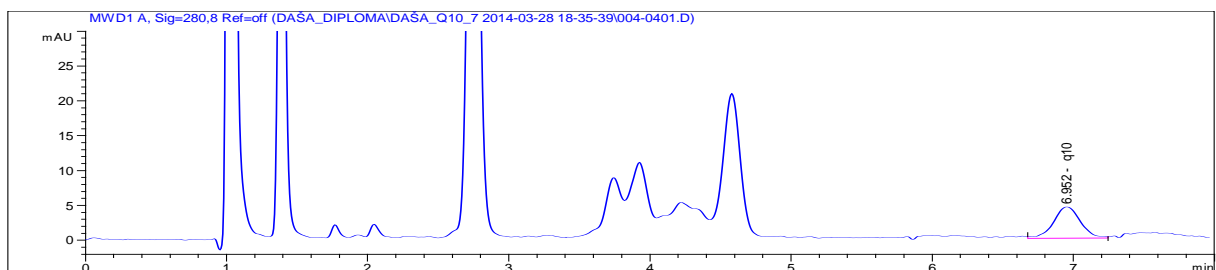
Slika 14: Kromatogram vzorca 8 (NIVEA Visage Q₁₀ Krema za predel okoli oči s kroglico)



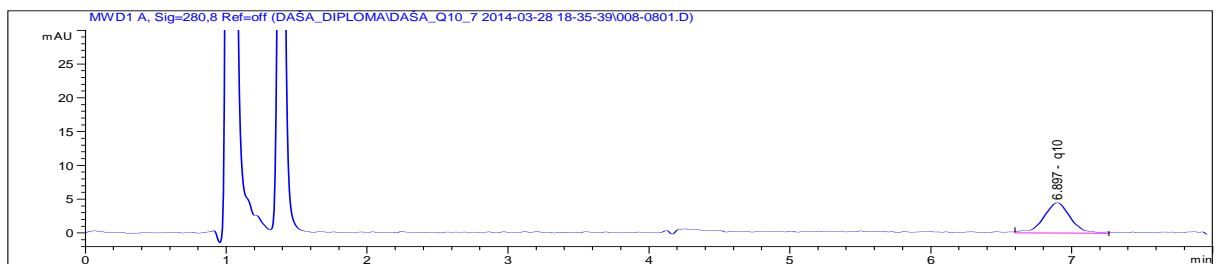
Slika 15: Kromatogram vzorca 9 (CADEAVERA Vital Dnevna krema proti gubicam s Q₁₀)



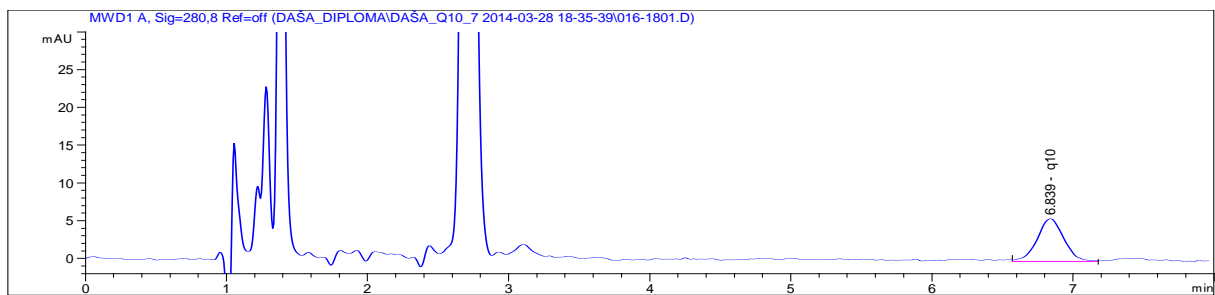
Slika 16: Kromatogram vzorca 10 (CADEAVERA Vital Nočna krema proti gubicam s Q₁₀)



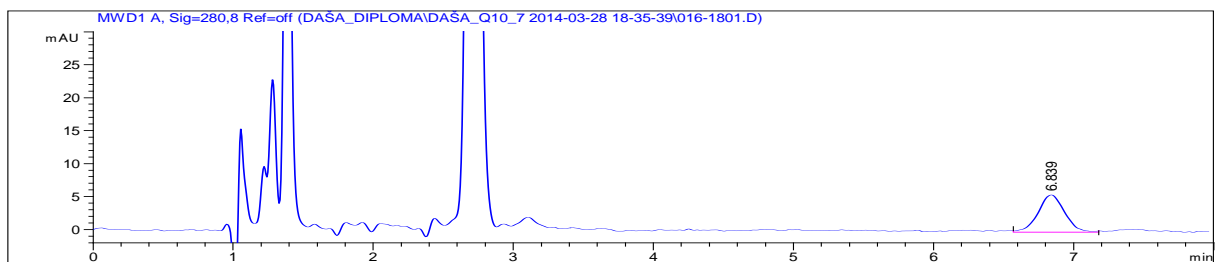
Slika 17: Kromatogram vzorca 11 (CADEAVERA Vital Krema za predel okoli oči proti gubicam s Q₁₀)



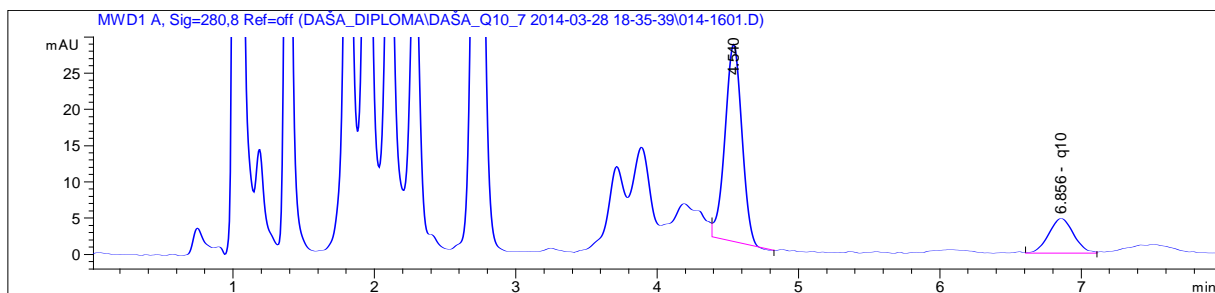
Slika 18: Kromatogram vzorca 12 (CADEAVERA Vital Serum proti gubicam s Q₁₀)



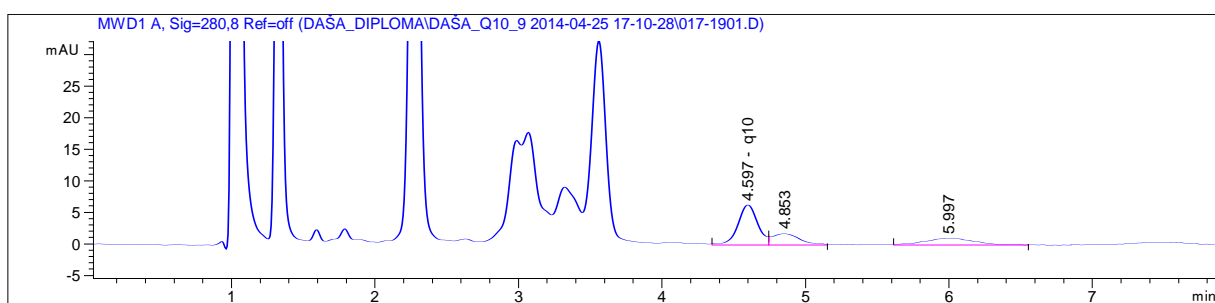
Slika 19: Kromatogram vzorca 13 (CADEAVERA Vital Kapsule proti gubicam s Q₁₀)



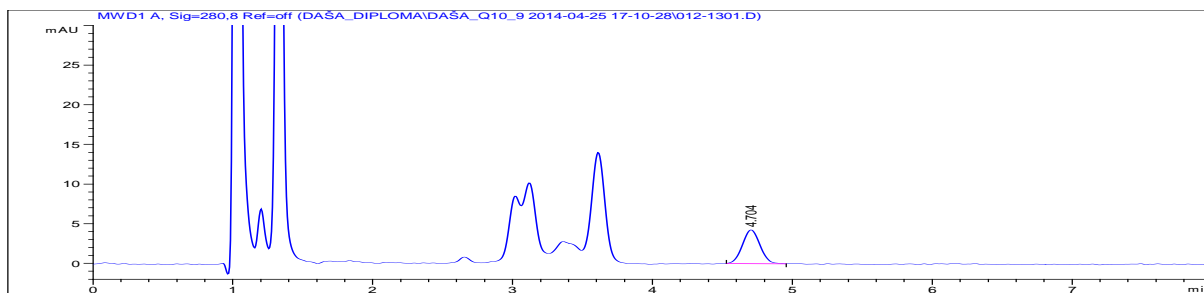
Slika 20: Kromatogram vzorca 14 (CADEAVERA Vital Ampula s takojšnjim učinkom)



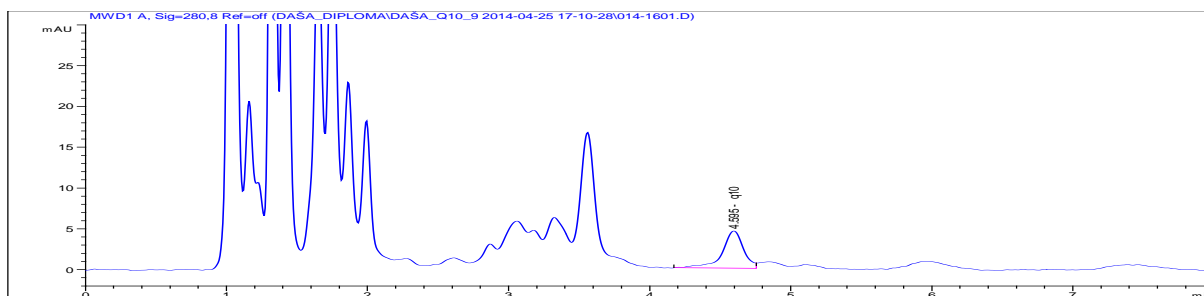
Slika 21: Kromatogram vzorca 15 (CADEAVERA Vital Maska proti gubam z Q₁₀)



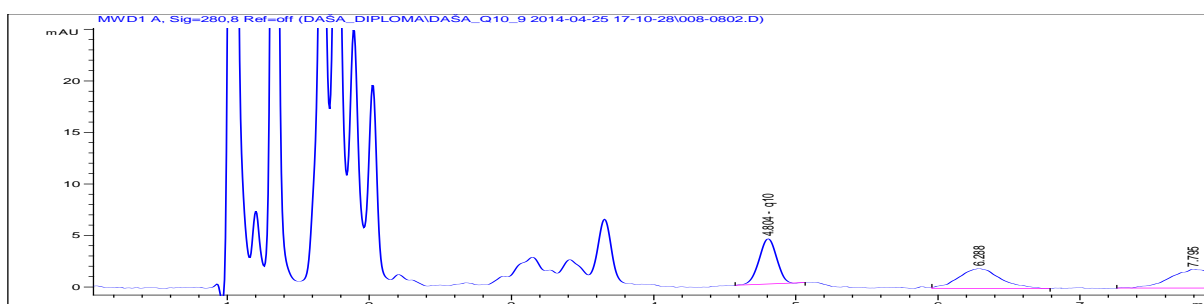
Slika 22: Kromatogram vzorca 16 (CADEAVERA Vital Maska proti gubicam s Q₁₀ za predel okoli oči)



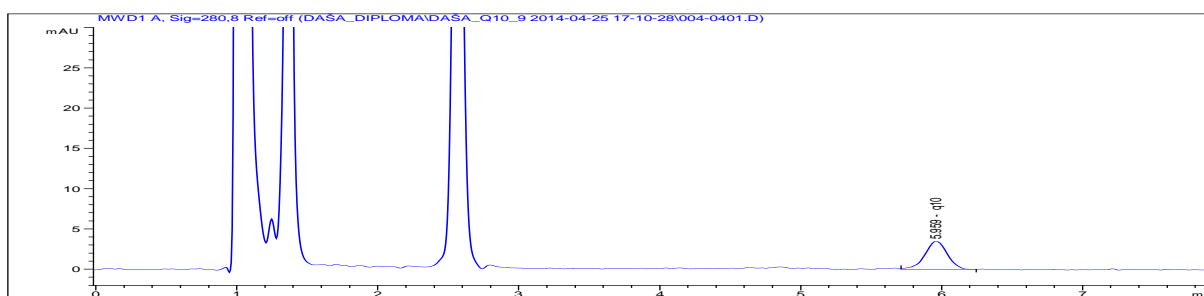
Slika 23: Kromatogram vzorca 17 (SEBAMED Anti-ageing Losjon za čvrsto kožo)



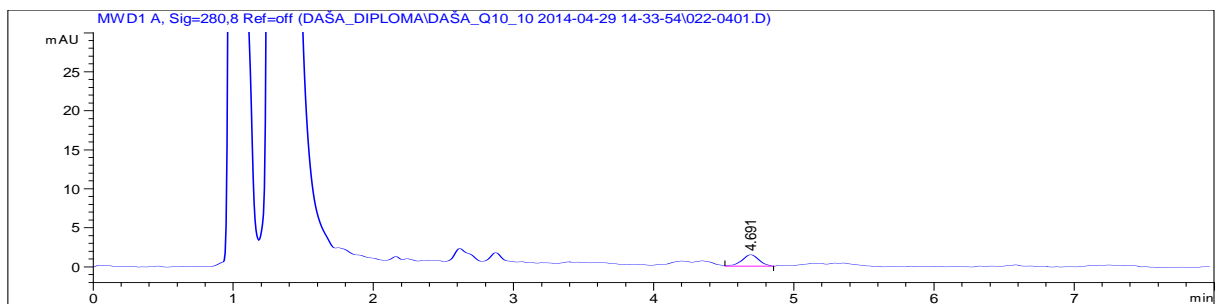
Slika 24: Kromatogram vzorca 18 (SEBAMED Anti-ageing Krema Q₁₀ za obnovitev kože)



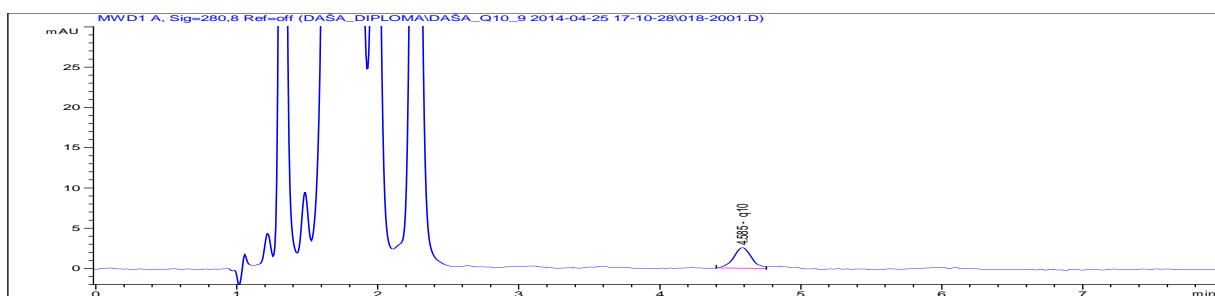
Slika 25: Kromatogram vzorca 19 (SEBAMED Anti-ageing Krema za oči)



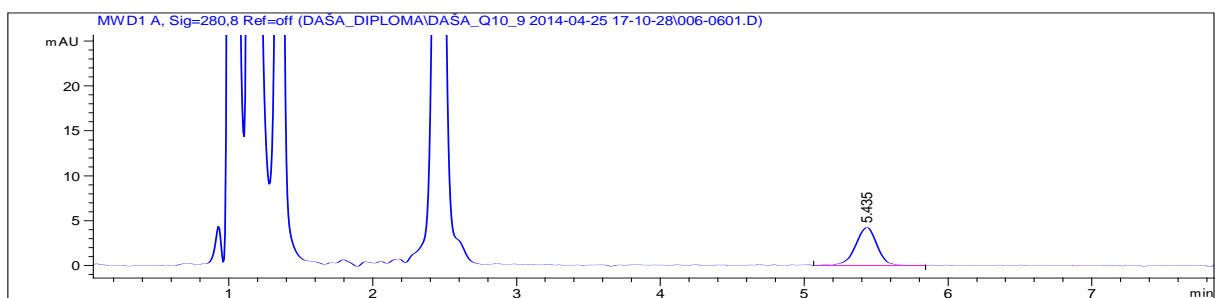
Slika 26: Kromatogram vzorca 20 (DECLARE Age control Krema s Q₁₀)



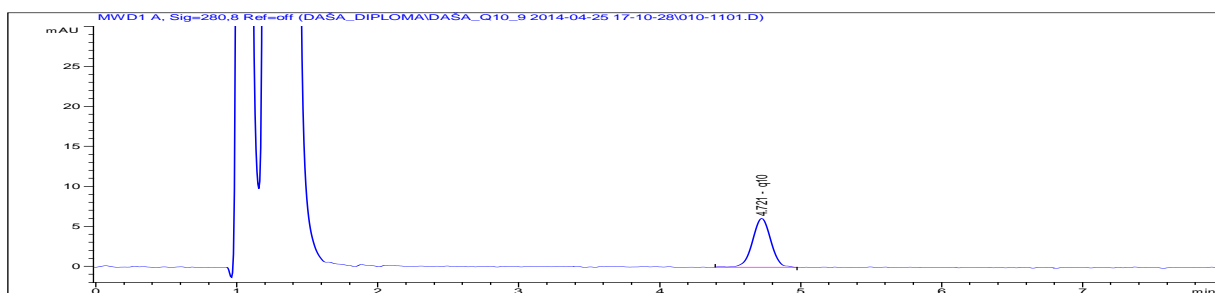
Slika 27: Kromatogram vzorca 21 (EVELINE Anti-Wrinkles Krema proti gubam okoli oči)



Slika 28: Kromatogram vzorec 22 (SCHAEBENS Koncentrat za zrelo kožo s Q₁₀)



Slika 29: Kromatogram vzorca 23 (KAMILL Krema za roke in nohte anti age z Q₁₀)



Slika 30: Kromatogram vzorca 24 (AVEO Krema za roke Anti age Q₁₀)