

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

LIDIJA KLANJŠEK

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM
KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

LIDIJA KLANJŠEK

**UPORABA DPPH METODE ZA UGOTAVLJANJE
ANTIOKSIDATIVNIH LASTNOSTI IZBRANIH NEGOVALNIH
KOZMETIČNIH IZDELKOV**

**THE USE OF DPPH METHOD FOR IDENTIFYING
ANTIOXIDANT PROPERTIES OF SELECTED COSMETIC
SKINCARE PRODUCTS**

UNIVERSITY STUDY PROGRAMME COSMETOLOGY

Ljubljana, 2015

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Janeza Mravljaka, mag. farm.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Janezu Mravljaku, mag. farm. za vso pomoč in strokovne nasvete pri izdelavi diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi staršem in vsem ostalim, ki so mi bili v podporo v času študija.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Janeza Mravljaka, mag. farm.

Lidija Klanjšek

Ljubljana, 2015

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	V
ABSTRACT	VI
SEZNAM OKRAJŠAV	VII
1. UVOD.....	1
1.1 KOŽA.....	1
1.1.1 Staranje kože.....	1
1.1.2 Učinki izpostavljenosti UV sevanju	2
1.2 RADIKALI IN OKSIDATIVNI STRES.....	3
1.3 ANTIOKSIDANTI.....	4
1.3.1 Antioksidanti v kozmetiki	5
1.3.1.1 Ubikinon	5
1.3.1.2 Askorbinska kislina	6
1.3.1.3 α -tokoferol	7
1.3.1.4 β -karoten.....	8
1.3.1.5 Polifenoli	9
1.3.1.6 Butilhidroksitoluen	10
1.4 MERJENJE ANTIOKSIDATIVNE KAPACITETE	10
1.4.1 DPPH.....	10
1.4.2 Opis metode DPPH.....	11
2. NAMEN DELA	13
3. MATERIALI IN METODE	14
3.1 MATERIALI	14
3.1.1 Reagenti in topila.....	14
3.1.2 Laboratorijski material	14
3.1.3 Laboratorijska oprema.....	14
3.1.4 Vzorci	14
3.2 METODE	17
3.2.1 Določanje gostote kozmetičnega izdelka	17
3.2.2 Določanje antioksidativne kapacitete	18
3.2.2.1 Priprava osnovne in delovne raztopine DPPH	18
3.2.2.2 Priprava vzorcev	18
3.2.2.3 Določanje absorbance vzorcev	19

4. REZULTATI	21
4.1 DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE KAPACITETE VZORCEV	21
4.1.1 Vzorec 1.....	21
4.1.2 Vzorec 2.....	22
4.1.3 Vzorec 3.....	23
4.1.4 Vzorec 4.....	24
4.1.5 Vzorec 5.....	25
4.1.6 Vzorec 6.....	26
4.1.7 Vzorec 7.....	27
4.1.8 Vzorec 8.....	28
4.1.9 Vzorec 9.....	29
4.1.10 Vzorec 10.....	30
5. RAZPRAVA.....	31
5.1 PRIMERJAVA ANALIZIRANIH KOZMETIČNIH IZDELKOV	31
5.1.1 Vzorec 1.....	32
5.1.2 Vzorec 2.....	32
5.1.3 Vzorec 3.....	33
5.1.4 Vzorec 4.....	33
5.1.5 Vzorec 5.....	34
5.1.6 Vzorec 6.....	34
5.1.7 Vzorec 7.....	35
5.1.8 Vzorec 8.....	35
5.1.9 Vzorec 9.....	36
5.1.10 Vzorec 10.....	36
6. SKLEP	38
7. LITERATURA	39
8. PRILOGE	43
8.1 PRILOGA 1: Določanje gostote kozmetičnega izdelka	43

Kazalo slik

Slika 1: Strukturna formula oksidirane oblike koencima Q ₁₀ (ubikinon).....	6
Slika 2: Strukturna formula L-askorbinske kisline.....	7
Slika 3: Strukturna formula D- α -tokoferola.	8
Slika 4: Strukturna formula β -karotena.	9
Slika 5: Strukturne formule pomembnejših polifenolov.	9
Slika 6: Strukturna formula butilhidroksitoluena (BHT).	10
Slika 7: Strukturna formula 2,2-difenil-1-pikrilhidrazila (DPPH).	11
Slika 8: Reakcija antioksidanta (AH) z DPPH.	11
Slika 9: Grafična ponazoritev določitve učinkovite koncentracije EC ₅₀	20
Slika 10: Graf določanja koncentracije EC ₅₀ v vzorcu 1.....	21
Slika 11: Graf določanja koncentracije EC ₅₀ v vzorcu 2.....	22
Slika 12: Graf določanja koncentracije EC ₅₀ v vzorcu 3.....	23
Slika 13: Graf določanja koncentracije EC ₅₀ v vzorcu 4.....	24
Slika 14: Graf določanja koncentracije EC ₅₀ v vzorcu 5.....	25
Slika 15: Graf določanja koncentracije EC ₅₀ v vzorcu 6.....	26
Slika 16: Graf določanja koncentracije EC ₅₀ v vzorcu 7.....	27
Slika 17: Graf določanja koncentracije EC ₅₀ v vzorcu 8.....	28
Slika 18: Graf določanja koncentracije EC ₅₀ v vzorcu 9.....	29
Slika 19: Graf določanja koncentracije EC ₅₀ v vzorcu 10.....	30
Slika 20: Primerjava števila navedenih sestavin z antioksidativnimi lastnostmi med analiziranimi kozmetičnimi izdelki.	31
Slika 21: Primerjava vrednosti EC ₅₀ med analiziranimi kozmetičnimi izdelki.....	31

Kazalo preglednic

Preglednica I: Testirani kozmetični izdelki.....	15
Preglednica II: Izmerjene absorbance slepih vzorcev in vzorcev z DPPH ter izračun absorbanc A in % nereduciranega DPPH pri različnih koncentracijah v vzorcu 1.	21
Preglednica III: Izračun koncentracije EC ₅₀ ob upoštevanju SD v vzorcu 1.....	22
Preglednica IV: Izmerjene absorbance slepih vzorcev in vzorcev z DPPH ter izračun absorbanc A in % nereduciranega DPPH pri različnih koncentracijah v vzorcu 2.	22
Preglednica V: Izračun koncentracije EC ₅₀ ob upoštevanju SD v vzorcu 2.....	22

Preglednica VI: Izmerjene absorbance slepih vzorcev in vzorcev z DPPH ter izračun absorbanc A in % nereduciranega DPPH pri različnih koncentracijah v vzorcu 3.	23
Preglednica VII: Izračun koncentracije EC ₅₀ ob upoštevanju SD v vzorcu 3.	23
Preglednica VIII: Izmerjene absorbance slepih vzorcev in vzorcev z DPPH ter izračun absorbanc A in % nereduciranega DPPH pri različnih koncentracijah v vzorcu 4.	24
Preglednica IX: Izmerjene absorbance slepih vzorcev in vzorcev z DPPH ter izračun absorbanc A in % nereduciranega DPPH pri različnih koncentracijah v vzorcu 5.	25
Preglednica X: Izračun koncentracije EC ₅₀ ob upoštevanju SD v vzorcu 5.	25
Preglednica XI: Izmerjene absorbance slepih vzorcev in vzorcev z DPPH ter izračun absorbanc A in % nereduciranega DPPH pri različnih koncentracijah v vzorcu 6.	26
Preglednica XII: Izračun koncentracije EC ₅₀ ob upoštevanju SD v vzorcu 6.	26
Preglednica XIII: Izmerjene absorbance slepih vzorcev in vzorcev z DPPH ter izračun absorbanc A in % nereduciranega DPPH pri različnih koncentracijah v vzorcu 7.	27
Preglednica XIV: Izračun koncentracije EC ₅₀ ob upoštevanju SD v vzorcu 7.	27
Preglednica XV: Izmerjene absorbance slepih vzorcev in vzorcev z DPPH ter izračun absorbanc A in % nereduciranega DPPH pri različnih koncentracijah v vzorcu 8.	28
Preglednica XVI: Izračun koncentracije EC ₅₀ ob upoštevanju SD v vzorcu 8.	28
Preglednica XVII: Izmerjene absorbance slepih vzorcev in vzorcev z DPPH ter izračun absorbanc A in % nereduciranega DPPH pri različnih koncentracijah v vzorcu 9.	29
Preglednica XVIII: Izmerjene absorbance slepih vzorcev in vzorcev z DPPH ter izračun absorbanc A in % nereduciranega DPPH pri različnih koncentracijah v vzorcu 10.	30
Preglednica XIX: Izračun koncentracije EC ₅₀ ob upoštevanju SD v vzorcu 10.	30
Preglednica XX: Izmerjene mase praznih merilnih valjev in merilnih valjev, napolnjenih s kozmetičnim izdelkom, izračun mas kozmetičnih izdelkov v merilnem valju, izmerjeni volumni kozmetičnih izdelkov v merilnem valju ter izračuni gostot kozmetičnih izdelkov.	43

Kazalo enačb

Enačba 1: Izračun gostote kozmetičnega izdelka.	17
Enačba 2: Izračun volumna kozmetičnega izdelka v vzorcu.	18
Enačba 3: Izračun koncentracije vzorca z DPPH.	18
Enačba 4: Izračun absorbance vzorca.	19
Enačba 5: Izračun % nereduciranega DPPH v vzorcu.	19
Enačba 6: Izračun standardne napake.	20

POVZETEK

Dandanes sta stanje in videz kože zelo pomembna – vsakodnevno ju lahko opazujemo in sproti zaznavamo spremembe na površini. Koža je tista, ki predstavlja ogledalo staranja, saj se na njej najprej kažejo posledice zunanjih dejavnikov kot so stres, ultravijolično sevanje in onesnažen zrak.

Antioksidanti so snovi, ki v nizkih koncentracijah bistveno upočasnijo ali zavirajo škodljive oksidativne procese, ki so posledica verižnih reakcij radikalov, katere povzročajo zunanji dejavniki. Preučevanje snovi z učinkovito antioksidativno aktivnostjo, ki so prisotne v kozmetičnih izdelkih za vsakodnevno nego, ima zato pomembno vlogo pri preprečevanju kožnega staranja. Najpogostejše antioksidativne sestavine, ki so dodane kozmetičnim izdelkom, so ubikinon (koencim Q₁₀), askorbinska kislina (vitamin C), tokoferoli (vitamin E), β-karoten, polifenoli rastlinskega izvora in tehnični antioksidanti, kot sta butilhidroksianizol (BHA) in butilhidroksitoluen (BHT).

V okviru diplomske naloge smo z metodo DPPH določali celokupno vrednost snovi, ki delujejo antioksidativno, v desetih različnih negovalnih kozmetičnih izdelkih od različnih proizvajalcev. Vsi izdelki so imeli vsaj eno sestavino z antioksidativnimi lastnostmi. Kot rezultat smo podali učinkovite koncentracije EC₅₀.

Antioksidativne lastnosti smo potrdili pri osmih od desetih izdelkov. Vrednosti EC₅₀ so bile zelo različne, tudi glede na število vsebovanih sestavin z antioksidativnimi lastnostmi. Ugotovili smo, da ni povezave med številom prisotnih antioksidativnih sestavin v izdelku in antioksidativno kapaciteto kozmetičnega izdelka.

Ključne besede: antioksidanti, antioksidativna kapaciteta, DPPH, kozmetični izdelki, UV-VIS spektrofotometrija.

ABSTRACT

The state and appearance of human skin have nowadays considerable importance – it is observed everyday and all changes are noticed almost immediately. It reveals the aging effects due to external factors such as stress, ultraviolet radiation and air pollution.

Antioxidants are materials that, in small concentrations, significantly slow down or inhibit the harmful oxidative processes originated in radical chain reactions triggered by external factors. Examination of the materials with effective antioxidant activity which are present in cosmetic products for daily care therefore plays an important role in the prevention of skin aging. The most frequently used antioxidants ingredients which are present in cosmetic products are ubiquinone (Coenzyme Q₁₀), ascorbic acid (Vitamin C), tocopherols (Vitamin E), β -carotene, polyphenol antioxidants of plant origin and technical antioxidants such as butylhydroxyanisole (BHA) and butylhydroxytoluene (BHT).

The subject of this thesis was to determine the total value of substances acting as antioxidants in ten different cosmetic skincare products from different manufacturers. The DPPH method was used for this purpose. The selected products had at least one ingredient with antioxidant properties. The result of the study is the corresponding effective concentration EC₅₀.

Antioxidant properties were observed in eight out of ten analysed products. Very different EC₅₀ values were obtained, also in terms to the number of contained substances with antioxidant properties. It has been found that there is no relationship between the number of contained antioxidative ingredients and antioxidative capacity of the products.

Key words: antioxidants, antioxidative capacity, DPPH, cosmetic products, UV-VIS spectrophotometry.

SEZNAM OKRAJŠAV

BHA	butilhidroksianizol
BHT	butilhidroksitoluen
CAT	katalaza
DNA	deoksiribonukleinska kislina (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (<i>2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl</i>)
EC ₅₀	polovična maksimalna efektivna koncentracija (<i>Effective Concentration</i>)
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina (<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>)
GPX	glutation peroksidaza
GR	glutation reduktaza
GSH	glutation
INCI	mednarodna nomenklatura za kozmetične sestavine (<i>International Nomenclature of Cosmetic Ingredients</i>)
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid (<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i>)
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>)
RNS	reaktivne dušikove zvrsti (<i>Reactive Nitrogen Species</i>)
ROS	reaktivne kisikove zvrsti (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
SD	standardni odklon (<i>Standard Deviation</i>)
SE	standardna napaka (<i>Standard Error</i>)
SOD	superoksid dismutaza
UV	ultravijolično sevanje
UVA	ultravijolično sevanje tipa A
UVB	ultravijolično sevanje tipa B
UV-VIS	ultravijolično-vidno (<i>Ultraviolet-Visible</i>)

1. UVOD

Staranje kože je eden izmed najvidnejših vidikov staranja. Morda ni tako pomembno z zdravstvenega vidika, vendar ima za mnoge izmed nas videz velik vpliv na našo samozavest in samospoštovanje. Pri večini zato obstaja močna želja po večni lepoti in mladostnem videzu (1).

V zadnjih letih se je kozmetični trg obogatil s številnimi izdelki za nego kože, ki jih spremljajo trditve osredotočene na njihovo antioksidativno delovanje (2). Proizvajalci oglašujejo izdelke, ki ne le očistijo, ščitijo in vlažijo, temveč tudi obnavljajo, izboljšajo in preprečujejo poškodbe kože in znake staranja, kot so gubanje, izguba elastičnosti, hiperpigmentacija in suha koža (1, 2, 3). Tako imenovana »anti-age« kozmetika vsebuje aktivne sestavine za zaščito kože in kožne bariere pred škodljivimi vsakodnevnimi učinki zunanjih dejavnikov, kot so ultravijolično sevanje, stres, kajenje in onesnažen zrak (4). Največji poudarek je na vključitvi antioksidantov in vitaminov, ki s svojimi mehanizmi ščitijo pred škodljivimi učinki reaktivnih zvrsti ter tako preprečujejo fotostarjanje in ohranjajo kožo v prijetnem in zdravem stanju (2).

1.1 KOŽA

Koža je eden največjih organov človeškega telesa, ki ima površino okoli 1,8 m² in predstavlja približno 16% telesne mase. Ima veliko funkcij, od katerih je najbolj pomembna barierna za zaščito telesa pred škodljivimi zunanjimi dejavniki in ohranjanje delovanja notranjih sistemov (5).

Koža je tudi eden izmed najlažje opaženih organov človeškega telesa. Njen videz je primarno določen s površinsko teksturo, barvo in fiziološkimi lastnostmi, kot so elastičnost, znoj, vonj in proizvodnja sebuma (1). Je pomemben indikator našega zdravja in starosti, saj videz razkriva tako informacije o naši biološki starosti, kot tudi o vseživljenjski izpostavljenosti sončnemu sevanju, okoljskim onesnaževalcem ali drugim mehanskim in kemičnim dražilcem, ki vplivajo na tvorbo radikalov in reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) lastnega metabolizma, kar privede do pospešenega staranja kože (1, 6).

1.1.1 Staranje kože

Na splošno je staranje zelo zapleten, naraven proces, ki predstavlja poslabšanje življenjskih funkcij in postopoma pripelje do naravne smrti (1). Postopno kopičenje različnih naključnih molekularnih napak v celicah in tkivih skozi življenje sčasoma vodi do

poslabšanja kožne bariere, izgube strukturne integritete in fiziološke funkcije kože (4). Starana koža je bolj dovzetna za ekstremno suhost, srbenje, kožne okužbe, avtoimunske bolezni, žilne zaplete, pomanjkanje elastičnosti ter povečano tveganje za predrakave spremembe in maligne lezije (4).

Koža se stara po dveh principih – intrinzičnem in ekstrinzičnem:

Intrinzično, notranje ali kronološko staranje je neizogibno, saj predstavlja biološki učinek časa na kožo, ki proizvaja določeno število histoloških, fizioloških in biokemičnih sprememb (4). Intrinzični znaki staranja so genetsko pogojeni; glavni dejavniki, ki vplivajo nanje, so anatomske razlike, spol, rasa in hormonske spremembe (4, 7). Za intrinzično staranje so značilne manjše, drobne, fine gubice in izguba izotropnosti v mikroreliefu. Histološke spremembe se kažejo v epidermalni in dermalni atrofiji, zmanjšani količini kolagena, hiperkeratozi in zmanjšanem številu melanocitov, Langerhansovih celic ter fibroblastov (4).

Ekstrinzično, zunanje ali fotostaranje je izraz, ki opisuje spremembe na koži, katere izhajajo iz ponavljajoče izpostavljenosti različnim zunanjim dejavnikom – UV sevanju, ionizirajočemu sevanju, onesnaženosti okolja, ponavljajočim gibom mišic, kot na primer mežikanje ali mrščenje, ter raznim komponentam življenjskega sloga, kot so slaba prehrana, nikotin, hud telesni in duševni stres, uživanje alkohola itd. (4, 6, 7). V primerjavi z intrinzičnim staranjem so pri ekstrinzičnem histološke, fiziološke, morfološke in biokemične spremembe v različnih plasteh kože mnogo bolj izrazite (4). Rezultat fotostarane kože so različni simptomi, ki vključujejo globoke gube in brazde, lisasto hipo- ali hiperpigmentacijo, pigmentna znamenja, atrofijo kože, suho in hrapavo kožo, usnjat videz, ohlapnost, teleangiektazije, aktinične keratoze (4, 8). Poškodbe, ki nastanejo pod vplivom svetlobe, torej bistveno pospešijo vidno staranje kože, pa tudi močno povečujejo tveganje za kožne novotvorbe, predrakave spremembe, melanom in druge oblike kožnega raka (7, 8). Predeli kože, ki so večinoma izpostavljeni soncu, kot so obraz, vrat, zgornji del prsnega koša, dlani in podlahti, so mesta, kjer se te spremembe najpogosteje pojavljajo (8).

1.1.2 Učinki izpostavljenosti UV sevanju

Sonce je glavni vir UV sevanja in glavni dejavnik za fotostaranje kože (8). Ocenjujejo, da med vsemi zunanjimi dejavniki, prav UV sevanje prispeva do 80% poškodb kože (6). Glede na svojo valovno dolžino UV svetloba prodre do različnih globin in reagira z različnimi plastmi kože (4). Krajše valovne dolžine (UVB sevanje, 280 – 320 nm) se

večinoma absorbirajo v površinski plasti kože (epidermisu), kar prizadene predvsem keratinocite in povzročajo eritem (4, 8). Daljše valovne dolžine (UVA sevanje, 320 – 400 nm) pa prodrejo v globlje plasti kože (dermis) in lahko reagirajo tako s keratinociti kot tudi z dermalnimi fibroblasti (4). Čeprav je potrebnih občutno več fotonov UVA sevanja, da povzročijo enako stopnjo škode v primerjavi z UVB sevanjem, so ti prisotni v veliko večjih količinah v sončni svetlobi, ki doseže površje Zemlje, in bolj penetrirajo v kožo, zato na dolgi rok povzročajo bolj hude poškodbe kože (8).

UV svetloba poleg direktnih in indirektnih poškodb DNA aktivira površinske celične receptorje keratinocitov in fibroblastov, kar privede do poškodb kolagena v ekstracelularnem matriksu in zaustavitve nove sinteze kolagena. Dermalne poškodbe kolagena pa se nepopolno popravljajo, kar prinaša primanjkljaj v strukturi integriteti kože, nastanek sončnih brazgotin in končno privede tudi do klinično vidne atrofije kože in gub (8). Škoda UV sevanja pa ustvarja tudi stanje kroničnega vnetja. Ko se doseže določen prag izpostavljenosti UV sevanju, zapoznela in dolgotrajna vazodilatacija omogoča prehod limfocitov in makrofagov v tkiva, kjer le-ti inducirajo vnetje in eritem (4).

1.2 RADIKALI IN OKSIDATIVNI STRES

Radikal je opredeljen kot atom, molekula ali kompleks, ki je sposoben samostojnega obstoja in vsebuje en neparni elektron v atomski ali molekularni orbitali. Prisotnost neparne elektrona je skupna lastnost vseh radikalov. Številni radikali so nestabilni in zelo reaktivni. Ti so lahko bodisi donorji bodisi akceptorji elektrona drugih molekul, zato se lahko obnašajo kot enoelektronski oksidanti ali kot reducenti. So zelo reaktivne zvrsti, ki lahko v jedru in membranah celic napadejo pomembne biološke makromolekule, kot so nukleinske kisline, proteini, lipidi in ogljikovi hidrati, ter tako vodijo do poškodb celic (9). Ko enkrat reagirajo z molekulo, sprožijo verižne radikalske reakcije kot domine (10).

Najpomembnejši radikali spadajo med reaktivne kisikove zvrsti (ROS) in reaktivne dušikove zvrsti (RNS). Mednje spadajo hidroksilni radikal, superoksidni anion, vodikov peroksid, peroksilni radikal, singletni kisik, hipoklorit in dušikov oksid (9).

Nastanek ROS v koži povzroči oksidativni stres, ki ima za celico škodljive posledice, kot so oksidativne poškodbe jedrne in mitohondrijske DNA, peroksidacija lipidov, aktivacijo matričnih metaloproteaz, poškodbe vezivnega tkiva in zmanjšano proizvodnjo kolagena (4, 6). Redoks spremembe transkripcijskih dejavnikov vodijo do aktivacije ali inaktivacije signalnih poti, ki nato povzročijo spremembe v izražanju genov, vključno s tistimi, ki

vplivajo na celično proliferacijo in diferenciacijo. Spremembe povzročijo nenadzorovano širjenje celic (rak) in pospešeno celično smrt, vse to pa pripelje do poškodb tkiva (6).

Stopnja oksidativnega stresa celice je funkcija delovanja reaktivnih zvrsti na eni strani in delovanje sistema lovljenja radikalov na drugi strani. Koža predstavlja antioksidativni obrambni sistem z znotrajceličnimi mehanizmi, ki vključujejo procese popravljanja in tako zmanjšujejo škodljive učinke oksidativnega stresa. Vendar kljub dovršenemu sistemu za spopadanje z oksidativnim stresom, presežek nastajanja reaktivnih zvrsti lahko zasenči obrambno sposobnost tarčne celice in imunsko odzivno kapaciteto v koži, kar ima za posledico celične funkcionalne okvare, imunotoksičnost, prezgodnje staranje kože in kožnega raka (6).

Najbolj pomembna strategija za zmanjšanje tveganja škode, povzročene z UV sevanjem, je preprečitev izpostavljanja soncu in uporaba zaščite pred soncem. Naslednji korak v preprečevanju oksidativnega stresa in okrepitvi popravljanja DNA pa je uporaba eksogenih antioksidantov (6).

1.3 ANTIOKSIDANTI

Antioksidanti so snovi, ki v nizkih koncentracijah bistveno upočasnijo ali zavirajo oksidacijske reakcije, ki jih povzročajo radikali z verižnimi reakcijami (11, 12). Delujejo tako, da odstranjujejo reaktivne zvrsti ali pa preprečijo njihovo nastajanje in tako zmanjšajo oksidativni stres (13). To naredijo tako, da se sami oksidirajo, kar pomeni, da delujejo kot reducenti (12).

Ko antioksidant reagira z oksidantom, se pretvori v obliko, v kateri nima več funkcije antioksidanta. Da oksidiran produkt ponovno deluje, ga je potrebno »reciklirati« do njegove reducirane oblike. Antioksidativna mreža opisuje sposobnost obnavljanja oksidirane oblike antioksidantov, s čimer se zagotavlja dodatna stopnja zaščite (4). Tako se na primer oksidirani α -tokoferol regenerira na račun reducentov, kot je askorbat. Askorbat pa se regenerira preko glutationa (14). Tako delovanje antioksidantov je sinergistično, zato je optimalni zaščitni učinek mogoče dobiti z uporabo ustrezne kombinacije antioksidantov (4, 14).

Koža vsebuje antioksidativni sistem, ki je odgovoren za vzdrževanje prooksidantov in antioksidantov ter štiti celice pred oksidativnimi poškodbami nastalimi z UV sevanjem (8, 14). Mreža zaščitnih antioksidantov je sestavljena iz endogenih in eksogenih antioksidantov (8):

Endogeni antioksidanti so lahko encimski, med katere sodijo najpomembnejši superoksid dismutaza (SOD), glutation peroksidaza (GPX), glutation reduktaza (GR) in katalaza (CAT), ter neencimski antioksidanti z nizko molekulsko maso, kot so glutation (GSH), lipojska kislina, ubikinol (koencim Q₁₀), sečna kislina in bilirubin (4, 8). Encimski antioksidanti temeljijo predvsem na zaščiti celice, medtem ko so v krvni plazmi pomembnejši neencimski antioksidanti (13).

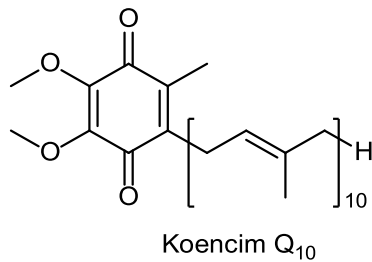
Eksogeni antioksidanti pa so snovi, ki jih človeško telo ne more sintetizirati samo, zato jih je potrebno vnašati s hrano (8). Mednje sodijo askorbinska kislina (vitamin C), tokoferoli in tokotrienoli (vitamin E), β-karoten, polifenoli rastlinskega izvora idr. (6, 8).

Vsi zgoraj naštetih antioksidanti so naravni, obstajajo pa tudi sintezni, kot sta butilhidroksianizol (BHA) in butilhidroksitoluen (BHT). Slednja sta v kozmetičnih izdelkih običajno prisotna kot tehnična antioksidanta za zaščito občutljivih sestavin (npr. lipidov) pred oksidacijo (2).

1.3.1 Antioksidanti v kozmetiki

1.3.1.1 Ubikinon

Ubikinon je endogeni antioksidant, prisoten v celotnem telesu, vključno s kožo (3). Je lipofilen derivat, ki ima stransko verigo sestavljeno iz izoprenoidnih enot. V človeškem telesu v največji meri najdemo derivat z desetimi izoprenoidnimi enotami – **koencim Q₁₀**. Ta se lahko nahaja tako v reducirani obliki kot ubikinol, v večjem deležu pa ga najdemo v oksidirani obliki kot ubikinon (15). V koži se nahaja v relativno visokih koncentracijah, vendar raven vsebnosti s starostjo upada (3, 15). Dermalno nanešen ubikinon dopolni in poveča antioksidativno kapaciteto kože (3). Ubikinon v celicah sodeluje pri dihalni verigi, kjer lahko reagira z radikali in tako prepreči oksidativne poškodbe bioloških molekul (15). Študije dokazujejo, da ubikinon varuje pred celično smrtjo, povzročeno z oksidativnim stresom, in povečuje sintezo osnovnih membranskih komponent v dermalnih in epidermalnih celicah (6). Prav tako zmanjšuje tudi nastajanje ROS, lipidno peroksidacijo, poškodbe DNA, sprožene v človeških keratinocitih, in izražanje matričnih metaloproteaz, kar so posledice izpostavljanja UV sevanju (6, 15). Poleg tega so ugotovili, da pospešuje tudi nastajanje določenih vrst kolagena (15). Pri lokalnem zdravljenju kože na obrazu z 0,3% ubikinonom pa so opazili zmanjšanje vidne globine gub v predelu okrog oči. Ker je ubikinon rumeno-oranžne barve, se v kozmetičnih izdelkih uporabljajo le relativno nizki odmerki (<1%), da bi se izognili skrbi glede barve (3).

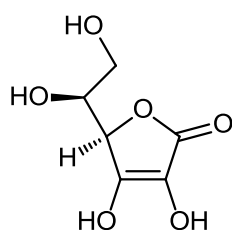


Slika 1: Strukturna formula oksidirane oblike koencima Q₁₀ (ubikinon).

1.3.1.2 Askorbinska kislina

Askorbinska kislina ali vitamin C je eden najpomembnejših vodotopnih antioksidantov, ki je v velikih količinah prisoten v koži. Medtem ko je večina živalskih vrst sposobna proizvajati askorbinsko kislino, ljudje nimajo encima, ki je potreben za njeno sintezo. V koži najdemo vitamin C v vseh plasteh. V stratum corneum tvori gradient z zmanjšanjem koncentracije proti površini kože (4). Askorbinska kislina je lovilec radikalov in reducent (16). Odstrani lahko več vrst reaktivnih spojin, vključno s hidroksilnim, superoksidnim in peroksilnim radikalom ter drugimi reaktivnimi kisikovimi zvrstmi, kot sta ozon in singletni kisik, tako da odda elektron in se pri tem oksidira do stabilnejšega askorbilnega radikala oz. dehidroaskorbata (4, 15, 16). Slednji se lahko regenerira nazaj v reducirano redoks aktivno obliko s pomočjo od NADH in NADPH odvisnih reduktaz (15). Poleg čistega antioksidativnega delovanja je askorbinska kislina tudi bistven kofaktor za različne encime, ki so potrebni za posttranslacijsko procesiranje v biosintezi kolagena in elastina (3, 4, 15). Tako s spodbujanjem teh biosinteznih korakov askorbinska kislina poveča proizvodnjo kolagena in elastina v kožnih fibroblastih, kar privede do zmanjšanja videza gub (3, 4). Poleg tega je vitamin C tudi inhibitor tirozinaze, katera je ključen encim pri sintezi melanina, zato zmanjšuje hiperpigmentacijo kože (15). Askorbinska kislina ima tudi bistven pomen pri oblikovanju prisotnih lipidov v kožni barieri v epidermisu in pri povečanju barierne funkcije kože s spodbujanjem diferenciacije celic epidermisa (4, 15). Poleg tega askorbinska kislina deluje tudi protivnetno ter ščiti kožo pred UV sevanjem in z njim povzročenim oksidativnim stresom (15). V zgoraj opisanih reakcijah je vitamin C antioksidant, saj odstranjuje radikale. Posredno pa se lahko obnaša tudi kot prooksidant, tako da reducira Fe³⁺ do Fe²⁺ in s tem omogoča nastajanje hidroksilnega radikala v Fentonovi reakciji, v kateri sproža oksidativne procese in lipidno peroksidacijo (16). Največji izziv za doseganje kliničnih učinkov askorbinske kisline pa predstavljajo nestabilnost, enostavnost oksidacije v vodnih medijih in slaba difuzija v kožo (14, 15). Ne samo, da oksidacije vodijo do izgube aktivne snovi, pač pa privedejo tudi do rumenjenja

izdelka, kar za kozmetične izdelke ni sprejemljivo z estetskega vidika. Z različnimi strategijami stabilizacije so raziskovalci poskušali obvladati problem z izključitvijo kisika iz formulacije, z uporabo za kisik nepropustne ovojnine, enkapsulacijo, zniževanjem pH pripravka, zmanjševanjem vsebnosti vodne faze ter vključevanjem drugih antioksidantov v izdelek. Kljub vsem tem pristopom stabilnost askorbinske kisline še vedno ostaja izziv, prav tako pa nekateri od naštetih pristopov, kot je nizek pH, lahko privedejo do neželenih učinkov in draženja kože (3). Poleg tehnoloških načinov lahko stabilnost povečamo tudi s sintezo lipofilnih in stabilnih derivatov vitamina C, kot so njegovi estri askorbil palmitat, askorbil stearat, askorbil fosfat (natrijeve ali magnezijeve soli) in askorbil glukozid (14-16). Estri ne ionizirajo in imajo posledično boljšo biološko uporabnost kot askorbinska kislina, vendar so slabše aktivni. Za doseganje učinkov je v telesu potrebna hidroliza (15).



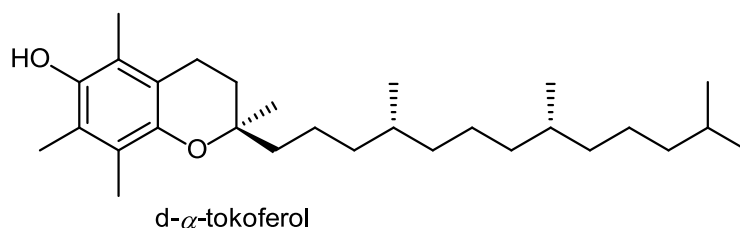
L-askorbinska kislina

Slika 2: Strukturna formula L-askorbinske kisline.

1.3.1.3 α -tokoferol

α -tokoferol je najpomembnejši lipofilni antioksidant v koži. Vitamin E je družina osmih naravno prisotnih izooblik: štirih tokoferolov in štirih tokotrienolov (alfa, beta, gama in delta oblika) (4). Vse oblike so sestavljene iz kromanolnega jedra, ki se razlikujejo po številu in substituciji metilnih skupin, pripetih na obroč, ter nasičenosti izoprenske lipofilne stranske verige (4, 15, 16). Za antioksidativno delovanje je odgovorna hidroksilna skupina na kromanolnem obroču, ki lahko odda vodikov atom reaktivni spojini (15). Čeprav je aktivnost odstranjevanja radikalov različnih izooblik praktično enaka, se njihova biološka aktivnost pri sistemski uporabi močno razlikuje (4). V človeškem telesu je v največji količini prisoten α -tokoferol, ki je tudi najučinkovitejši, sledi mu γ -tokoferol (15, 16). Zaradi svoje lipofilnosti je vitamin E glavni antioksidant v celičnih membranah, ki ima razvejano stransko verigo zasidrano v lipidnem dvosloju (4, 16). Prisoten je v vseh delih kože, tako v dermisu in epidermisu, kot tudi v stratum corneum, kjer se nahaja v največji količini (4, 15). Dostava vitamina E v stratum corneum poteka po dveh različnih mehanizmih. Po eni strani je shranjen v keratinocitih in se skupaj z njimi pomika iz živih

plasti povrhnjice proti površini kože, po drugi strani pa vitamin E izločajo žleze lojnice in roženo plast doseže od zunaj (4). Glavni mehanizem antioksidativnega delovanja tokoferola je neposredno odstranjevanje reaktivnih spojin v procesu lipidne peroksidacije (15). Pred oksidativnim stresom celico ščiti tudi tako, da spodbuja sintezo glutationa in zavira delovanje encimov, ki sintetizirajo reaktivne spojine (4, 15). Deluje tudi protivnetno, po dermalni uporabi pa poveča hidratacijo in sposobnost vezave vode v roženi plasti (15). Dokazali so, da uporaba vitamina E pred izpostavljenostjo UV sevanju bistveno zmanjša akutne učinke na koži, kot so rdečina, oteklina, imunski odziv in fotosenzitivnost. Prav tako zmanjša tudi nastanek gub in pojavnost tumorjev (14, 15). Ker je vitamin E zelo občutljiv na različne oksidante, predvsem na kisik in na svetlobo, ter zato precej nestabilen, se v pripravkih pogosto uporabljajo njegovi estri, kot so acetat, sukcinat in linoleat (4, 14, 16). Stabilnost tokoferola je s tem večja, vendar je za zagotovitev njegove aktivnosti v telesu potrebna hidroliza do proste oblike, saj ester sam ni antioksidant (15, 16). Študije so sicer dokazale fotoprotektivni učinek estrov, vendar je zaščita manjša kot pri α -tokoferolu (14, 15).

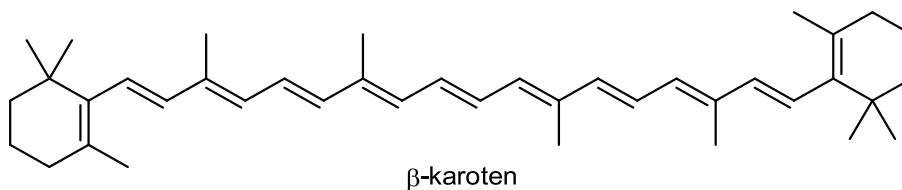


Slika 3: Strukturna formula D- α -tokoferola.

1.3.1.4 β -karoten

β -karoten je lipofilen antioksidant, ki ga v telo vnašamo s hrano. Uvrščamo ga med karotenoide, med katere spadajo tudi astaksantin, lutein in likopen (15). Je močno rdeče-oranžno obarvan pigment, ki se nahaja v sadju in zelenjavi. Nahaja se tudi v vseh zelenih rastlinah in sodeluje pri fotosintezi (17). Je prekurzor vitamina A, kar pomeni, da se v telesu počasi pretvori v vitamin A (retinol) (15, 17). Ker je nestabilen, se v kozmetičnih izdelkih večinoma uporabljajo derivati vitamina A (15). β -karoten je glavna sestavina komercialno dostopnih proizvodov, ki jih sistemsko uporabljamo za zaščito proti soncu. Študije dokazujejo, da ima peroralna aplikacija β -karotena zaščitni učinek proti poškodbam, ki so posledica UV sevanja (6). Sistemska uporaba ima za posledico določen zaščitni učinek proti eritemu, kožo pa ščiti predvsem preko zmanjšanja lipidne peroksidacije, odstranjevanja nekaterih reaktivnih zvrsti ter zaviranja angiogeneze,

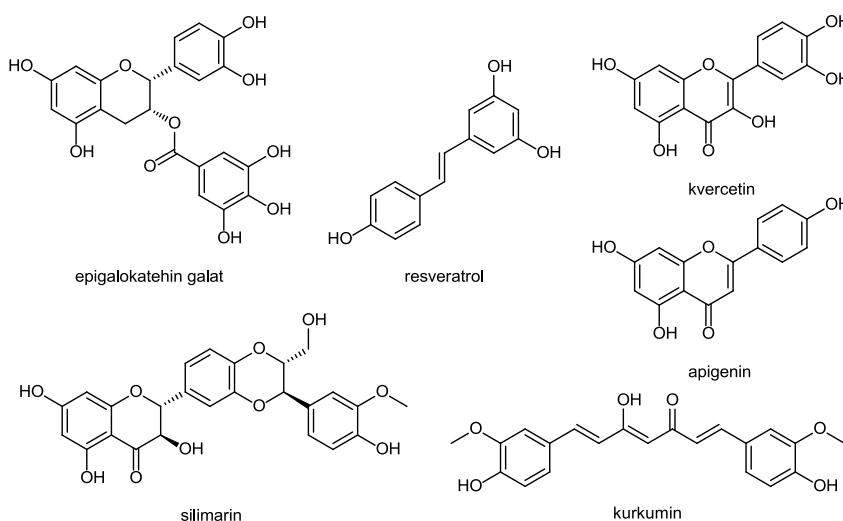
proliferacije in celične apoptoze (6, 15, 17). Podobni učinki so pripisani tudi mešanici karotenoidov, vendar dopolnitev s karotenoidi prispeva samo k bazalni zaščiti kože, ne zadostuje pa, da dobimo popolno zaščito pred hudim UV sevanjem (6).



Slika 4: Strukturna formula β-karotena.

1.3.1.5 Polifenoli

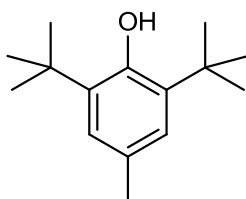
Polifenoli so heterogena skupina molekul, ki vsebujejo v svoji strukturi več fenolnih skupin (15). Uvrščajo se med najpomembnejše rastlinske antioksidante, ki se pojavljajo v lubju, koreninah, listih, cvetovih in plodovih (4, 15). Njihove vloge v rastlinah vključujejo fotoprotekcijo in prispevanje k barvi rastlin (4). Med pomembnejše polifenole sodijo epigalokatehin galat, resveratrol, kvercetin, apigenin, silimarin in kurkumin (15). Polifenoli se v tradicionalni medicini uporabljajo že več stoletij, saj so poznani kot močni antioksidanti. Raziskovali so njihovo sposobnost odstranjevanja radikalov in keliranja kovinskih ionov. K antioksidativnim lastnostim največ prispevajo sposobnosti doniranja elektronov in vodikov. Čeprav polifenoli niso del našega endogenega antioksidativnega sistema, imajo še vedno interakcije z antioksidativno mrežo in posledično širok spekter lastnosti, še posebej koristnih pri preprečevanju poškodb povzročenih z UV sevanjem (4). Kožo ščitijo preko vpliva na rast, diferenciacijo in apoptozo celic, imajo pa tudi številne farmakološke učinke, kot so protivnetne lastnosti in sposobnosti celjenja ran (4, 15).



Slika 5: Strukturne formule pomembnejših polifenolov.

1.3.1.6 Butilhidroksitoluen

Butilhidroksitoluen (BHT), znan tudi kot dibutilhidroksitoluen, je lipofilna organska spojina, kemično derivat fenola, ki ga uporabljajo zaradi njegovih antioksidativnih lastnosti (18). BHT je široko uporabljan sintetični antioksidant za maščobne kisline ter rastlinska olja in ima več prednosti pred drugimi fenolnimi antioksidanti, kot so vonj, stabilnost pri segrevanju in nizka toksičnost. Običajno se uporablja v koncentracijah od 0,01 do 0,1% v kozmetiki, ki vsebuje nenasičene spojine, z dodatkom ustreznih kelatorjev kot sta citronska kislina ali EDTA (19).



BHT

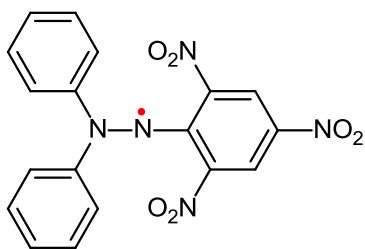
Slika 6: Strukturna formula butilhidroksitoluena (BHT).

1.4 MERJENJE ANTIOKSIDATIVNE KAPACITETE

Odstranjevanje radikalov je glavni mehanizem, s katerim delujejo antioksidanti v kozmetiki (20). Običajna praksa za prepoznavanje koristi antioksidantov, tako v hrani in pijači kot tudi v kozmetiki, je postalo merjenje antioksidativne kapacitete na podlagi odstranjevanja sintetičnih radikalov *in vitro* (20, 21). Prisotnost antioksidantov v izdelkih običajno dokazujejo z različnimi metodami za spremljanje oksidacije lipidov in proteinov ter z različnimi analizami, ki temeljijo na prenosu elektronov ali prenosu vodikovega atoma (21). Zahteva po standardnem testu je zelo pomembna za primerjavo rezultatov različnih laboratorijev in potrjevanje sklepov. Ena izmed najstarejših in najbolj znanih metod ter skupna osnova antioksidativnih testov, ki ji sledijo številni protokoli, je redukcija radikala DPPH (22).

1.4.1 DPPH

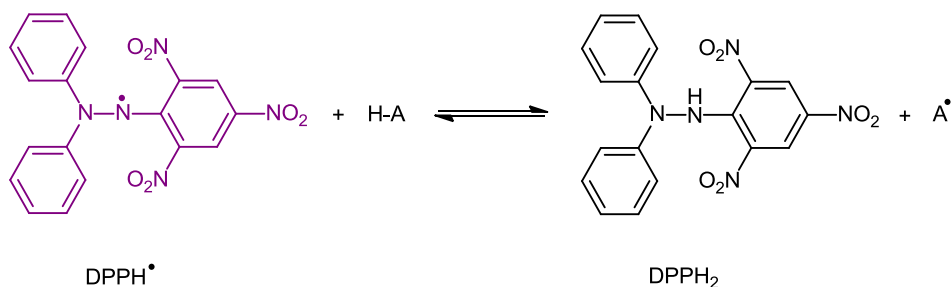
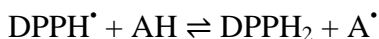
DPPH je okrajšava za organsko kemično spojino 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil. Nahaja se v obliki kristalnega prahu temno vijolične barve (23). Je stabilen radikal, ki ima en neparni valenčni elektron na enem dušikovem atomu »dušikovega mostu« (22). Zaradi delokalizacije prostega elektrona po celi molekuli ne tvori dimerov (24). DPPH se v laboratorijskih raziskavah uporablja za študije nadzorovanja kemijskih reakcij z radikali in potrjevanje radikalske narave reakcij (23).



Slika 7: Strukturna formula 2,2-difenil-1-pikrilhidrazila (DPPH).

1.4.2 Opis metode DPPH

Metoda DPPH omogoča enostaven, hiter in poceni način določanja antioksidativnega potenciala posameznih spojin in njihovih zmesi (25). V veliki meri se uporablja za primerjavo homolognih serij antioksidantov (21). Metoda DPPH je antioksidativni test, ki temelji na prenosu elektrona oz. redukciji DPPH radikala v prisotnosti molekule antioksidanta (26). Odstranjevanje stabilnih radikalov poteka pri sobni temperaturi v polarnem organskem topilu, npr. metanolu. Pri mešanju raztopine DPPH s snovjo, ki lahko odda vodikov atom ali elektron (npr. antioksidant), se tvori reducirana oblika difenilpikrilhidrazin (DPPH₂) in vijolično obarvanje raztopine se pretvori v blede svetlo rumeno obarvanje (24). Ta lastnost omogoči tudi vizualno spremljanje reakcije (23). Enačba prikazuje primer reakcije antioksidanta (AH) z DPPH (25):



Slika 8: Reakcija antioksidanta (AH) z DPPH.

V večini primerov se odstranjevanje radikalov zaključi po 15 do 30 minutah reakcijskega časa (20). Spremembo koncentracije DPPH določamo posredno z merjenjem absorbance s spektrofotometrijo pri valovni dolžini 517 nm (20, 25). Pri večini metod se kot rezultat poda EC₅₀, ki predstavlja koncentracijo antioksidanta, ki je potrebna za odstranitev 50% DPPH radikala v določenem časovnem obdobju (20).

V različnih raziskovalnih skupinah pogosto uporabljajo različne protokole, ki se razlikujejo v koncentraciji DPPH, času inkubacije, reakcijskem topilu in pH-ju reakcijske zmesi. Kot

posledica teh razlik v reakcijskih pogojih se vrednosti EC_{50} tudi najbolj standardnih antioksidantov lahko med seboj zelo razlikujejo. Na absorbanco DPPH vplivata tudi svetloba in kisik. Tako je mogoče med seboj primerjati le rezultate pridobljene s testi po enakih postopkih in z enakimi reakcijskimi pogoji (22).

Z metodo DPPH lahko določamo samo antioksidante, ki delujejo kot reducenti, ne moremo pa določati tudi prisotnosti kelatorjev kovinskih ionov, kot sta npr. EDTA in citronska kislina.

2. NAMEN DELA

Na kozmetičnem trgu je prisotnih veliko izdelkov, ki imajo med svojimi sestavinami navedene tudi antioksidante. Nekateri izmed njih antioksidativne učinke oglašujejo tudi na ovojnini.

Namen diplomske naloge je določiti celokupno vrednost snovi, ki delujejo antioksidativno, oz. antioksidativno kapaciteto desetih različnih negovalnih kozmetičnih izdelkov za vsakodnevno uporabo od različnih proizvajalcev in rezultate primerjati med seboj. Pri izbiri kozmetičnih izdelkov bomo pozorni na to, da bodo vsi imeli navedene sestavine, od katerih pričakujemo antioksidativne lastnosti.

Antioksidativno kapaciteto bomo določali z metodo DPPH, pri kateri pride do redukcije radikala DPPH s prisotnimi antioksidanti. Redukcijo DPPH bomo nato detektirali z UV-VIS spektrofotometrom in iz izmerjenih absorbanč tako določili efektivne koncentracije (EC_{50}) antioksidantov, ki so potrebne, da reducirajo 50% radikalov DPPH. Na koncu bomo dobljene koncentracije EC_{50} kozmetičnih izdelkov primerjali med sabo.

Glede na prisotne antioksidativne spojine v izdelkih od vseh pričakujemo vsaj nekaj antioksidativne aktivnosti. Največjo antioksidativno kapaciteto pričakujemo od kozmetičnih izdelkov, ki imajo med sestavinami navedene čiste antioksidante (vitamin E, vitamin C, koencim Q_{10}). Za kozmetične izdelke, ki imajo med sestavinami navedene tudi določene rastlinske ekstrakte pa samo sklepamo, da bodo imeli zaradi prisotnih polifenolnih in drugih antioksidativnih spojin izražene antioksidativne lastnosti.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Reagenti in topila

- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH); Sigma-Aldrich (Nemčija)
- metanol; Carlo Erba Reagents (Italija)

3.1.2 Laboratorijski material

- merilni valj
- parafilm M; Bemis NA (ZDA)
- laboratorijska spatula
- merilne bučke 25 mL
- avtomatske pipete Transferpette 5 mL in 1000 μ L; Brand GMBH (Nemčija)
- ustrezni nastavki za pipete
- Eppendorf epruvete 2 mL
- plastične kivete (1 cm) za UV-VIS spektrofotometer za enkratno uporabo Semimikro 1,5 mL; Brand GMBH (Nemčija)

3.1.3 Laboratorijska oprema

- analitska tehtnica AE-240S; Mettler Toledo (Švica)
- vodna kopel z možnostjo termostatiranja za rotavapor R-205; Büchi Labortechnik AG (Švica)
- ultrazvočna kadička SONIS 3; Iskra (Slovenija)
- vibracijski stresalnik Vibromix 114 EV; Tehnica (Slovenija)
- laboratorijska centrifuga MiniCentrifuge GMC-060; neoLab (Koreja)
- UV-VIS spektrofotometer Cary 50 Conc; Varian (ZDA)

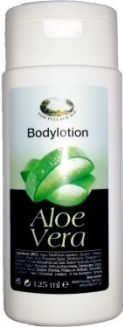

3.1.4 Vzorci

Za vzorce smo si izbrali 10 kozmetičnih izdelkov namenjenih negi obraza, telesa in rok za vsakodnevno uporabo. Vsi izdelki so imeli med sestavinami navedeno vsaj eno sestavino, od katere smo pričakovali antioksidativne lastnosti. V preglednici I so med sestavinami antioksidanti in njihovi estri napisani odebeljeno, rastlinska olja in ekstrakti, ki imajo potencialne antioksidativne lastnosti, pa ležeče.

Preglednica I: Testirani kozmetični izdelki.

Št. vzorca	Ime in sestavine kozmetičnega izdelka	Slika kozmetičnega izdelka v primarni ovojnini
1	<p><u>Krema za roke in nohte Olive, Kozmetika Afrodita</u></p> <p>INCI: Aqua, Isopropyl Myristate, Glyceryl Stearate, Glycerin, Cetyl Alcohol, Cetearth-25, <i>Olea Europaea Oil</i>, Propylheptyl Caprylate, Cera Alba, Cetearyl Isononanoate, Phenoxyethanol, Ethylhexylglycerin, <i>Olea Europaea Leaf Extract</i>, <i>Citrus Medica Limonum Oil</i>, Panthenol, Tocopheryl Acetate, Disodium EDTA, Parfum, Sodium Hydroxide, Propylene Glycol, BHT, Ascorbyl Palmitate, Citric Acid, Citral, D-Limonene, Linalool.</p>	
2	<p><u>Negovalna matirna krema za mastno, nečisto kožo Make it matt!, Kozmetika Afrodita</u></p> <p>INCI: Aqua, Propylheptyl Caprylate, Dicaprylyl Ether, Dicaprylyl Carbonate, Polyglyceryl-3 Methylglucose Distearate, Glycerin, Pentylene Glycol, Glyceryl Stearate, Stearyl Alcohol, Butyrospermum Parkii Butter, Ethoxydiglycol, Propylene Glycol, Butylene Glycol, <i>Hamamelis Virginiana Bark/Leaf/Twig Extract</i>, Lactic Acid, Glucose, Caramel, Sodium Benzoate, Potassium Sorbate, Ethylhexylglycerin, Phenoxyethanol, Bisabolol, <i>Simmondsia Chinensis Seed Oil</i>, <i>Rosmarinus Officinalis Extract</i>, <i>Brassica Campestris Seed Oil</i>, Tocopheryl Acetate, Retynil Palmitate, Caprylic/Capric Triglyceride, Tocopherol, Copaifera Officinalis Oil, <i>Carapa Guaianensis Oil</i>, <i>Euterpe Oleracea Oil</i>, <i>Betula Alba Leaf Extract</i>, Talc, Parfum, Sodium Hydroxide, Carbomer.</p>	
3	<p><u>Krema za obraz za sončenje Anti-age SPF 25, Kozmetika Afrodita</u></p> <p>INCI: Aqua, Cetearyl Ethylhexanoate, Caprylic/Capric Triglyceride, Cetearyl Isononanoate, Octocrylene, Polysilicone-15, Butyl Methoxydibenzoylmethane, Glyceryl Stearate, Potassium Cetyl Phosphate, Phenylbenzimidazole Sulphonic Acid, Cyclopentasiloxane, Dimethiconol, Cetyl Alcohol, Stearyl Alcohol, Glycerin, <i>Cassia Alata Leaf Extract</i>, Phenoxyethanol, Ethylhexylglycerin, Tocopheryl Acetate, Bisabolol, Xanthan Gum, Acrylates/C10-C30 Alkyl Acrylate Crosspolymer, Potassium Hydroxide, Disodium EDTA, Sodium Hydroxide, Parfum, Chlorphenesin, Methylparaben.</p>	
4	<p><u>Tonik za normalno do mešano kožo Clean phase, Kozmetika Afrodita</u></p> <p>INCI: Aqua, Glycerin, PEG-40 Hydrogenated Castor Oil, Pentylene Glycol, <i>Hamamelis Virginiana Water</i>, Sodium Hyaluronate, <i>Citrus Limon Juice</i>, Niacinamide, Panthenol, Allantoin, Sodium Lactate, Sodium PCA, Glycine, Fructose, Urea, Inositol, Parfum, Ethoxydiglycol, Propylene Glycol, Glucose, Butylene Glycol, Sodium Benzoate, Potassium Sorbate, Caramel, Lactic Acid, Citric Acid, Ascorbic Acid, Phenoxyethanol, Ethylhexylglycerin, CI 42051, CI 19140.</p>	

5	<p><u>Negovalna krema za obraz in telo Nourishing skin cream, Himalaya Herbals</u></p> <p>INCI: Aqua, Mineral Oil, Glycerin, Cetyl Alcohol, Cetearyl Ethylhexanoate, Glyceryl Stearate SE, Cetostearyl Alcohol, Triethanolamine, <i>Aloe Barbadensis Leaf Extract</i>, <i>Pterocarpus Marsupium Wood Extract</i>, Glyceryl Stearate (and) PEG-100 Stearate, Carbomer, Phenoxyethanol, Parfum, <i>Withania Somnifera Root Extract</i>, <i>Centella Asiatica Extract</i>, Methylparaben, Propylparaben, BHT, Disodium EDTA, Hexyl Cinnamal, Butylphenyl Methylpropional, Benzyl Salicylate, Linalool, Hydroxycitronellal, Limonene.</p>	
6	<p><u>Krema za roke Q10 plus Anti-age, Nivea</u></p> <p>INCI: Aqua, Glycerin, Cetyl Alcohol, Stearyl Alcohol, Stearic Acid, Isopropyl Palmitate, Octocrylene, Glyceryl Stearate SE, Hydrogenated Coco-Glycerides, Glyceryl Glucoside, Creatine, Ubiquinone, Dimethicone, Butyl Methoxydibenzoylmethane, Phenoxyethanol, Sodium Carbomer, Methylparaben, Trisodium EDTA, 1-Methylhydantoin-2-Imide, Linalool, Citronellol, Butylphenyl Methylpropional, Benzyl Alcohol, Alpha-Isomethyl Ionone, Limonene, Parfum.</p>	
7	<p><u>Losjon za po sončenju After sun lotion, Eucerin</u></p> <p>INCI: Aqua, Alcohol Denat., Glycerin, Caprylic/Capric Triglyceride, Butylene Glycol, Cyclomethicone, Cetearyl Alcohol, Glycine, Tocopheryl Acetate, <i>Hamamelis Virginiana Distillate</i>, PEG-40 Castor Oil, Sodium Carbomer, Hydroxypropyl Methylcellulose, Ethylhexylglycerin, Sodium Cetearyl Sulfate, Sodium Citrate, Citric Acid, Bisabolol.</p>	
8	<p><u>Negovalni losjon za telo Silky Shimmer, Dove</u></p> <p>INCI: Aqua, Glycerin, Caprylic/Capric Triglyceride, Stearic Acid, Sorbitol, Glycol Stearate, Hydrogenated Polydecene, Tocopheryl Acetate, <i>Collagen Amino Acids</i>, <i>Helianthus Annus Hybrid Oil</i>, Isomerized Linoleic Acid, Lactic Acid, Potassium Lactate, Sodium PCA, Urea, Dimethicone, Isohexadecane, Octyldodecanol, Glyceryl Stearate, Stearamide AMP, Triethanolamine, Carbomer, Cetyl Alcohol, Magnesium Aluminum Silicate, Polysorbate 80, Sodium Acrylate/Sodium Acryloyldimethyl Taurate Copolymer, Sorbitan Oleate, Disodium EDTA, Mica, Silica, Parfum, Methylparaben, Phenoxyethanol, Propylparaben, Alpha-Isomethyl Ionone, Benzyl Alcohol, Citronellol, Coumarin, Hydroxyisohexyl 3-Cyclohexene Carboxaldehyde, Limonene, Linalool, CI 77891.</p>	

9	<p><u>Losjon za telo Aloe Vera, Vom Pullach Hof</u></p> <p>INCI: Aqua, Paraffinium Liquidum, Glycerin, Cetearyl Alcohol, Stearic Acid, Propylene Glycol, Dimethicone, Cetareth-20, Cetareth-12, <i>Aloe Barbadensis Leaf Juice</i>, Sodium Hydroxide, Carbomer, Parfum, Sodium Benzoate, Methylisothiazolinone, Dipropylene Glycol, Decylene Glycol, Sodium Chloride, Potassium Sorbate, Citronellol, Coumarin, Hexyl Cinnamal, Linalool, Alpha-Isomethyl Ionone.</p>	
10	<p><u>Losjon za roke in telo Herbal Aloe, Herbalife</u></p> <p>INCI: Aqua, Glycerin, <i>Helianthus Annuus Seed Oil</i>, <i>Aloe Barbadensis Leaf Juice</i>, Stearic Acid, Butyrospermum Parkii Butter, Dimethicone, <i>Chamomilla Recutita Flower Extract</i>, <i>Yucca Filamentosa Extract</i>, <i>Artemisia Tridentata Extract</i>, <i>Simmondsia Chinensis Seed Extract</i>, <i>Silybum Marianum Seed Extract</i>, <i>Salvia Hispanica Seed Extract</i>, <i>Agave Americana Leaf Extract</i>, Chondrus Crispus Powder, Sea Salt, Stearyl Alcohol, Acrylates/10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer, Triethanolamine, Phenoxyethanol, Ethylhexylglycerin, Parfum, Benzyl Alcohol, Butylphenyl Methylpropional, Citronellol, Limonene, Hexyl Cinnamal, Linalool.</p>	

3.2 METODE

3.2.1 Določanje gostote kozmetičnega izdelka

Najprej smo natančno stehali prazen merilni valj, kamor smo nato odmerili približno 3 mL kozmetičnega izdelka in zopet natančno stehali. Iz dobljenih mas smo izračunali maso kozmetičnega izdelka.

Čez napolnjen merilni valj smo dali parafilm in v vodni kopeli segreli kozmetični izdelek na približno 60°C, s čimer smo se znebili morebitno prisotnih mehurčkov, nastalih pri odmerjanju izdelka v merilni valj. Nato smo vsebino ohladili na sobno temperaturo in odčitali približni volumen s pomočjo merilne skale na merilnem valju. Iz odčitane volumna in mase kozmetičnega izdelka smo izračunali približno vrednost gostote kozmetičnega izdelka.

Enačba 1: Izračun gostote kozmetičnega izdelka.

$$\rho = \frac{m}{V}$$

m = masa kozmetičnega izdelka v merilnem valju

V = volumen kozmetičnega izdelka v merilnem valju

3.2.2 Določanje antioksidativne kapacitete

3.2.2.1 Priprava osnovne in delovne raztopine DPPH

Osnovno raztopino DPPH smo pripravili tako, da smo v 25 mL merilno bučko natančno zatehtali 6,90 mg DPPH. V bučko smo do polovice dolili topilo metanol in kristale DPPH raztopili s pomočjo ultrazvoka. Nato smo z metanolom dopolnili do oznake in raztopino še enkrat premešali s previdnim obračanjem bučke. Bučko smo vedno zavili v aluminijasto folijo, da smo raztopino zaščitili pred svetlobo, in jo tekom dneva shranjevali v hladilniku.

Delovno raztopino DPPH smo pripravili tako, da smo osnovno raztopino DPPH redčili z metanolom v razmerju 1:5. V 25 mL merilno bučko smo odmerili 5 mL osnovne raztopine DPPH in do oznake dopolnili s topilom (20 mL).

Raztopino DPPH smo vsak dan pripravili svežo, saj je občutljiva na oksidacije.

3.2.2.2 Priprava vzorcev

Pripravili smo **dve paralelki vzorcev** po 2 mL v 2 mL Eppendorf eprugetah. V prvi paralelki smo pripravili **6 slepih vzorcev** s topilom, v drugi paralelki pa smo pripravili **6 vzorcev z raztopino DPPH**. Vzorce smo pripravili z različnimi koncentracijami; pri obeh paralelkah smo v Eppendorf epruvete natančno zatehtali približne mase kozmetičnega izdelka 10, 20, 30, 60, 90 in 120 mg. Iz izmerjenih mas in znane gostote smo izračunali približne volumne zatehtanih kozmetičnih izdelkov.

Enačba 2: Izračun volumna kozmetičnega izdelka v vzorcu.

$$V = \frac{m}{\rho}$$

m = masa kozmetičnega izdelka v vzorcu

ρ = gostota kozmetičnega izdelka

Vzorce obeh paralelk smo najprej dopolnili s topilom do 1 mL, nato pa smo prvi paralelki vzorcev dodali po 1 mL topila (**slepi vzorci**), drugi paralelki vzorcev pa po 1 mL delovne raztopine DPPH (**vzorci z DPPH**).

Iz podatkov o masi zatehtanega kozmetičnega izdelka v vzorcih z DPPH in njegovem volumnu smo izračunali koncentracije vzorcev z DPPH.

Enačba 3: Izračun koncentracije vzorca z DPPH.

$$c = \frac{m}{V}$$

m = masa kozmetičnega izdelka v vzorcu z DPPH

V = volumen vzorca z DPPH

Takoj, ko smo napolnili zadnji vzorec z delovno raztopino DPPH smo začeli z 90-minutno inkubacijo vzorcev. Najprej smo vse vzorce dobro premešali na vibracijskem stresalniku, jih dali v vodno kopel s temperaturo približno 50°C za 15 minut in jih nato zaščitene pred svetlobo inkubirali pri sobni temperaturi 75 minut. Po koncu inkubacije smo vse vzorce še 3 minute centrifugirali pri hitrosti 6600 obratov na minuto, da so se posedli netopni ostanki vzorcev.

3.2.2.3 Določanje absorbance vzorcev

Po inkubiranju smo izvedli meritve absorbanc z UV-VIS spektrofotometrom pri valovni dolžini 517 nm. Meritve smo izvajali v 1,5 mL plastičnih kivetah za enkratno uporabo. Najprej smo pomerili absorbanco ozadja (topila), ki jo je program odštél od vsake meritve. Nato smo pomerili absorbanco delovni raztopini DPPH, ki smo jo predhodno redčili v razmerju 1:2 s topilom, ker so bili tudi vzorci redčeni s topilom v razmerju 1:2. Na koncu smo pomerili še absorbance vzorcev obeh paralelk.

Iz izmerjenih absorbanc slepih vzorcev in vzorcev z DPPH smo izračunali absorbance vzorcev, ki izvirajo iz DPPH.

Enačba 4: Izračun absorbance vzorca.

$$A = A_{vzorec} - A_{slepa}$$

A_{vzorec} = absorbanca vzorca z DPPH

A_{slepa} = absorbanca slepega vzorca

Iz podatkov o absorbanci delovne raztopine DPPH, ki predstavlja 100% DPPH, in o absorbanci vzorcev pri posameznih koncentracijah smo izračunali % DPPH, ki je ostal v vzorcu.

Enačba 5: Izračun % nereduciranega DPPH v vzorcu.

$$A_{DPPH} \dots 100\% \text{ DPPH}$$

$$A \dots x$$

$$x = \frac{A * 100\%}{A_{DPPH}}$$

x = % nereduciranega DPPH v vzorcu

A_{DPPH} = absorbanca delovne raztopine DPPH

A = absorbanca vzorca

Na koncu smo narisali graf: % DPPH, ki je ostal v vzorcu, v odvisnosti od koncentracije (c), iz katerega smo na podlagi podatkov o regresijski premici določili efektivno

koncentracijo antioksidantov EC_{50} , ki je potrebna, da se absorbanca oz. % DPPH zmanjša na 50%, ter standardni odklon SD . Za izračun le-tega smo morali poznati tudi standardno napako SE , ki smo jo izračunali s pomočjo uporabe statistične funkcije $STEYX$ v programu Excel (Microsoft Office 2010).

Enačba 6: Izračun standardne napake.

$$SE = \sqrt{\frac{1}{(n-2)} \left(\sum (y - \bar{y})^2 - \frac{(\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y}))^2}{\sum (x - \bar{x})^2} \right)}$$

n = velikost vzorca

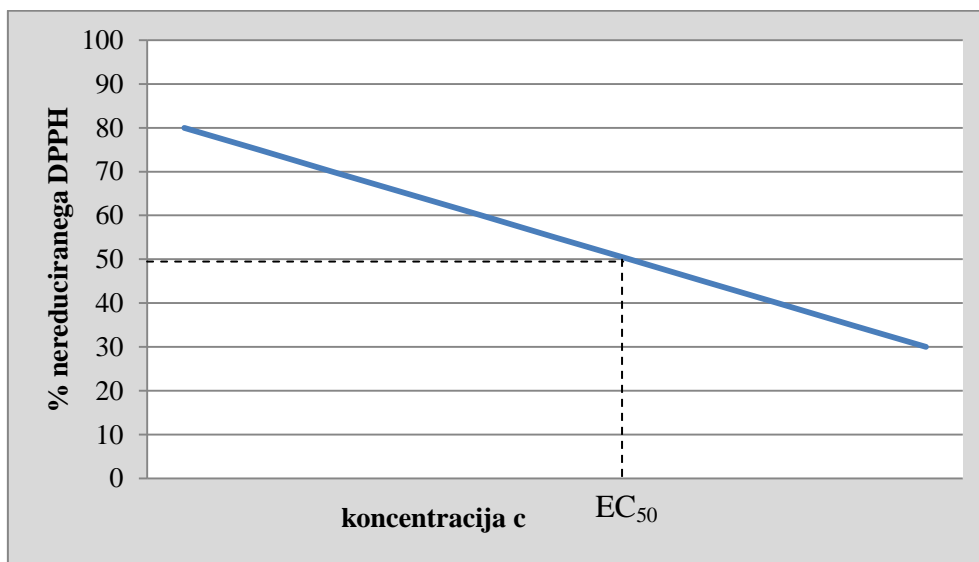
y = matrika ali obseg odvisnih podatkovnih točk

\bar{y} = vzorčna srednja vrednost y

x = matrika ali obseg neodvisnih podatkovnih točk

\bar{x} = vzorčna srednja vrednost x

Kot končne rezultate smo podali koncentracije $EC_{50} \pm SD$ in jih primerjali med seboj. Nižja kot je vrednost EC_{50} , višjo antioksidativno kapaciteto ima kozmetični izdelek, saj je za redukcijo 50% DPPH radikalov potrebna nižja koncentracija kozmetičnega izdelka z antioksidanti. Na sliki 9 je prikazana grafična ponazoritev določitve učinkovite koncentracije EC_{50} .



Slika 9: Grafična ponazoritev določitve učinkovite koncentracije EC_{50} .

4. REZULTATI

4.1 DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE KAPACITETE VZORCEV

Antioksidativno kapaciteto smo določili 10 različnim kozmetičnim izdelkom različnih proizvajalcev. Vsi izdelki so imeli na ovojniini navedeno vsaj eno sestavino z antioksidativnimi lastnostmi. Antioksidativno kapaciteto smo podali s **koncentracijo EC₅₀** z **upoštevanjem SD**, katera reducira 50% radikalov DPPH v reakcijski zmesi.

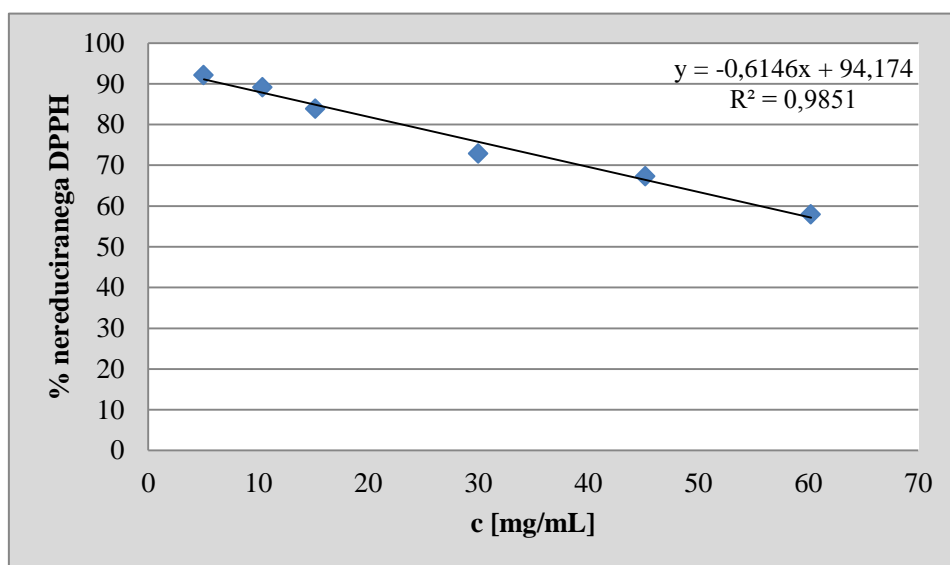
4.1.1 Vzorec 1

Preglednica II prikazuje izmerjene absorbance in izračun absorbanc vzorcev ter % nereduciranega DPPH pri različnih koncentracijah, preglednica III pa izračun koncentracije EC₅₀ ob upoštevanju SD. Slika 10 prikazuje graf določanja koncentracije EC₅₀.

Preglednica II: Izmerjene absorbance slepih vzorcev in vzorcev z DPPH ter izračun absorbanc A in % nereduciranega DPPH pri različnih koncentracijah v vzorcu 1.

c [mg/mL]	A _{slepa}	A _{vzorec}	A	% nereduciranega DPPH
5,050	0,0072	0,8374	0,8302	92,07
10,40	0,0045	0,8077	0,8032	89,08
15,20	0,0132	0,7692	0,7560	83,84
30,00	0,0770	0,7338	0,6568	72,84
45,20	0,1539	0,7600	0,6061	67,22
60,25	0,1667	0,6889	0,5222	57,91

A _{DPPH}
0,9017



Slika 10: Graf določanja koncentracije EC₅₀ v vzorcu 1.

Preglednica III: Izračun koncentracije EC₅₀ ob upoštevanju SD v vzorcu 1.

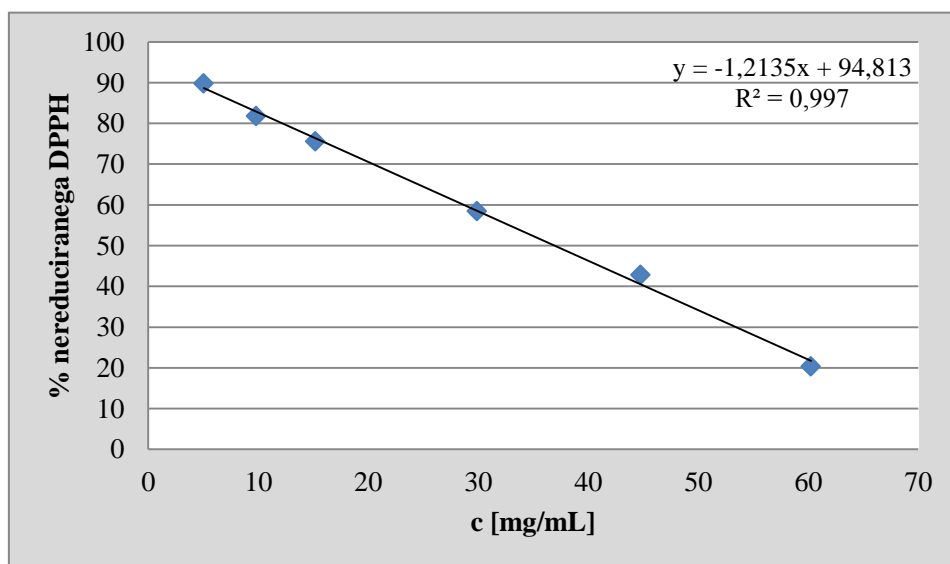
EC ₅₀ [mg/mL]	STEYX	EC ₅₀ -SD [mg/mL]	SD	EC ₅₀ ± SD [mg/mL]
71,87	1,825	68,90	2,969	71,87 ± 2,969

4.1.2 Vzorec 2

Preglednica IV prikazuje izmerjene absorbance in izračun absorbanc vzorcev ter % nereduciranega DPPH pri različnih koncentracijah, preglednica V pa izračun koncentracije EC₅₀ ob upoštevanju SD. Slika 11 prikazuje graf določanja koncentracije EC₅₀.

Preglednica IV: Izmerjene absorbance slepih vzorcev in vzorcev z DPPH ter izračun absorbanc A in % nereduciranega DPPH pri različnih koncentracijah v vzorcu 2.

c [mg/mL]	A _{slepa}	A _{vzorec}	A	% nereduciranega DPPH	A _{DPPH}
5,050	0,0202	0,7274	0,7072	89,81	0,7874
9,800	0,0401	0,6839	0,6438	81,76	
15,20	0,0448	0,6398	0,5950	75,57	
29,90	0,0628	0,5229	0,4601	58,43	
44,75	0,3663	0,6999	0,3369	42,79	
60,25	0,3574	0,5176	0,1602	20,35	



Slika 11: Graf določanja koncentracije EC₅₀ v vzorcu 2.

Preglednica V: Izračun koncentracije EC₅₀ ob upoštevanju SD v vzorcu 2.

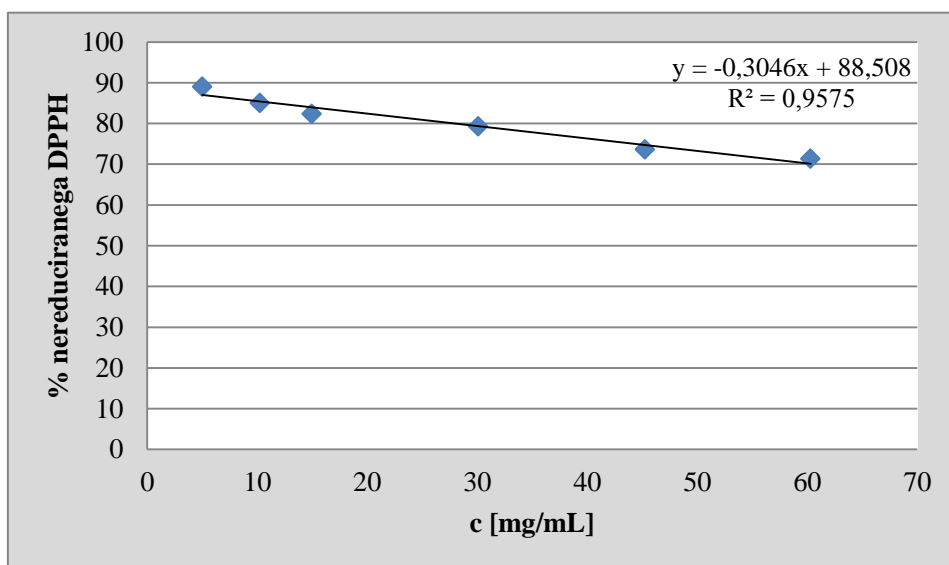
EC ₅₀ [mg/mL]	STEYX	EC ₅₀ -SD [mg/mL]	SD	EC ₅₀ ± SD [mg/mL]
36,93	1,603	35,61	1,321	36,93 ± 1,321

4.1.3 Vzorec 3

Preglednica VI prikazuje izmerjene absorbance in izračun absorbanc vzorcev ter % nereduciranega DPPH pri različnih koncentracijah, preglednica VII pa izračun koncentracije EC₅₀ ob upoštevanju SD. Slika 12 prikazuje graf določanja koncentracije EC₅₀.

Preglednica VI: Izmerjene absorbance slepih vzorcev in vzorcev z DPPH ter izračun absorbanc A in % nereduciranega DPPH pri različnih koncentracijah v vzorcu 3.

c [mg/mL]	A _{slepa}	A _{vzorec}	A	% nereduciranega DPPH	A _{DPPH}
5,000	0,0005	0,7844	0,7839	89,02	0,8806
10,25	0,0020	0,7509	0,7489	85,04	
14,95	0,0024	0,7271	0,7247	82,30	
30,10	0,0030	0,7007	0,6977	79,23	
45,25	0,0023	0,6504	0,6481	73,60	
60,30	0,0032	0,6314	0,6282	71,34	



Slika 12: Graf določanja koncentracije EC₅₀ v vzorcu 3.

Preglednica VII: Izračun koncentracije EC₅₀ ob upoštevanju SD v vzorcu 3.

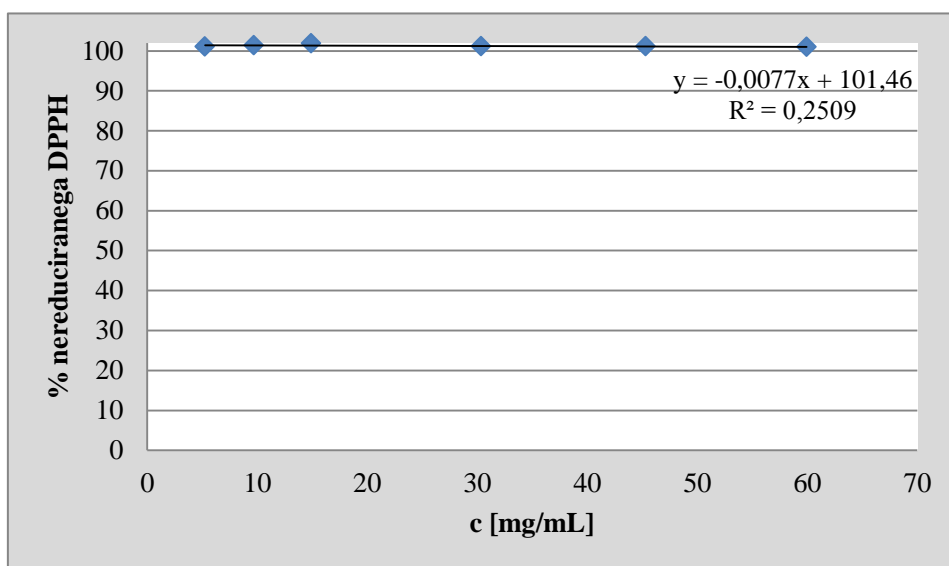
EC ₅₀ [mg/mL]	STEYX	EC ₅₀ -SD [mg/mL]	SD	EC ₅₀ ± SD [mg/mL]
126,4	1,558	121,3	5,116	126,4 ± 5,116

4.1.4 Vzorec 4

Preglednica VIII prikazuje izmerjene absorbance in izračun absorbanc vzorcev ter % nereduciranega DPPH pri različnih koncentracijah. Slika 13 pa prikazuje graf določanja koncentracije EC₅₀.

Preglednica VIII: Izmerjene absorbance slepih vzorcev in vzorcev z DPPH ter izračun absorbanc A in % nereduciranega DPPH pri različnih koncentracijah v vzorcu 4.

c [mg/mL]	A _{slepa}	A _{vzorec}	A	% nereduciranega DPPH	A _{DPPH}
5,250	0,0001	0,7726	0,7725	101,1	0,7645
9,700	0,0005	0,7755	0,7750	101,4	
14,90	0,0000	0,7788	0,7788	101,9	
30,35	0,0008	0,7741	0,7733	101,2	
45,30	0,0008	0,7737	0,7729	101,1	
59,95	0,0100	0,7818	0,7718	101,0	



Slika 13: Graf določanja koncentracije EC₅₀ v vzorcu 4.

Vzorec 4 ne izkazuje antioksidativnih lastnosti pri najvišji izmerjeni koncentraciji.

4.1.5 Vzorec 5

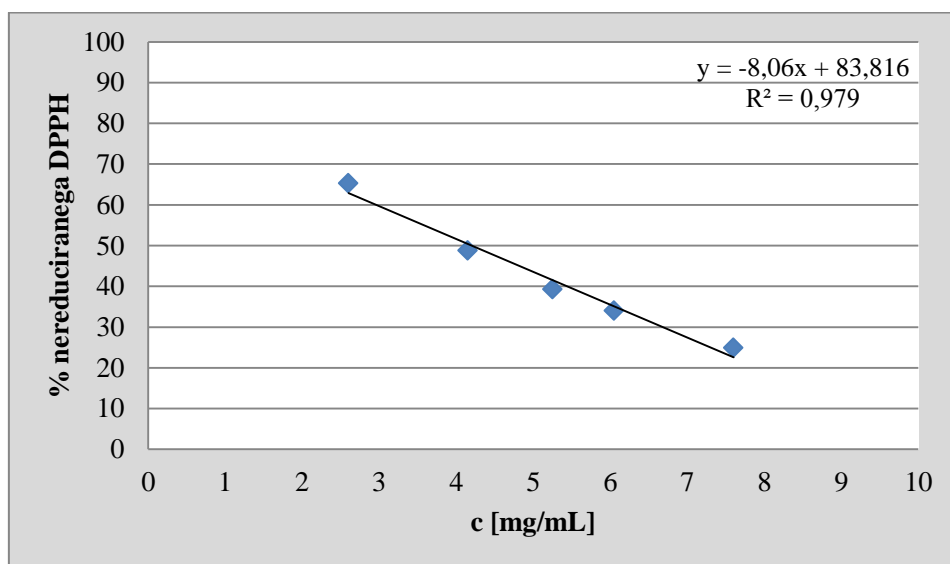
Pri vzorcu 5 smo meritev najprej izvedli pri koncentracijah od 5 do 60 mg/mL, vendar so bile zaradi visoke antioksidativne kapacitete izdelka previsoke, zato smo meritev ponovili pri nižjih koncentracijah.

Preglednica IX prikazuje izmerjene absorbance in izračun absorbanc vzorcev ter % nereduciranega DPPH pri različnih koncentracijah, preglednica X pa izračun koncentracije EC₅₀ ob upoštevanju SD. Slika 14 prikazuje graf določanja koncentracije EC₅₀.

Preglednica IX: Izmerjene absorbance slepih vzorcev in vzorcev z DPPH ter izračun absorbanc A in % nereduciranega DPPH pri različnih koncentracijah v vzorcu 5.

c [mg/mL]	A _{slepa}	A _{vzorec}	A	% nereduciranega DPPH	A _{DPPH}
2,600	-0,0019	0,6311	0,6330	65,31	0,9692
4,150	-0,0008	0,4719	0,4727	48,77	
5,250	-0,0005	0,3804	0,3809	39,30	
6,050	0,0007	0,3306	0,3299	34,04	
7,600	0,0061	0,2476	0,2415	24,92	
10,20	0,0473	0,2042	0,1569	16,19	

Zaradi manjšega odstopanja smo zadnjo meritev zanemarili, da smo lahko iz podatkov regresijske premice na grafu bolj točno določili koncentracijo EC₅₀.



Slika 14: Graf določanja koncentracije EC₅₀ v vzorcu 5.

Preglednica X: Izračun koncentracije EC₅₀ ob upoštevanju SD v vzorcu 5.

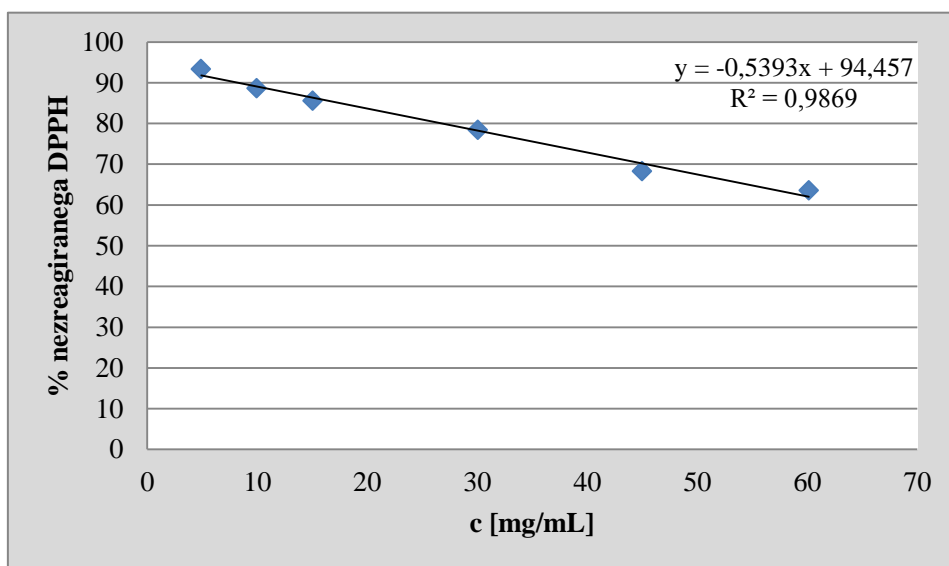
EC ₅₀ [mg/mL]	STEYX	EC ₅₀ -SD [mg/mL]	SD	EC ₅₀ ± SD [mg/mL]
4,196	2,582	3,875	0,3202	4,196 ± 0,3202

4.1.6 Vzorec 6

Preglednica XI prikazuje izmerjene absorbance in izračun absorbanc vzorcev ter % nereduciranega DPPH pri različnih koncentracijah, preglednica XII pa izračun koncentracije EC₅₀ ob upoštevanju SD. Slika 15 prikazuje graf določanja koncentracije EC₅₀.

Preglednica XI: Izmerjene absorbance slepih vzorcev in vzorcev z DPPH ter izračun absorbanc A in % nereduciranega DPPH pri različnih koncentracijah v vzorcu 6.

c [mg/mL]	A _{slepa}	A _{vzorec}	A	% nereduciranega DPPH	A _{DPPH}
4,900	0,0322	0,9368	0,9046	93,33	0,9692
9,950	0,0555	0,9143	0,8588	88,61	
15,05	0,0745	0,9037	0,8292	85,56	
30,05	0,1637	0,9236	0,7599	78,40	
45,00	0,2285	0,8903	0,6618	68,28	
60,15	0,2739	0,8895	0,6156	63,52	



Slika 15: Graf določanja koncentracije EC₅₀ v vzorcu 6.

Preglednica XII: Izračun koncentracije EC₅₀ ob upoštevanju SD v vzorcu 6.

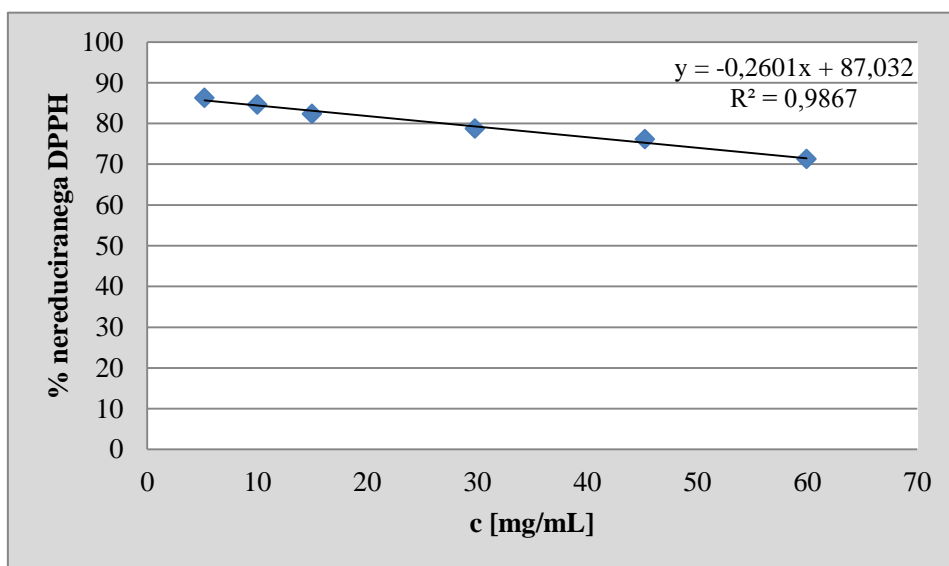
EC ₅₀ [mg/mL]	STEYX	EC ₅₀ -SD [mg/mL]	SD	EC ₅₀ ± SD [mg/mL]
82,43	1,505	79,64	2,790	82,43 ± 2,790

4.1.7 Vzorec 7

Preglednica XIII prikazuje izmerjene absorbance in izračun absorbanc vzorcev ter % nereduciranega DPPH pri različnih koncentracijah, preglednica XIV pa izračun koncentracije EC₅₀ ob upoštevanju SD. Slika 16 prikazuje graf določanja koncentracije EC₅₀.

Preglednica XIII: Izmerjene absorbance slepih vzorcev in vzorcev z DPPH ter izračun absorbanc A in % nereduciranega DPPH pri različnih koncentracijah v vzorcu 7.

c [mg/mL]	A _{slepa}	A _{vzorec}	A	% nereduciranega DPPH	A _{DPPH}
5,200	0,0230	0,7994	0,7764	86,29	0,8998
10,00	0,0407	0,8019	0,7612	84,60	
15,00	0,0573	0,7979	0,7406	82,31	
29,80	0,1056	0,8138	0,7082	78,71	
45,25	0,1596	0,8443	0,6847	76,09	
59,95	0,2399	0,8807	0,6408	71,22	



Slika 16: Graf določanja koncentracije EC₅₀ v vzorcu 7.

Preglednica XIV: Izračun koncentracije EC₅₀ ob upoštevanju SD v vzorcu 7.

EC ₅₀ [mg/mL]	STEYX	EC ₅₀ -SD [mg/mL]	SD	EC ₅₀ ± SD [mg/mL]
142,4	0,7303	139,6	2,808	142,4 ± 2,808

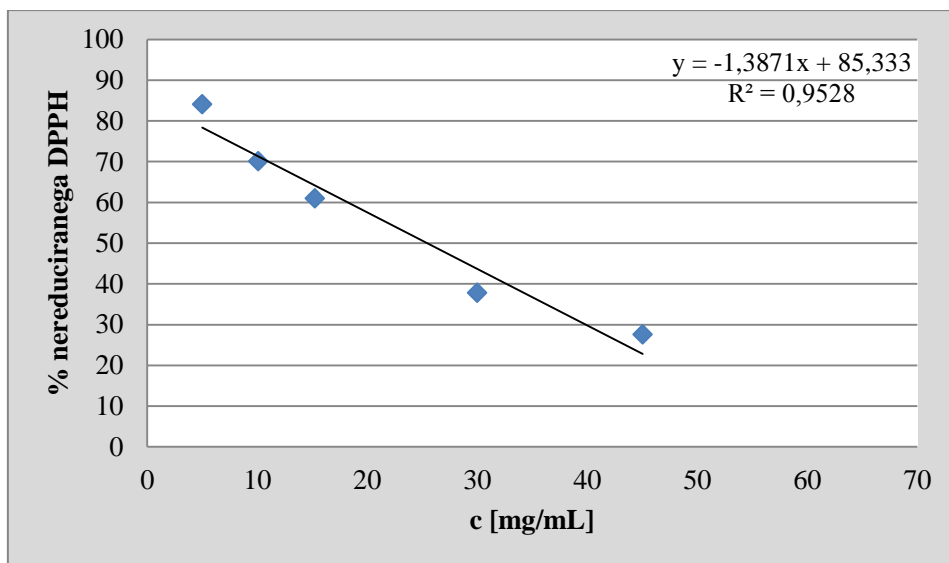
4.1.8 Vzorec 8

Preglednica XV prikazuje izmerjene absorbance in izračun absorbanc vzorcev ter % nereduciranega DPPH pri različnih koncentracijah, preglednica XVI pa izračun koncentracije EC₅₀ ob upoštevanju SD. Slika 17 prikazuje graf določanja koncentracije EC₅₀.

Preglednica XV: Izmerjene absorbance slepih vzorcev in vzorcev z DPPH ter izračun absorbanc A in % nereduciranega DPPH pri različnih koncentracijah v vzorcu 8.

c [mg/mL]	A _{slepa}	A _{vzorec}	A	% nereduciranega DPPH	A _{DPPH}
5,000	0,0078	0,7644	0,7566	84,09	0,8998
10,10	0,0191	0,6497	0,6306	70,08	
15,25	0,0486	0,5975	0,5489	61,00	
30,00	0,1117	0,4515	0,3398	37,76	
45,05	0,1299	0,3777	0,2478	27,54	
60,25	0,1403	0,2890	0,1487	16,53	

Zaradi manjšega odstopanja smo zadnje meritev zanemarili, da smo lahko iz podatkov regresijske premice na grafu bolj točno določili koncentracijo EC₅₀.



Slika 17: Graf določanja koncentracije EC₅₀ v vzorcu 8.

Preglednica XVI: Izračun koncentracije EC₅₀ ob upoštevanju SD v vzorcu 8.

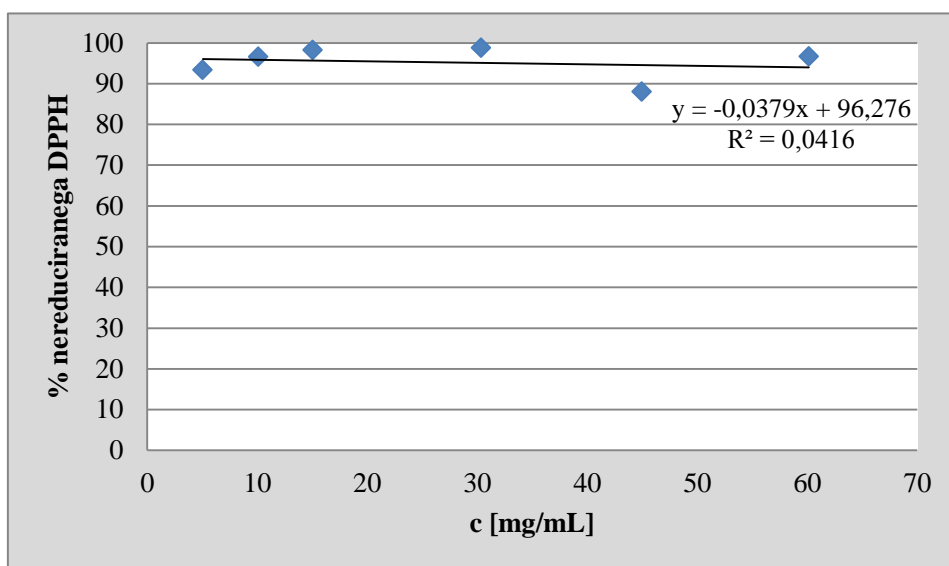
EC ₅₀ [mg/mL]	STEYX	EC ₅₀ -SD [mg/mL]	SD	EC ₅₀ ± SD [mg/mL]
25,47	5,820	21,28	4,196	25,47 ± 4,196

4.1.9 Vzorec 9

Preglednica XVII prikazuje izmerjene absorbance in izračun absorbanc vzorcev ter % nereduciranega DPPH pri različnih koncentracijah. Slika 18 pa prikazuje graf določanja koncentracije EC₅₀.

Preglednica XVII: Izmerjene absorbance slepih vzorcev in vzorcev z DPPH ter izračun absorbanc A in % nereduciranega DPPH pri različnih koncentracijah v vzorcu 9.

c [mg/mL]	A _{slepa}	A _{vzorec}	A	% nereduciranega DPPH	A _{DPPH}
5,050	0,0540	0,7748	0,7208	93,33	0,7723
10,10	0,0901	0,8359	0,7458	96,57	
15,05	0,0974	0,8556	0,7582	98,17	
30,35	0,1176	0,8800	0,7624	98,72	
44,95	0,2699	0,9492	0,6793	87,96	
60,15	0,2551	1,0013	0,7462	96,62	



Slika 18: Graf določanja koncentracije EC₅₀ v vzorcu 9.

Vzorec 9 ne izkazuje antioksidativnih lastnosti pri najvišji izmerjeni koncentraciji.

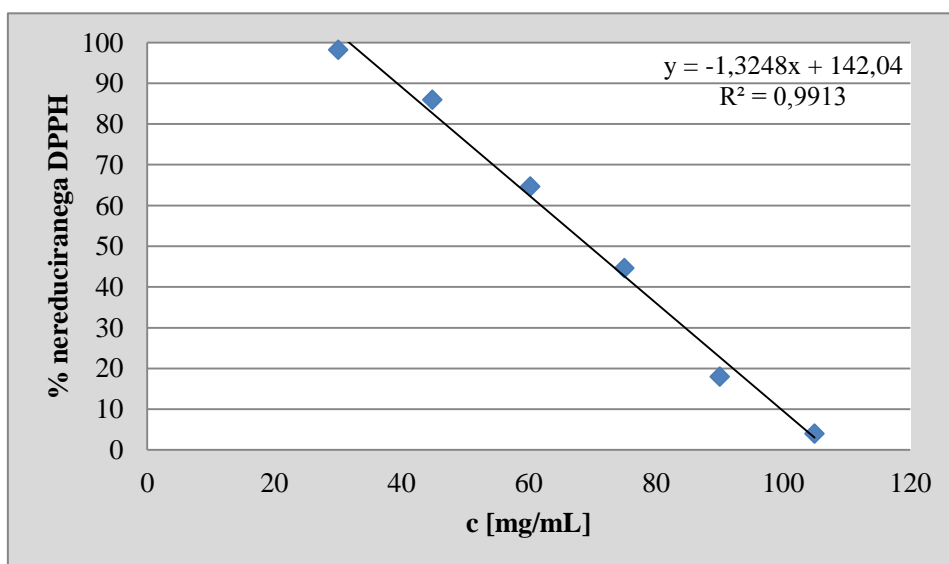
4.1.10 Vzorec 10

Pri vzorcu 10 smo meritev najprej izvedli pri koncentracijah od 5 do 60 mg/mL, vendar se je pri rezultatih pokazalo, da se DPPH začne reducirati šele pri višjih koncentracijah, zato smo meritev ponovili pri koncentracijah od 30 do 105 mg/mL.

Preglednica XVIII prikazuje izmerjene absorbance in izračun absorbanc vzorcev ter % nereduciranega DPPH pri različnih koncentracijah, preglednica XIX pa izračun koncentracije EC₅₀ ob upoštevanju SD. Slika 19 prikazuje graf določanja koncentracije EC₅₀.

Preglednica XVIII: Izmerjene absorbance slepih vzorcev in vzorcev z DPPH ter izračun absorbanc A in % nereduciranega DPPH pri različnih koncentracijah v vzorcu 10.

c [mg/mL]	A _{slepa}	A _{vzorec}	A	% nereduciranega DPPH	A _{DPPH}
30,05	0,6547	1,4169	0,7622	98,23	0,7759
44,85	0,5887	1,2558	0,6671	85,98	
60,25	0,5296	1,0313	0,5017	64,66	
75,05	0,4355	0,7818	0,3463	44,63	
90,05	0,4645	0,6040	0,1395	17,98	
104,95	0,4813	0,5121	0,0308	3,970	



Slika 19: Graf določanja koncentracije EC₅₀ v vzorcu 10.

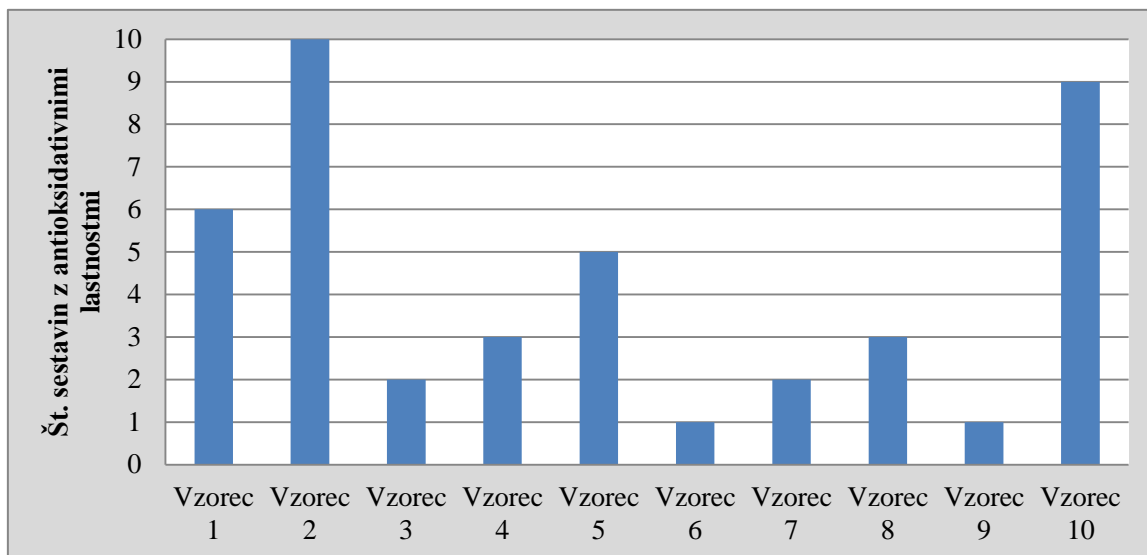
Preglednica XIX: Izračun koncentracije EC₅₀ ob upoštevanju SD v vzorcu 10.

EC ₅₀ [mg/mL]	STEYX	EC ₅₀ -SD [mg/mL]	SD	EC ₅₀ ± SD [mg/mL]
69,47	3,902	66,53	2,945	69,47 ± 2,945

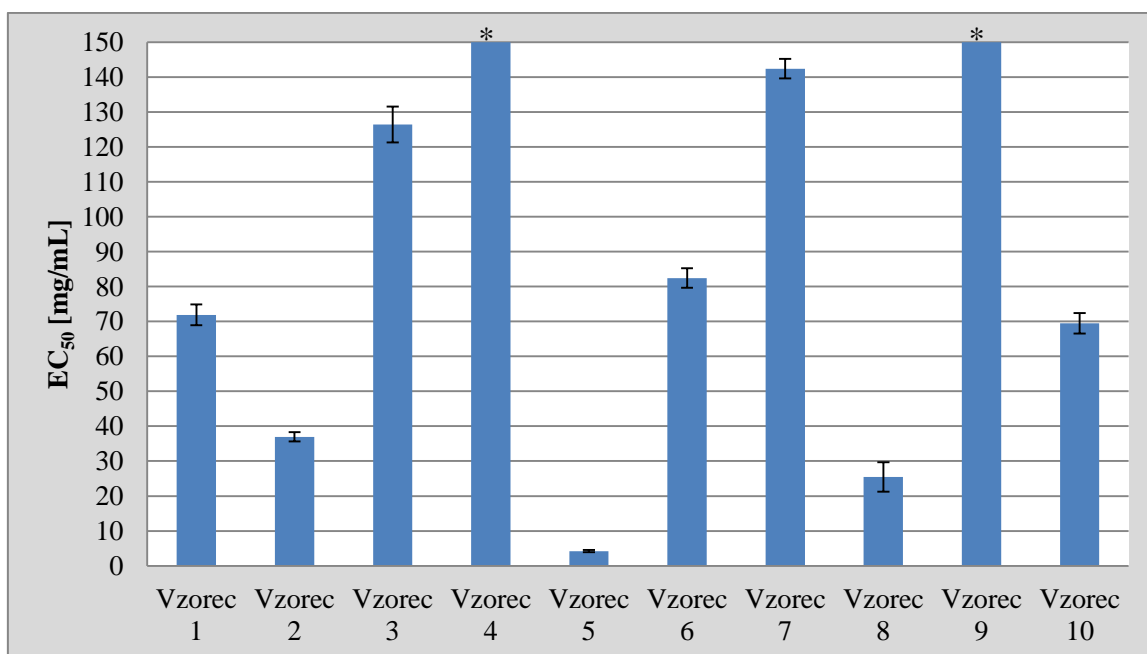
5. RAZPRAVA

5.1 PRIMERJAVA ANALIZIRANIH KOZMETIČNIH IZDELKOV

Slika 20 prikazuje primerjavo števila navedenih sestavin z antioksidativnimi lastnostmi, slika 21 pa primerjavo vrednosti EC_{50} med analiziranimi kozmetičnimi izdelki.



Slika 20: Primerjava števila navedenih sestavin z antioksidativnimi lastnostmi med analiziranimi kozmetičnimi izdelki.



Slika 21: Primerjava vrednosti EC_{50} med analiziranimi kozmetičnimi izdelki.

*Opomba: Pri najvišji testirani koncentraciji vzorec ne izkazuje antioksidativnih učinkov (ne reducira DPPH).

Izdelki, ki smo jih analizirali, vsebujejo različno število sestavin z antioksidativnim delovanjem, vendar poznamo le kvalitativno sestavo, ne pa tudi količinske. Tudi vrednosti EC_{50} se med testiranimi vzorci precej razlikujejo. Iz rezultatov je razvidno, da ima med določenimi antioksidativnimi kapacitetami najvišjo vzorec 5, najnižjo pa vzorec 7. Vzorca 4 in 9 pa antioksidativne aktivnosti sploh nimata.

5.1.1 Vzorec 1

Pri vzorcu 1 ($EC_{50} = 71,87 \pm 2,97$ mg/mL) smo glede na večje število navedenih sestavin z antioksidativnimi lastnostmi pričakovali nižjo vrednost EC_{50} oz. višjo antioksidativno kapaciteto. Poleg tehničnega antioksidanta BHT, estra vitamina E (*Tocopheryl Acetate*) in estra vitamina C (*Ascorbyl Palmitate*), je v vzorcu prisotno tudi olivno olje (*Olea Europaea Oil*), ki vsebuje približno 0,1-0,2% tokoferolov in polifenole (27), ekstrakt listov navadne oljke (*Olea Europaea Leaf Extract*), ki mu pripisujejo antioksidativne lastnosti zaradi vsebnosti polifenolov (28), ter olje limonovca (*Citrus Medica Limonum Oil*), ki vsebuje precej antioksidativnih flavonoidov (27, 29). K rezultatu analize so največ prispevali rastlinski ekstrakti in pa BHT, ki ima vlogo tehničnega antioksidanta (varuje izdelek pred oksidativnim kvarjenjem). Ester vitamina E pa *in vitro* nima antioksidativne funkcije, saj se aktivira šele v koži po hidrolizi do proste oblike, in zato v vzorcu ne prispeva k antioksidativni kapaciteti.

Z vidika antioksidativnih lastnosti je glede na izmerjeno antioksidativno kapaciteto krema za roke zadovoljiva, vendar moramo upoštevati, da bo k dodatnemu antioksidativnemu delovanju v koži po hidrolizi prispeval tudi ester vitamina E.

5.1.2 Vzorec 2

Pri vzorcu 2 ($EC_{50} = 36,93 \pm 1,32$ mg/mL) so rezultati pričakovani; antioksidativna kapaciteta je precej visoka glede na ostale izdelke, vendar bi glede na število vsebovanih sestavin z antioksidativnimi lastnostmi lahko bila še višja. Antioksidativne sestavine, prisotne v izdelku, so: vitamin E (*Tocopherol*), ester vitamina E (*Tocopheryl Acetate*), ester vitamina A (*Retynil Palmitate*) ter rastlinski ekstrakti, kot so ekstrakt skorje/listov/mladih poganjkov virginskega nepozebnika (*Hamamelis Virginiana Bark/Leaf/Twig Extract*), ki vsebuje flavonoide (epikatehin galat, kvercerol) in fenolne kisline (27, 30), jobjobin vosek (*Simmondsia Chinensis Seed Oil*), ki vsebuje več spojin z antioksidativnim delovanjem, med katerimi so najpomembnejši tokoferoli (31), ekstrakt navadnega rožmarina (*Rosmarinus Officinalis Extract*) z dokazanim antioksidativnim

delovanjem rožmarinske kisline (32), olje oljne ogrščice (*Brassica Campestris Seed Oil*), ki prav tako vsebuje spojine z antioksidativnim delovanjem (33), olje andirobe (*Carapa Guaianensis Oil*) z dokazanimi antioksidativnimi lastnostmi *in vivo* (34), acai olje (*Euterpe Oleracea Oil*), ki ima zaradi vsebnosti vitaminov E in C ter polifenolov precej antioksidativnih lastnosti (35), in ekstrakt listov puhaste breze (*Betula Alba Leaf Extract*), ki prav tako vsebuje vitamina E in C ter s tem pripomore k antioksidativnim učinkom izdelka (36). Tudi pri tem izdelku velja poudariti, da ester vitamina E v vzorcu ni prispeval h končnemu rezultatu.

Ker je antioksidativna kapaciteta izdelka precej visoka, lahko kremo označimo kot dobro, k še boljšim lastnostim izdelka v koži pa bo po hidrolizi prispeval tudi ester vitamina E. Glede na to, da je obraz del telesa, ki je najbolj in največ časa izpostavljen UV sevanju in z njim povezanim nastankom radikalov, so antioksidanti v kremi, namenjeni negi obraza, še posebej dobrodošli.

5.1.3 Vzorec 3

Vzorec 3 ima zelo visoko vrednost EC_{50} ($126,42 \pm 5,12$ mg/mL), kar pomeni nizko antioksidativno kapaciteto. Vsebuje dve sestavini z antioksidativnimi lastnostmi – ester vitamina E (*Tocopheryl Acetate*) in ekstrakt listov sene (*Cassia Alata Leaf Extract*), ki vsebuje 2-5% flavonoidov (predvsem derivate kemferola) (27). Slednji je edina sestavina, ki je v vzorcu prispevala k antioksidativni kapaciteti, saj ester vitamina E *in vitro* ni aktiven, in to je po vsej verjetnosti tudi razlog nizke antioksidativne kapacitete izdelka. Poleg tega pa je dodani rastlinski ekstrakt v izdelku lahko prisoten v zelo majhnih količinah.

Z vidika antioksidativnega delovanja izdelek zaradi nizke antioksidativne kapacitete ni tako učinkovit. Sicer bo po hidrolizi v koži tudi v tej kremi nekaj antioksidativnih učinkov prispeval ester vitamina E, a ker je krema v prvi vrsti namenjena zaščiti proti soncu, bi ravno tak kozmetični izdelek moral vsebovati več antioksidantov, ki bi kožo varovali pred škodljivimi učinki UV sevanja in radikalov.

5.1.4 Vzorec 4

Kljub trem navedenim sestavinam z antioksidativnimi lastnostmi smo z metodo DPPH ugotovili, da vzorec 4 nima antioksidativne aktivnosti. Izdelek poleg čistega vitamina C (*Ascorbic Acid*) vsebuje tudi vodo virginskega nepozebnika (*Hamamelis Virginiana Water*), ki vsebuje nizke količine flavonoidov (27) in limonin sok (*Citrus Limon Juice*), ki

vsebuje okoli 0,5% vitamina C, flavonoide ter karotenoide (27, 37) in ima posledično precej antioksidativnih lastnosti. Ker izdelek sestoji večinoma iz vodne faze (tonik), lahko vzrok za rezultat analize pripišemo izredni nestabilnosti in enostavnosti oksidacije vitamina C v vodnem mediju. Poleg tega pa so lahko sestavine dodane v tako majhnih količinah, da njihove antioksidativne lastnosti sploh niso izražene.

S stališča antioksidativnega delovanja lahko izdelek označimo kot zelo slab.

5.1.5 Vzorec 5

Vzorec 5 ima med vsemi analiziranimi kozmetičnimi izdelki najvišjo antioksidativno kapaciteto ($EC_{50} = 4,20 \pm 0,32$ mg/mL). Glede na število dodanih sestavin z antioksidativnim delovanjem smo pričakovali nekoliko slabšo. Poleg tehničnega antioksidanta BHT ima vzorec med sestavinami navedene še rastlinske ekstrakte: ekstrakt listov navadne aloje (*Aloe Barbadensis Leaf Extract*), ki ima dokazano visoko antioksidativno kapaciteto, saj vsebuje vitamin C, vitamin E, β -karoten in flavonoide (27, 38), ekstrakt lubja indijskega kino drevesa (*Pterocarpus Marsupium Wood Extract*), ki vsebuje flavonoide, med katerimi prevladuje epikatehin, in ima dokazano visoko antioksidativno aktivnost *in vitro* (39-41), ekstrakt korenine zimske češnje oz. indijskega ginsenga (*Withania Somnifera Root Extract*), ki tudi vsebuje flavonoide in ima dokazano visoko antioksidativno kapaciteto *in vitro* (42), in ekstrakt azijskega vodnega popnjaka oz. gotu kole (*Centella Asiatica Extract*), ki vsebuje fenolne in flavonoidne spojine in ima potrjeno antioksidativno aktivnost v modelnem biokemijskem sistemu (27, 43). K visoki antioksidativni kapaciteti vzorca prispevajo tako BHT, ki sicer ščiti le kozmetični izdelek pred oksidacijami, kot tudi rastlinski ekstrakti, ki imajo z dokazi podprto visoko antioksidativno aktivnost. Poleg tega pa so lahko le-ti v izdelku dodani tudi v večjih količinah, kar vpliva na končni rezultat analize.

Zaradi visoke antioksidativne kapacitete lahko kremo, ki je namenjena tako negi obraza kot telesa, označimo kot izredno dobro.

5.1.6 Vzorec 6

Vzorec 6 z vrednostjo $EC_{50} = 82,43 \pm 2,79$ mg/mL vsebuje samo eno sestavino z antioksidativnim delovanjem – antioksidant koencim Q_{10} (*Ubiquinone*). Iz rezultatov analize – delna redukcija radikala DPPH domnevamo, da je v izdelku dodana reducirana oblika (ubikinol). Glede na študije, ki dokazujejo, da dermalno nanešen koencim Q_{10} dopolni in poveča antioksidativno kapaciteto kože (3), in glede na navedbo »anti-age«

učinkov na ovojnini izdelka smo pričakovali višjo antioksidativno kapaciteto. Po vsej verjetnosti same sestavine v izdelku količinsko ni veliko ali pa je pretežno v oksidirani (kinonski) obliki, kar je rezultat nižje antioksidativne aktivnosti.

Glede na rezultate analiz ostalih izdelkov, ki vsebujejo veliko več sestavin z antioksidativnimi lastnostmi, je antioksidativna kapaciteta v primerjavi z njimi zadovoljiva, zato lahko kremo za roke z vidika antioksidativnega delovanja označimo za povprečno.

5.1.7 Vzorec 7

Vzorec 7 ($EC_{50} = 142,38 \pm 2,81$ mg/mL) ima med vsemi analiziranimi kozmetičnimi izdelki najnižjo antioksidativno kapaciteto. Izdelek od antioksidativnih sestavin sicer vsebuje le ester vitamina E (*Tocopheryl Acetate*), ki v analizi ni prispeval k antioksidativni aktivnosti, in destilat virginskega nepozebnika (*Hamamelis Virginiana Distillate*), ki ima zaradi vsebnosti nizkih količin flavonoidov šibko antioksidativno delovanje (27). Posledica slabega rezultata je predvsem vsebnost le ene aktivne antioksidativne sestavine, ki ima zelo šibko antioksidativno delovanje, poleg tega pa je v izdelku verjetno dodana v zelo majhnih količinah in zato izkazuje zelo malo antioksidativnih lastnosti.

Tudi pri tem izdelku velja poudariti, da bo v koži po hidrolizi do proste oblike nekaj antioksidativnih lastnosti prispeval tudi ester vitamina E, vendar glede na izraženo zelo nizko antioksidativno kapaciteto in glede na to, da je losjon namenjen negi kože po sončenju, prav taka koža pa bi potrebovala še dodatno nego z antioksidanti, lahko izdelek z vidika antioksidativne kapacitete označimo kot zelo slab.

5.1.8 Vzorec 8

Vzorec 8 ima v primerjavi z ostalimi vzorci in glede na število dodanih sestavin z antioksidativnim delovanjem izredno visoko antioksidativno aktivnost ($EC_{50} = 25,47 \pm 4,20$ mg/mL). Vsebuje tri antioksidativne sestavine: ester vitamina E (*Tocopheryl Acetate*), aminokislina kolagena (*Collagen Amino Acids*), med katere spadata tudi aminokislinska ostanka tirozin in cistein, ki imata potrjeno antioksidativno sposobnost (44, 45), in sončnično olje (*Helianthus Annus Hybrid Oil*), ki ima zaradi vsebnosti okoli 0,6% tokoferolov precej antioksidativnih lastnosti (27). Po vsej verjetnosti k dobremu rezultatu analize prispevajo ravno dodane aminokislina in pa antioksidativni tokoferoli iz sončničnega olja. V vzorcu ester vitamina E sicer ni aktiven, vendar v koži po hidrolizi dodatno prispeva k antioksidativnemu delovanju izdelka. Vse tri sestavine so na seznamu

sestavlin izdelka tudi napisane bolj na začetku, kar pomeni, da so verjetno v izdelku prisotne v nekoliko večjih količinah in zato pripomorejo k višji celokupni antioksidativni kapaciteti vzorca.

Zaradi visoke antioksidativne kapacitete lahko negovalni losjon za telo označimo za zelo dobrega, k še višji antioksidativni kapaciteti pa bo po hidrolizi v koži prispeval tudi ester vitamina E.

5.1.9 Vzorec 9

Rezultati analize z metodo DPPH so pokazali, da vzorec 9 nima antioksidativne aktivnosti. Izdelek vsebuje rastlinski ekstrakt – sok listov navadne aloje (*Aloe Barbadensis Leaf Juice*), ki ima zaradi vsebnosti vitamina C, vitamina E, β -karotena in flavonoidov precej antioksidativnih lastnosti (27, 38). Ker pa je to edina prisotna sestavina z antioksidativnim delovanjem v izdelku, smo takšen rezultat nekako pričakovali. Verjetno je je v izdelku premalo, da bi bile antioksidativne lastnosti izražene, ali pa so se zaradi prisotnosti kisika še tisti antioksidanti, ki jih je izdelek vseboval, oksidirali.

Z vidika antioksidativnega delovanja lahko losjon za telo označimo kot zelo slab.

5.1.10 Vzorec 10

Vrednost EC_{50} vzorca 10 znaša $69,47 \pm 2,95$ mg/mL, kar je nekaj srednjega v primerjavi z ostalimi analiziranimi kozmetičnimi izdelki. Glede na število vsebovanih antioksidativnih sestavin antioksidativna kapaciteta ni visoka. Izdelek vsebuje 9 rastlinskih ekstraktov: sončnično olje (*Helianthus Annus Hybrid Oil*), ki antioksidativne lastnosti izkazuje predvsem zaradi vsebnosti okoli 0,6% tokoferolov (27), sok listov navadne aloje (*Aloe Barbadensis Leaf Juice*), ki prav tako izkazuje precej antioksidativnih lastnosti zaradi vsebnosti vitamina C, vitamina E, β -karotena in flavonoidov (27, 38), ekstrakt cvetov navadne kamilice (*Chamomilla Recutita Flower Extract*), ki vsebuje antioksidativne polifenole (46), ekstrakt juke (*Yucca Filamentosa Extract*), ki vsebuje antioksidativne vitamine in polifenole (47), ekstrakt vrste pelina (*Artemisia Tridentata Extract*), ki ima dokazano antioksidativno aktivnost zaradi vsebnosti polifenolov (48), ekstrakt semen jojobe (*Simmondsia Chinensis Seed Extract*), ki vsebuje antioksidativne tokoferole (31), ekstrakt semen pegastega badlja (*Silybum Marianum Seed Extract*), ki ima dokazano antioksidativno aktivnost zaradi vsebujočih flavonoidov, med katerimi so najpomembnejši apigenin, kemferol in kvercetin (27, 49), ekstrakt semen španske kadulje (*Salvia Hispanica Seed Extract*), ki ima prav tako dokazano *in vitro* antioksidativno delovanje zaradi

vsebujočih flavonoidov, med katerimi sta v višjih koncentracijah prisotna kvercetin in kemferol (50), ter ekstrakt listov ameriške agave (*Agave Americana Leaf Extract*), ki vsebuje antioksidativne polifenole in flavonoide (51). Glede na število prisotnih rastlinskih ekstraktov v izdelku, ki izkazujejo antioksidativne lastnosti, smo pričakovali višjo antioksidativno kapaciteto.

Z vidika antioksidativnega delovanja lahko losjon za telo označimo za zadovoljivega.

6. SKLEP

V diplomski nalogi smo analizirali 10 negovalnih kozmetičnih izdelkov in jim s pomočjo metode DPPH določili antioksidativne lastnosti. Antioksidativno kapaciteto smo ovrednotili s koncentracijami EC_{50} . Pri tem smo prišli do naslednjih zaključkov:

- Analizirani kozmetični izdelki vsebujejo v povprečju štiri sestavine z antioksidativnimi lastnostmi.
- Povprečna vrednost efektivnih koncentracij EC_{50} izbranih kozmetičnih izdelkov znaša 69,90 mg/mL.
- Osem od desetih vzorcev ima izražene antioksidativne lastnosti, pri dveh (vzorec 4 in 9) antioksidativne kapacitete nismo potrdili. Ta trditev ovrže hipotezo, da vsi izdelki zaradi vsebnosti antioksidativnih sestavin izkazujejo antioksidativno aktivnost.
- Vzorec 4, ki vsebuje čisti vitamin C, ne izkazuje antioksidativne kapacitete, zaradi izredne nestabilnosti vitamina C, kar ovrže hipotezo, da imajo izdelki z vsebnostjo čistih antioksidantov največ antioksidativnih lastnosti.
- Od petih analiziranih izdelkov, ki od aktivnih antioksidativnih sestavin vsebujejo samo rastlinske ekstrakte, le eden ne izkazuje antioksidativne kapacitete.
- Vzorcju 6, ki na ovojnjini zagotavlja »anti-age« učinke, smo potrdili antioksidativne lastnosti.
- Glede na število prisotnih antioksidativnih sestavin in končno celokupno vrednost EC_{50} imata med ovrednotenimi izdelki najvišjo antioksidativno kapaciteto vzorca 5 in 8.
- Vzorca 2 in 10, ki med izbranimi kozmetičnimi izdelki vsebujeta največ antioksidativnih sestavin po številu (količinske sestave ne poznamo), ne izkazujeta najvišje antioksidativne kapacitete v primerjavi z ostalimi izdelki.
- Analizirana izdelka, ki sta namenjena zaščiti proti soncu in negi kože po sončenju (vzorca 3 in 7), v nasprotju s pričakovanji izkazujeta najnižjo antioksidativno kapaciteto v primerjavi z ostalimi izdelki.
- Med analiziranimi kozmetičnimi izdelki imajo v povprečju najvišjo antioksidativno kapaciteto izdelki za nego obraza ($EC_{50} = 55,85$ mg/mL), od katerih eden ne izkazuje antioksidativnih lastnosti, najnižjo antioksidativno kapaciteto pa kremi za roke ($EC_{50} = 77,15$ mg/mL). Izdelki za nego telesa imajo v povprečju vrednost $EC_{50} = 57,61$ mg/mL.

7. LITERATURA

1. Poljšak B: Skin aging, free radicals and antioxidants, Nova Science, New York, 2012: 1-6.
2. Juncan A-M: Analysis of some antioxidants used in cosmetics by chromatographic methods, Babes-Bolyai University, Faculty of chemistry and chemical engineering (http://doctorat.ubbcluj.ro/sustinerea_publica/rezumate/2011/chimie/JUNCAN_ANCA_MARIA_EN.pdf); dostop: 6.6.2015.
3. Farage M. A, Miller K. W, Maibach H. I: Textbook of aging skin, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2010: 1069-1078.
4. Barel A. O, Paye M, Maibach I. H: Handbook of cosmetic science and technology, 3rd edition, Informa Healthcare USA, New York, 2009: 1, 291-293, 301-310.
5. Gawkrödger D. J: Dermatology: An illustrated colour texts, 3rd edition, Edinburgh: Churchill Livingstone, 2002: 2.
6. Poljšak B, Glavan U, Dahmane R: Skin cancer, free radicals and antioxidants. International Journal of Cancer Research and Prevention 2011; 4 (3): 193-217.
7. Farage M. A, Miller K. W, Elsner P, Maibach H. I: Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: a review. International Journal of Cosmetic Science 2008; 30: 87-95.
8. Pandel R, Poljšak B, Godic A, Dahmane R: Skin photoaging and the role of antioxidants in its prevention, University of Ljubljana, Faculty of Health Studies and Faculty of Medicine (http://www.researchgate.net/publication/258044079_Skin_Photo_aging_and_the_Role_of_Antioxidants_in_Its_Prevention); dostop: 28.5.2015.
9. <http://www.rice.edu/~jenky/sports/antiox.html>; dostop: 17.6.2015.
10. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N: Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Pharmacognosy Review 2010; Jul-Dec; 4(8): 118-126.
11. Sies H: Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. Experimental Physiology 1997; 82 (2): 291-295.
12. <https://en.wikipedia.org/wiki/Antioxidant>; dostop: 12.6.2015.
13. Mravljak J: Radikali in oksidativni stres. Farmaceutski vestnik 2015; 66: 127-132.
14. Thiele J, Elsner P: Oxidants and antioxidants in cutaneous biology, vol. 29, Karger, Basel, 2001: 157-164.

15. 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: 66-70.
16. http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/FK/Gradiva_FK/2010/Seminarji/Antioksidanti.pdf; dostop: 20.6.2015.
17. https://sl.wikipedia.org/wiki/Vitamin_A; dostop: 27.6.2015.
18. https://en.wikipedia.org/wiki/Butylated_hydroxytoluene; dostop: 25.6.2015.
19. Ralph Gordon H: Modern Cosmetology: The principles and practice of modern cosmetics, vol. 1, L. Hill, London, 1962: 621.
20. Pokorny J, Yanishlieva N, Gordon M: Antioxidants in food: Practical applications, Woodhead Publishing Limited, Abington Hall, 2001: 72-73.
21. Miquel Becker E, Nissen L. R, Skibsted L. H: Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. Eur Food Res Technol 2004; 219: 561-571.
22. Sharma O. P, Bhat T. K: DPPH antioxidant assay revisited. Food Chemistry 2009; 113: 1202-1205.
23. <http://en.wikipedia.org/wiki/DPPH>; dostop: 6.6.2015.
24. Molyneux P: The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin J. Sci. Technol 2004; 26 (2): 211-219.
25. Kedare S. B, Singh R. P: Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. J. Food Sci. Technol 2011; 48 (4): 412-422.
26. Garcia E. J, Cadorin Oldoni T. L, De Alencar S. M, Reis A, Loguercio A. D, Grande R. H. M: Antioxidant activity by DPPH assay of potential solutions to be applied on bleached teeth. Braz Dent J 2012; 23 (1): 22-27.
27. Kreft S, Kočevar Glavač N: Sodobna fitoterapija: Z dokazi podprta uporaba zdravilnih rastlin, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2013: 117-118, 319-326, 333-337, 491-493, 512-537.
28. https://en.wikipedia.org/wiki/Olive_leaf; dostop: 12.7.2015.
29. D'Amelio Sr. F. S: Botanicals: A phytocosmetic desk reference, CRC Press LLC, Florida, 2000: 142.
30. <http://www.zdravilnerastline.si/rastline-l-r/24-nepozebnik-ali-hamamelis-hamamelis-virginiana.html>; dostop: 12.7.2015.
31. <http://www.progressivehealth.com/acne-jojoba-oil.htm>; dostop: 12.7.2015.

32. Erkan N, Ayranci G, Ayranci E: Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella Sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chemistry* 2008; 110 (1): 76-82.
33. Nagatsu A, Sugitani T, Mori Y, Okuyama H, Sakakibara J, Mizukami H: Antioxidants from rape (*Brassica campestris* var. *Japonica hara*) oil cake. *Natural Product Research* 2004; 18 (3): 231-239.
34. Arencibia-Arrebola D. F, Rosario-Fernandez L. A, Delgado-Roche L, Alonso-Laurencio A, Crespo-Garces Y, Biart-La Rosa O, Vidal Novoa A: In vivo genotoxic potential of the seed oleaginous extract of *Carapa guianensis* Aublet using the comet assay. *Journal of Experimental and Integrative Medicine* 2013; 3 (3): 231-236.
35. <http://www.trgovina-greengo.si/artikel.php?artikel=1202>; dostop 12.7.2015.
36. <https://www.truthinaging.com/ingredients/betula-alba>; dostop 12.7.2015.
37. <http://www.himalayawellness.com/herbfinder/citrus-limon.htm>; dostop 12.7.2015.
38. Hu Y, Xu J, Hu Q: Evaluation of antioxidant potential of aloe vera (*Aloe barbadensis* miller) extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003; 51 (26): 7788-7791.
39. Mohammadi M, Khole S, Devasagayam T. P, Ghaskadbi S. S: Pterocarpus marsupium extract reveals strong in vitro antioxidant activity. *Drug Discoveries & Therapeutics* 2009; 3 (4): 151-161.
40. <http://www.himalayawellness.com/herbfinder/pterocarpus-marsupium.htm>; dostop: 15.7.2015.
41. <http://www.moja-lekarna.com/p-24821-himalaya-diabecon-60-tablet.aspx>; dostop: 15.7.2015.
42. Shahriar M, Hossain M. I, Anwar Sharmin F, Akhter S, Haque A, Bhuiyan M. A: In vitro antioxidant and free radical scavenging activity of *Withania Somnifera* Root. *IOSR Journal of Pharmacy* 2013; 3 (2): 38-47.
43. Pittella F, Dutra R. C, Junior D. D, Lopes M. T. P, Barbosa N. R: Antioxidant and cytotoxic activities of *Centella asiatica* (L) urb. *International Journal of Molecular Sciences* 2009; 10 (9): 3713-3721.
44. <https://en.wikipedia.org/wiki/Collagen>; dostop: 16.7.2015.
45. Meucci E, Mele M. C: Amino acids and plasma antioxidant capacity. *Amino Acids* 1997; 12 (3-4): 373-377.
46. Kolodziejczyk-Czepas J, Bijak M, Saluk J, Ponczek M. B, Zbikowska H. M, Nowak P, Tsirigotis-Maniecka M, Pawlaczyk I: Radical scavenging and antioxidant effects of

- Matricaria chamomilla polyphenolic-polysaccharide conjugates. International Journal of Biological macromolecules 2015; 72: 1152-1158.
47. <http://www.useloveshare.com/FIC/sue/science?m=3&i=296>; dostop: 18.7.2015.
48. Pu X, Lam L, Gehlken K, Ulappa A. C, Rachlow J. L, Sorensen Forbey J: Antioxidant capacity of wyoming big sagebrush (*Artemisia tridentata* ssp. *wyomingensis*) varies spatially and is not related to the presence of a sagebrush dietary specialist. Western North American Naturalist 2015; 75 (1): 78-87.
49. Akkaya H, Yilmaz O: Antioxidant capacity and radical scavenging activity of *Silybum marianum* and *Ceratonia siliqua*. Ekoloji 2012; 21 (82): 9-16.
50. Reyes-Caudilo E, Tecante A, Valdivia-Lopez M. A: Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia Hispanica* L.) seed. Food Chemistry 2008; 107 (2): 656-663.
51. Hamissa A. M. B, Seffen M, Aliakbarian B, Casazza A. A, Perego P, Converti A: Phenolic extraction from *Agave americana* (L.) leaves using high-temperature, high-pressure reactor. Food and Bioproduct Processing 2012; 90 (1): 17-21.

8. PRILOGE

8.1 PRILOGA 1: Določanje gostote kozmetičnega izdelka

Preglednica XX: Izmerjene mase praznih merilnih valjev in merilnih valjev, napoljenih s kozmetičnim izdelkom, izračun mas kozmetičnih izdelkov v merilnem valju, izmerjeni volumni kozmetičnih izdelkov v merilnem valju ter izračuni gostot kozmetičnih izdelkov.

Št. vzorca	m_{prazen} [g]	m_{poln} [g]	m [g]	V [mL]	ρ [g/mL]
1	23,8513	27,4540	3,6027	3,80	0,948
2	23,8513	27,0553	3,2040	3,25	0,986
3	23,8513	26,4102	2,5589	2,83	0,904
4	23,8513	27,9171	4,0658	4,21	0,966
5	23,8513	27,2973	3,4460	3,85	0,895
6	23,8513	27,5179	3,7266	3,85	0,968
7	23,8513	27,2402	3,3889	3,62	0,936
8	23,8513	27,1792	3,3279	3,45	0,965
9	23,8513	27,1822	3,3309	3,55	0,938
10	23,8513	27,1766	3,3253	3,55	0,937