

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARUŠA KLEMENČIČ

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARUŠA KLEMENČIČ

**VREDNOTENJE ANTIOKSIDATIVNE KAPACITETE IZBRANIH
KOZMETIČNIH IZDELKOV ZA NEGO KOŽE**

**EVALUATION OF ANTIOXIDANT CAPACITY OF CHOSEN
COSMETIC PRODUCTS FOR SKIN CARE**

UNIVERSITY STUDY PROGRAMME COSMETOLOGY

Ljubljana, 2015

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

Zahvala

Zahvaljujem se svojemu mentorju doc. dr. Janezu Mravljaku, mag. farm. za vsa navodila, napotke ter strokovno pomoč. Zahvalila bi se tudi svoji družini in prijateljem za vse spodbudne besede.

Izjava

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

Maruša Klemenčič

Predsednica komisije: prof. dr. Mirjana Gašperlin, mag. farm.

Član komisije: doc. dr. Damjan Janeš, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

1	UVOD	1
1.1	Staranje in radikali	1
1.2	Koža in njeno staranje.....	2
1.3	Antioksidanti.....	5
1.4	Antioksidanti v kozmetičnih izdelkih	6
1.5	DPPH metoda	8
2	NAMEN	10
3	MATERIALI IN METODE	11
3.1	Izbrani kozmetični izdelki in njihove sestavine.....	11
3.2	Kemikalije.....	16
3.3	Laboratorijska oprema in aparature:	16
3.4	Metoda	16
4	EKSPERIMENTALNI DEL	18
4.1	Ugotavljanje gostote kozmetičnih izdelkov	18
4.2	Priprava raztopine DPPH.....	18
4.3	Priprava vzorcev	19
4.4	Inkubacija vzorcev	19
4.5	Merjenje absorbance	19
4.6	Območje linearnosti	20
4.7	Ugotavljanje vrednosti EC ₅₀	20
5	REZULTATI.....	22
6	RAZPRAVA	30
7	SKLEP.....	38
8	VIRI.....	39
9	PRILOGA.....	43

KAZALO ENAČB

Enačba 1: Radikal odvzame vodikov atom	1
Enačba 2: Radikal se adira na dvojno vez	1
Enačba 3: Poteče reakcija med dvema radikaloma	1
Enačba 4: Reakcija DPPH radikala z antioksidantom.....	8
Enačba 5: Masa izdelka	18
Enačba 6: Izračun gostote.....	18
Enačba 7: Povezava mase, koncentracije in volumna	20
Enačba 8: Izračun deleža nezreagirane DPPH.....	20
Enačba 9: Enačba premice.....	20
Enačba 10: Izračun EC ₅₀	21

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije za Natural lift (Afrodita).....	23
Graf 2: Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije za Amazing Reichhaltige Body Milk (Aldo Vandini).....	23
Graf 3: Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije za Body Milk intensive care (Dahlia).....	24
Graf 4: Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije za Après Lotion Schisandra (Alverde, Dm).....	24
Graf 5: Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije za Anti Age Straffende Sonnenmilch (Sundance, Dm).....	25
Graf 6: Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije za Apilana Face (Medex)	25
Graf 7: Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije za 2in1 Waschgel + Augen Make-up Entferner (Cadea Vera, Müller)	26
Graf 8: Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije za Snow Cladonia Day Cream (Natura Siberica).....	26
Graf 9: Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije za Body Milk Firming (Nivea).....	27

Graf 10: Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije za Argan (Sans Soucis).....	27
Graf 11: Dobljene vrednosti EC ₅₀ za posamezni kozmetični izdelek s standardnim odklonom.....	28

KAZALO SLIK

Slika 1: Struktura tokoferolov in tokotrienolov.....	6
Slika 2: Struktura koencima Q ₁₀	7
Slika 3: Struktura L-askorbinske kisline	7
Slika 4: Reakcija DPPH radikala z antioksidantom H-A.	9
Slika 5: Izbrani kozmetični izdelki.....	11
Slika 6: Enačba za standardni odklon.....	21

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Število sestavin z antioksidantnim delovanjem v posameznem kozmetičnem izdelku	22
Preglednica II: Dobljene vrednosti EC ₅₀ za posamezni kozmetični izdelek.	28
Preglednica III: Masa, volumen in gostota posameznega kozmetičnega izdelka.....	43

POVZETEK

Antioksidanti so zelo popularne sestavine kozmetičnih izdelkov, saj lahko reagirajo z radikali. Radikali so izjemno reaktivne spojine, ki povzročajo številne poškodbe celic. Nastanek radikalov povzroča ultravijolično sevanje med izpostavitvijo soncu, nastajajo pa tudi v številnih metabolnih procesih v celicah. Takrat se v naši koži poveča količina radikalov, kar vodi do prezgodnjega staranja kože. Ob uporabi izdelkov, ki vsebujejo antioksidante, se v naši koži poveča antioksidativna kapaciteta in s tem je obramba kože pred radikali in prezgodnjim staranjem izboljšana. V diplomski nalogi smo ugotavljali antioksidativno kapaciteto desetih kozmetičnih izdelkov za nego kože. Uporabili smo spektrofotometrično metodo z DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazilom), pri kateri smo spremljali redukcijo DPPH preko spremembe barve iz vijolične v rumeno pri absorpcijskem maksimumu DPPH 517 nm. Iz dobljenih rezultatov smo narisali grafe deleža nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije kozmetičnega izdelka in izračunali efektivno koncentracijo (EC_{50}) za posamezen kozmetični izdelek. Devet izbranih kozmetičnih izdelkov izkazuje antioksidativno delovanje, eden pa ne. Kozmetični izdelki, ki izkazujejo antioksidativno delovanje, imajo EC_{50} v razponu od $1,03 \pm 0,910$ do $180 \pm 19,6$.

Ključne besede: antioksidanti, antioksidativna kapaciteta, DPPH metoda, kozmetični izdelki

ABSTRACT

Antioxidants are very popular ingredients in cosmetic products, due to their reaction with free radicals. Free radicals are very reactive species, which induce cell damages. Free radicals are produced under influence of ultraviolet light during sun exposure. The amount of radicals is then increased, which leads to premature ageing. If cosmetic products with antioxidants are used, antioxidant capacity of skin increases. This helps skin with protecting against radicals and premature ageing. In our degree, we evaluated the antioxidant capacity of ten cosmetic products for skin care. We used DPPH assay. Change of color from violet to yellow was measured spectrophotometrically at wavelength 517 nm. Graphs of part of DPPH that did not react in dependence of concentration of cosmetic product were made and effective concentrations (EC_{50}) of all cosmetic products were calculated. Nine cosmetic products show antioxidant activity and one does not. Cosmetic products that show antioxidant activity have EC_{50} in range from $1,03 \pm 0,910$ to $180 \pm 19,6$.

Key words: Antioxidants, antioxidant capacity, DPPH assay, cosmetic products

SEZNAM OKRAJŠAV

A	absorbanca
BHT	butil hidroksitoluen
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EC ₅₀	koncentracija potrebna za 50-odstotni učinek (angl. <i>half maximal efficient concentration</i>)
SPF	faktor zaščite pred soncem (angl. <i>sun protection factor</i>)
UV	ultravijolično
UVA	ultravijolično sevanje valovne dolžine 315-400 nm
UVB	ultravijolično sevanje valovne dolžine 280-315 nm
UVC	ultravijolično sevanje valovne dolžine 100-280 nm

1 UVOD

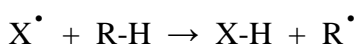
1.1 Staranje in radikali

Staranje je biološki proces, pri katerem se postopoma slabšajo fiziološke funkcije organizma. Prizadete so funkcije na ravni posameznih celic ter tudi na ravni organov. Glede na dejavnike, ki ga povzročajo, delimo staranje v dve skupini: notranje ali intrinzično ter zunanje ali ekstrinzično staranje. Notranje staranje je posledica genetskih vplivov ter notranjih dejavnikov, kot so hormoni in presnovki. Zunanje staranje je podoben proces, ki spremlja notranje staranje. Povzročajo ga zunanji dejavniki, kot so UV sevanje, okoljski toksini ter nezdrav življenjski slog z neustrezno prehrano, prekomernim pitjem alkohola in kajenjem (1).

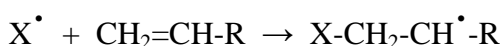
Pri obeh procesih staranja gre na molekularnem nivoju za podobne dogodke, pri katerih imajo glavno vlogo radikali. Radikali so snovi, ki imajo v svoji strukturi vsaj en nesparjen elektron, zaradi katerega so izjemno reaktivni. V našem telesu so radikali navadni intermediati v presnovnih procesih. Nastajajo tudi pri bolezenskih stanjih, kjer gre za vnetni proces ter ob velikih fizičnih in psihičnih naporih. Nastanek radikalov povzročajo tudi zunanji dejavniki. Ob izpostavitvi soncu fotoni UV svetlobe homolizno cepijo kovalentne vezi, pri čemer nastanejo radikali. Torej imamo dva izvora radikalov, ki povzročata – prvi notranje staranje celotnega organizma, drugi pa zunanje staranje, ki je pretežno omejeno na kožo (2).

Radikali reagirajo po eni izmed treh reakcij:

- Enačba 1: Radikal odvzame vodikov atom



- Enačba 2: Radikal se adira na dvojno vez



Ali

- Enačba 3: Poteče reakcija med dvema radikaloma



Radikalske reakcije so neselektivne. Radikali lahko reagirajo z makromolekulami v telesu, saj jim te ponudijo vodikov atom ali dvojno vez. Pri tem nastane nov radikal, ki reagira naprej z novo molekulo. Vsak dovolj reaktiven radikal lahko sproži začetek verižnih radikalskih reakcij, ki so zelo hitre in jih je težko ustaviti. Posledice za celico so pri obsežnih oksidativnih poškodbah velikokrat pogubne. Radikalsko sproženo oksidacijo sestavin celične membrane imenujemo lipidna peroksidacija, kar vodi v zmanjšanje integritete membrane. Poškodbe celice so odvisne od obsega oksidacije, količine antioksidantov, kondicije, v kateri je celica in drugih dejavnikov, vendar v večini primerov pomenijo smrt celice. Če radikali reagirajo z molekulami DNA, lahko pride do izgube ali zamenjave posamezne nukleinske baze ali pretrganja verige DNA. Za popravljanje teh poškodb imajo celice razvite dobre popravljalne mehanizme. Kljub temu lahko pri popravilu DNA pride do napake (na primer vgradi se napačna baza), zato se te kopičijo in nastajajo geni s spremenjenim zapisom za proteine. Če je teh poškodb malo in če niso prizadeti pomembnejši geni, ki nosijo zapis za pomembnejše fiziološke funkcije, potem govorimo o staranju. Če so prizadete določene skupine genov v določenem organu, lahko pride do degenerativnih obolenj. V nekaterih primerih pa se lahko zaradi naključnih mutacij normalna celica pretvori v rakavo (2,3).

1.2 Koža in njeno staranje

Največji in najpomembnejši organ pri ljudeh je koža. Na njej je najlažje opazovati procese staranja in vpliv UV sevanja na staranje, saj lahko videz kože spremljamo sami in opazujemo spremembe, ki se dogajajo.

Strukturo kože tvorijo 3 plasti. Vsaka plast ima svojo specifično zgradbo in funkcijo. Od zunaj navznoter si plasti sledijo: povrhnjica (lat. *epidermis*), usnjica (lat. *dermis*) ter podkožje (lat. *subcutis*). Zunanja plast povrhnjica je sestavljena iz 5 plasti. Najbolj zunanja je rožena plast (lat. *stratum corneum*), ki ji sledijo svetleča plast (lat. *stratum lucidum*), zrnasta plast (lat. *stratum granulosum*), trnasta plast (lat. *stratum spinosum*) in zarodni sloj epidermisa (lat. *stratum basale*). V zarodnem sloju stalno nastajajo nove celice keratinociti, ki potujejo proti površini in se med tem spremenijo. Nastanejo mrtvi korneociti, ki tvorijo roženo plast. Med seboj so tesno povezani. Te celice nimajo več jedra, mitohondrijev in endoplazemskega retikuluma, vsebujejo pa beljakovine, maščobne kisline, holesterol in

njegove estre ter ceramide. Zaradi velike vsebnosti lipidov je rožena plast učinkovita bariera za prehod vode tako v kožo kot tudi iz nje. Na ta način varuje telo pred izsušitvijo. Na površini povrhnjice se končujejo izvodila znojnih in lojnih žlez. Znoj je sestavljen iz vode, v kateri so ioni nekaterih kovin, sečnina ter mlečna kislina, ki je pomembna za kisel pH kože. S tem koža vzdržuje protimikrobno zaščito. Loj je sestavljen iz lipofilnih sestavin, kot so voski, gliceridi, maščobne kisline, skvalen ter holesterol in njegovi estri. Lipofilne sestavine loja dodatno pripomorejo k omejevanju prehoda vode ter so ovira za prehod mikroorganizmov. Zelo pomembni sestavi v loju sta vitamin E (α -tokoferol) in skvalen, ki delujeta kot antioksidanta. Pod povrhnjico leži usnjica. Sestavljena je iz spleta elastinskih in kolagenskih vlaken, ki so pomembni pri prožnosti in elastičnosti kože. Najnižja plast kože je podkožje, ki je pomembno kot zaloga maščob (4).

Staranje kože je rezultat več procesov. Pri ženskah in moških se koža stara zaradi intrinzičnih ter ekstrinzičnih procesov, ki prispevajo k progresivni izgubi kožne integritete. Vpliv teh procesov se čuti pri strukturni stabilnosti kože ter njeni fiziološki funkciji (5). Pri nekaterih ljudeh se koža stara opazno hitreje. To lahko opazimo pri kadilcih. Hitrost staranja se poveča tudi pri izpostavitvi sončni svetlobi ter pri ženskah po menopavzi, ko se zmanjša količina estrogenov (1).

Intrinzično staranje kože je opazno predvsem v manjši kapaciteti antioksidantov v koži. Posledica tega je več poškodb, ki se prenašajo na naslednje generacije celic, kar vodi do vidnih sprememb. Od ekstrinzičnih dejavnikov je najpomembnejše UV sevanje, ki je tudi najbolj proučeno. Je del svetlobe, ki do nas pride od sonca. UV spekter delimo na tri dele, glede na valovno dolžino:

- UVC (100 - 280 nm)
- UVB (280 - 315 nm)
- UVA (315 - 400 nm)

UVC svetloba ne pride do površine zemlje, saj se absorbira v ozonski plasti. Na področjih, kjer je ozonska plast tanjša, lahko preide do površine zemlje tudi del UVC svetlobe. To je zelo nevarno, saj ima ta del UV spektra najvišjo energijo in lahko brez težav cepi kovalentne vezi in razgrajuje organske molekule. UVB svetloba prodre do površine Zemlje in neposredno poškoduje kožo. Ker jo DNA dobro absorbira, povzroči poškodbe predvsem

na njeni strukturi. UVA svetloba ne povzroča cepljenja kovalentnih vezi, saj nima zadostne energije. Povzroča nastajanje reaktivnih spojin in tako posredno povzroča poškodbe in staranje kože. Večina UV svetlobe se absorbira v povrhnjici. Majhen del UVB svetlobe prodre do usnjice, medtem ko UVA seže tudi do podkožja (4).

S starostjo povezane fiziološke spremembe pri starejši koži vključujejo tako klinične, histološke in biokemične spremembe, kot tudi spremembe v videzu, barierni funkciji, celjenju ran in večji možnosti za razvoj benignih in rakavih obolenj (1).

Najopaznejša sprememba kože zaradi staranja je pojavnost gub. Zmanjšajo se elastičnost kože, obseg proliferacije celic povrhnjice ter rast dlak in nohtov. Starejša koža ima spremenjeno sestavo lipidov, katerih količina je zmanjšana. Posledica tega je groba in suha koža, ki je nagnjena k iritaciji in rdečici, kar prispeva k motnjam barierne funkcije kože. Zmanjšana barierna sposobnost starejše kože spremeni penetracijo snovi in lahko pride do vnetnih odzivov. Zmanjša se tudi izločanje lojnih in znojnih žlez. Povečana degeneracija in disorganizacija kapilar in majhnih žil inducira spremembe v cirkulaciji in termoregulacijski funkciji, kar lahko vodi do hipotermije. Starejša koža je bolj ranljiva na okoljske poškodbe, saj ima zmanjšano sposobnost celjenja ran in reepitelizacije, kar rezultira v povečani možnosti za pojav različnih kožnih stanj in bolezni, kot so ekcem, kontaktni in alergijski dermatitis, avtoimunske bolezni in številne druge (1,5).

Na različnih predelih telesa lahko opazujemo različne oblike staranja kože glede na glavni dejavnik, ki je staranje povzročil. Tako lahko na predelih kože, ki so bili večino časa zavarovani pred zunanjimi vplivi in predvsem pred UV sevanjem, opazujemo posledice intrinzičnega staranja kože. Intrinzično starana koža je videti suha in bleda z gubami, ki so posledica gravitacije oziroma konformacijskih sil. Opazna je transparentnost kože, skozi katero presevajo spodaj ležeče žilne strukture. Pri starejših ljudeh, ki so bili kronično izpostavljeni soncu, lahko predvsem na obrazu in rokah opazamo posledice ekstrinzičnega staranja (1, 5). Ta del staranja lahko prispeva tudi do 90% vseh vidnih učinkov staranja (6). Ekstrinzično starana koža se pojavi v dveh oblikah fotostaranja kože: atrofijski ali hiperproliferativni. Pri atrofijski obliki so vidne majhne gube s številnimi teleangiektazijami (razširjenimi žilicami) na predelih kože, ki so bili intenzivno izpostavljeni soncu. Hiperproliferativna oblika fotostaranja kože pa je debelejša z usnjenim videzom in globljimi gubami (1,5).

1.3 Antioksidanti

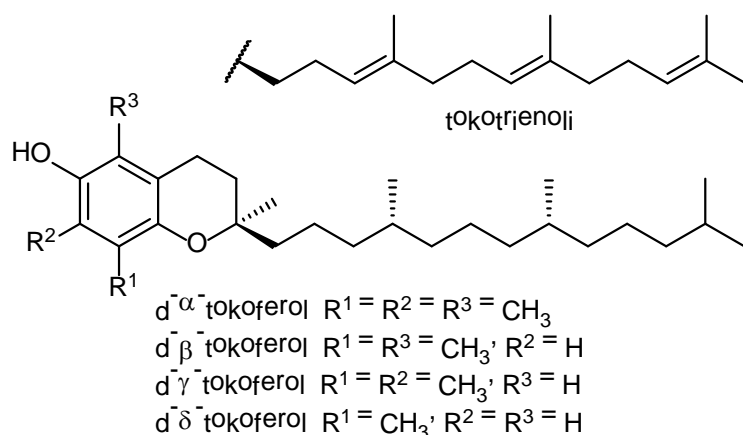
Za normalno celično delovanje je nujno potrebno ravnovesje med tvorbo radikalov in njihovim odstranjevanjem. Ob porušenju tega ravnotežja pride do oksidativnega stresa, ki vodi v poškodbe celic. Za varovanje pred oksidativnim stresom so celice opremljene z zapletenim sistemom antioksidantov in encimov, ki delujejo kot omrežje. Antioksidanti so snovi, ki lahko preprečijo nastajanje primarnih radikalov, upočasnijo ali ustavijo radikalno sprožene oksidacije. Žrtvujejo se v reakciji z radikali. Nov radikal, ki nastane iz antioksidanta, je stabilnejši in navadno ne more več tvoriti novih radikalov. Antioksidanti so torej spojine, ki ponudijo vodikov atom, oziroma nudijo dvojne vezi, na katere se adirajo radikali. Nizko molekularni antioksidanti, kot so vitamin E, vitamin C (askorbinska kislina), glutathion in ubikinon delujejo v celicah vzajemno z antioksidantnimi encimi, kot so glutathion-reduktaze in peroksidaze, superoksid-dizmutaze in katalaze. Antioksidantni encimi katalizirajo pretvorbe nekaterih reaktivnih spojin v manj reaktivne spojine oziroma obnavljajo antioksidante v antioksidativni mreži. Primer take mreže: vitamin E reagira z radikalom tako, da mu odda vodikov atom. Pri tem nastane radikal na vitaminu E, ki ga reducira vitamin C ali ubikinol. Nastali radikal reducira lipojska kislina ali glutathion, ki se s pomočjo glutathion-reduktaze ob porabi molekule NADPH ponovno regenerira. Pri tem ne nastaja nov radikal in tako se mreža zaključi. Antioksidativna mreža ima veliko prednosti, kot če bi vsak antioksidant deloval sam. Pri mreži že relativno majhne koncentracije antioksidantov učinkovito delujejo proti radikalom. Po reakciji z radikalom antioksidant sam postane radikal. Zaradi mreže hitro reagira naprej z drugimi antioksidanti in ne more reagirati s celičnimi sestavinami in jih poškodovati (1, 3, 4).

Človeška koža vsebuje lipofilne antioksidante: vitamin E, koencim Q₁₀ (ubikinon) in karotenoide, prav tako pa tudi hidrofilne antioksidante: vitamin C, sečno kislino in glutathion. Več antioksidantov je v povrhnjici kot v usnjici. Nekateri so prisotni tudi v roženi plasti. Razporeditev antioksidantov v roženi plasti ni enakomerna. Koncentracija je najvišja v nižjih plasteh in se zmanjšuje proti površini kože. To lahko razložimo s tem, da se celice rožene plasti pomikajo navzgor, saj se spodaj nadomestijo z novo diferenciranimi keratinociti. Poleg tega so antioksidanti občutljivi na UV svetlobo. Ob kronični in akutni izpostavitvi UV svetlobi se njihova količina opazno zmanjša, kar je še bolj opazno v višjih plasteh kože. Kot antioksidant ima v povrhnjici velik pomen tudi skvalen, ki se na površino izloča s sebumom (7).

1.4 Antioksidanti v kozmetičnih izdelkih

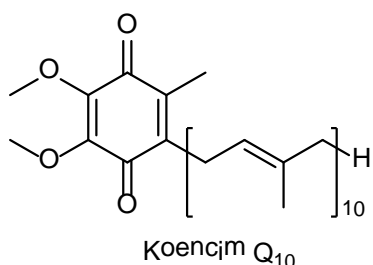
Antioksidanti so zelo priljubljene sestavine kozmetičnih izdelkov. V njih lahko delujejo kot tehnični antioksidanti ali kot kozmetično aktivne sestavine. Tehnični antioksidanti so dodani predvsem za zaščito na oksidacijo občutljivih sestavin. V izdelkih proti staranju pa so antioksidanti dodani kot kozmetično aktivne sestavine. Antioksidanti, ki jih nanesemo dermalno, lahko nevtralizirajo posledice, ki jih povzročijo reaktivne spojine in posledično preprečijo znake staranja. Za dermalen nanos sta zelo pomembni stabilnost in absorpcija antioksidantov, kar moramo upoštevati že pri formuliranju izdelkov. Večina antioksidantov je nestabilnih, hitro lahko oksidirajo in postanejo neaktivni, še preden pridejo do mesta delovanja. Morajo se tudi dobro absorbirati, da dosežejo želena mesta in tam učinkujejo. Najpogostejši antioksidanti, ki jih uporabljamo v kozmetičnih izdelkih so: vitamin E, koencim Q₁₀, vitamin C ter različni rastlinski izvlečki (8).

Vitamin E je izraz, s katerim poimenujemo skupino antioksidantov, ki jo sestavljajo tokoferoli (α -, β -, γ - in δ -) ter tokotrienoli (α -, β -, γ - in δ -). Njihova struktura je predstavljena na sliki 1. Vsi so topni v lipidih. Najbolj aktiven antioksidant je α -tokoferol. Vitamin E je naravno prisoten v koži, najdemo pa ga tudi v zelenjavi, semenih in mesu (8). Učinki vitamina E so dobro poznani, saj so z njim izvedli veliko študij na živalih ter tudi na ljudeh. Aplikacija vitamina E pred izpostavitvijo UV sevanju zmanjša akutni odgovor kože, ki se kaže kot eritem in edem, sončne opekline. Zmanjša tudi obseg lipidne peroksidacije in poškodb DNA (7). Ker je sam vitamin E dokaj nestabilen, v kozmetiki uporabljamo tudi estre vitamina E, ki dobro prehajajo kožo in so tudi bolj stabilni. Za izkazovanje učinka se morajo v koži hidrolizirati do aktivne oblike vitamina E (9).



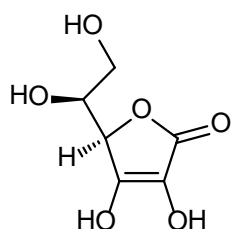
Slika 1: Struktura tokoferolov in tokotrienolov

Koencim Q₁₀ ali ubikinon je lipidotopen antioksidant (njegova struktura je predstavljena na sliki 2), ki je v človeških celicah del dihalne verige. Najdemo ga tudi v hrani (8). Prisoten je v večini celic v telesu, saj lahko reagira z reaktivnimi spojinami. Njegove količine zmanjša izpostavitve UV sevanju (9).



Slika 2: Struktura koencima Q₁₀

Vitamin C ali askorbinska kislina (njena struktura je predstavljena na sliki 3) je esencialna komponenta kože, ki jo v telo vnašamo s hrano, saj smo v procesu evolucije izgubili sposobnost, da bi jo naše telo izdelalo samo (8). Deluje kot antioksidant, poleg tega tudi spodbuja sintezo kolagena oziroma je kofaktor nekaterih pomembnih encimov. Deluje tudi kot inhibitor tirozinaze, za kar ga uporabljamo v izdelkih za posvetlitev kože (6). Čist vitamin C je zelo nestabilen, hitro oksidira in je neaktiven ob izpostavitvi zraku. Zaradi svoje hidrofilitosti težko prodira v kožo. Zaradi teh lastnosti v kozmetičnih izdelkih pogosto zasledimo estre vitamina C (10). Najpogostejša sta askorbilpalmitat in magnezijev askorbilfosfat. Askorbilpalmitat je topen v lipidih in stabilen v kozmetičnih formulacijah pri nevtralnem pH. Deluje kot antioksidant in zmanjša vnetje. Magnezijev L-askorbilfosfat je stabilen v nekislih raztopinah. V koži poteče njegova hidroliza s fosfatazami do askorbinske kisline. L-askorbinska kislina je najbolj bioaktivna oblika vitamina C. Je topna v vodi in mora biti za stabilnost vgrajena pri nizkem pH. Deluje kot antioksidant, ki lahko donira dva elektrona (9).



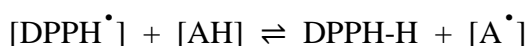
L-askorbinska kislina

Slika 3: Struktura L-askorbinske kisline

V kozmetičnih izdelkih so zelo pogosti tudi različni naravni izvlečki, ki imajo velikokrat antioksidativno delovanje. Najpogostejši so izvlečki čajevca, kavovca, granatnega jabolka ter grozdja. Glavne sestavine, odgovorne za antioksidativno delovanje, so polifenoli. Vsebujejo hidroksilne skupine, ki lahko donirajo elektrone ali vodikove atome. V rastlinah imajo različne funkcije. Med drugim jih varujejo pred poškodbami povzročenimi z UV sevanjem ter jim nudijo antioksidativno zaščito pred radikali, ki se tvorijo med procesom fotosinteze (4, 8).

1.5 DPPH metoda

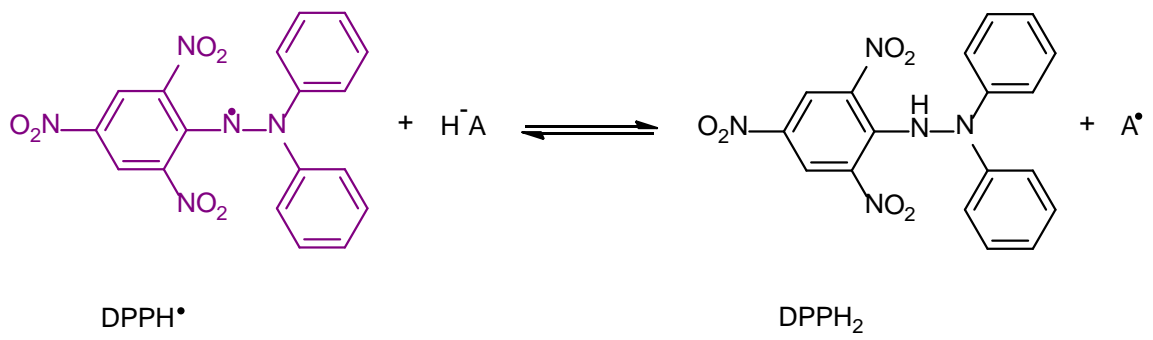
Za ugotavljanje antioksidativnih lastnosti različnih spojin najpogosteje uporabljamo metodo DPPH. Je ena izmed standardnih in relativno preprostih kolorimetrijskih metod. Pogosto jo uporabljamo za merjenje vsebnosti antioksidativnih snovi v različnih pripravkih v topilih kot so etanol, aceton, metanol ali benzen. DPPH oziroma 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil je stabilen radikal, ki ima nesparjen valenčni elektron na enem atomu dušika. V raztopini metanola, ki jo obarva vijolično, ima absorpcijski maksimum pri 517 nm. Ta metoda temelji na tem, da DPPH sprejme vodikov atom, ki ga odda molekula antioksidanta (enačba 4, slika 4). Poteče redukcija DPPH^\bullet do DPPH_2 in vijolična barva se spremeni v rumeno s sočasnim znižanjem absorbance pri valovni dolžini 517 nm. Spremembo barve spremljamo spektrofotometrijsko.



Enačba 4: Reakcija DPPH radikala z antioksidantom

Iz antioksidanta nastane manj reaktiven radikal, ki lahko reagira naprej z drugim radikalom antioksidanta ali pa z DPPH radikalom.

Pri DPPH metodi ugotavljamo vrednost efektivne koncentracije EC_{50} . EC_{50} je definirana kot potrebna koncentracija antioksidanta, ki zmanjša koncentracijo DPPH radikala za 50% oziroma kot količina antioksidanta, ki je potrebna, da se absorbanca DPPH radikala zmanjša na 50% prvotne absorbance (11, 12, 13)



Slika 4: Reakcija DPPH radikala z antioksidantom H-A.

2 NAMEN

V diplomski nalogi bomo ugotavljali kapaciteto antioksidantov v 10 kozmetičnih izdelkih za telo oziroma obraz. To so: Natural lift vlažilni serum proti gubam (Afrodita), Amazing Reichhaltige Body Milk mleko za telo (Aldo Vandini), Body Milk intensive care mleko za telo (Dahlia), Après Lotion Schisandra losjon za nego kože po sončenju s shizandro (Alverde), Anti Age Straffende Sonnenmilch učvrstitveno mleko za zaščito pred soncem (Sundance), Apilana Face krema za obraz (Medex), Müller Cadea Vera 2 in 1 gel za umivanje + odstranjevalec očesnih ličil, Snow Cladonia Day Cream dnevna krema za pomlajevanje in lifting obraza (Natura Siberica), Body Milk Firming učvrstitveno mleko za telo (Nivea), Argan krema proti gubam za predele okrog oči (Sans Soucis). Vsi izdelki so dostopni in kupljeni na slovenskem trgu.

Večina kozmetičnih izdelkov ima antioksidante podane že med sestavinami (antioksidante bomo označili krepko), nekateri pa ne. Pričakujemo, da bodo izdelki z več dodanimi antioksidanti pokazali večjo antioksidativno kapaciteto od izdelkov, ki antioksidantov nimajo dodanih. V izdelkih je dodanih tudi veliko rastlinskih izvlečkov, za katere bomo s pomočjo literature ugotovili, ali vsebujejo snovi z antioksidativnim delovanjem in ali pripomorejo k večji antioksidativni kapaciteti izdelka (te sestavine bomo označili ležeče). Pričakujemo tudi, da bodo izdelki, ki imajo antioksidante navedene med zadnjimi na spisku sestavin, izkazovali manjšo antioksidativno kapaciteto.

Za ugotavljanje kapacitete antioksidantov bomo uporabili metodo redukcije DPPH radikala. Rezultate bomo podali v grafični obliki, kjer bomo spremljali delež nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije kozmetičnega izdelka. S pomočjo teh grafov bomo nato za vsak izdelek ugotovili EC_{50} . Na koncu bomo poskušali razložiti, zakaj je vrednost EC_{50} velika oziroma majhna, katere sestavine izdelka so zato odgovorne in izdelke tako vrednotili.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Izbrani kozmetični izdelki in njihove sestavine

Za našo analizo smo izbrali 10 kozmetičnih izdelkov različnih blagovnih znamk, ki jih lahko vidimo na sliki 5. Večino smo izbrali, ker smo jih uporabljali doma in so vsebovali različne antioksidante. Dodatno smo izbrali še izdelka Snow Cladonia Day Cream (Natura Sibirica) in Argan (Sans Soucis), saj sta vsebovala zelo zanimive sestavine ter izdelka slovenskih proizvajalcev Apilana face (Medex) in Natural lift (Afrodita).



Slika 5: Izbrani kozmetični izdelki

1. Natural lift vlažilni serum proti gubam (Afrodita)

Opis delovanja kozmetičnega izdelka: »Patentirane mikrosfere morskega kolagena v zgornjih plasteh epidermisa intenzivno vežejo nase vlago, ki bi sicer iz kože izhlapela in nabreknejo v opazno večji volumen. Rezultati po 1 uri: globina gub in gubic se zapolni, površina kože postane enakomerna. Koža je odlično navlažena (14).«

Sestavine: Aqua, Pentylene Glycol, Propylheptyl Caprylate, *Helianthus Annuus Seed Oil*, Hydrogenated Polyisobutene, Hydrogenated Polydecene, Hydrogenated C6-14 Olefin Polymer, Glyceryl Stearate Citrate, Dicaprylyl Carbonate, Sodium Dihydroxycetyl Phosphate, *Aloe Barbadosis Gel*, Glycerin, Beta Glucan, Pentaerythrityl Tetraisoostearate, Silica Dimethyl Silylate, Sodium Chondroitin Sulfate, Atelocollagen, Dicaprylyl Ether,

Panthenol, Pectin, *Simmondsia Chinensis Oil*, Allantoin, Bisabolol, *Vigna Aconitifolia Seed Extract*, Sodium Citrate, Propylene Glycol, *Ginkgo Biloba Leaf Extract*, Glucose, Lactic Acid, Xanthan Gum, Stearyl Alcohol, Cetyl Alcohol, Disodium EDTA, **BHT**, **Ascorbyl Palmitate**, Glyceryl Stearate, Citric Acid, Parfum

2. **Amazing Reichhaltige Body Milk** mleko za telo (Aldo Vandini)

Opis delovanja kozmetičnega izdelka: »Senzacionalno obogateno mleko za telo z vonjem črne olive in granatnega jabolka kožo regenerira, navlaži in jo razvaja (15).«

Sestavine: Aqua, Glycerin, Helianthus Annuus Hybrid Oil, *Butyrospermum Parkii Butter*, Cyclopentasiloxane, Dicaprylyl Ether, Dimethicone, Isopropyl Palmitate, Cetearyl Alcohol, Glyceryl Stearate, Pentaerythrityl Distearate, *Olea Europaea Fruit Oil*, Phenoxyethanol, Panthenol, Parfum, Benzyl Alcohol, Sodium Stearoyl Glutamate, **Tocopheryl Acetate**, Allantoin, Carbomer, Linalool, Alcohol, Citronellol, Benzyl Salicylate, Limonene, *Punica Granatum Fruit Extract*, Sodium Hydroxide, Geraniol

3. **Body Milk intensive care** mleko za telo (Dahlia)

Opis delovanja kozmetičnega izdelka: »Hranljivo mleko za telo, ki zaradi bogate kremaste strukture globinsko vlaži kožo. Mleko vsebuje vitamin E, mandljevo in canola olje. Ob redni porabi mleka za telo bo vaša koža bolj zdrava, mehkejša in bolj nežna. Hitro se vpije v kožo in ne pušča odvečne maščobe. Namenjeno za suho kožo (16).«

Sestavine: Aqua, Ethylhexyl Cocoate, Octyldodecanol, Cetearyl Isononanoate, Glycerin, Polyglyceryl-2 Dipolyhydroxystearate, PEG-30 Dipolyhydroxystearate, Olus Oil, Polyglyceryl-3 Diisostearate, Magnesium Sulfate, Phenoxyethanol, Methylparaben, Butylparaben, Zinc Stearate, *Prunus Amygdalus Dulcis oil*, **Tocopheryl Acetate**, Ethylparaben, PEG-8, **Tocopherol**, **Ascorbyl Palmitate**, **Ascorbic Acid**, Isobutylparaben, Citric Acid, Propylparaben, Disodium EDTA, Parfum

4. Après Lotion Schisandra losjon za nego kože po sončenju s shizandro (Alverde, Dm)
Opis delovanja kozmetičnega izdelka: »Losjon z ekstraktom sadeža shizandre, aloe vero, glicerolom in naravno jabolčno vodo pomiri kožo in jo intenzivno vlaži. Vitamin E kožo ščiti pred prostimi radikali in jo tako zaščiti pred predčasnim, s svetlobo pogojenim staranjem kože. Olje breskovih pečk in karitejevo maslo kožo negujeta, zato je koža mehka in voljna (17).«

Sestavine: Aqua, Glycerin, *Pyrus Malus Fruit Water*, Decyl Oleate, Alcohol, Glyceryl Stearate Citrate, *Prunus Persica Kernel Oil*, Cetearyl Alcohol, Cetearyl Glucoside, Shorea Stenoptera Seed Butter, Xanthan Gum, Levulinic Acid, **Tocopherol**, Glyceryl Caprylate, Parfum, Palmitic Acid, Stearic Acid, Sodium Levulinate, p-Anisic Acid, *Schizandra Sphenanthera Fruit Extract*, *Helianthus Annuus Seed Oil*, Sodium Hydroxide, *Aloe Barbadensis Leaf Juice Powder*, Geraniol, Citronellol, Citral, Anise Alcohol, Limonene, Hydrogenated Palm Glycerides Citrate, Citric Acid

5. Anti Age Straffende Sonnenmilch učvrstitveno mleko za zaščito pred soncem (Sundance, Dm)

Opis delovanja kozmetičnega izdelka: »Mleko za zaščito pred soncem z zaščitnim faktorjem 30 varuje kožo prev UVA in UVB žarki. Vsebuje vitamin E in ekstrakt planike, ki varujeta celične strukture pred poškodbami, povzročenimi zaradi UV sevanja ter glicerol in pantenol, ki kožo vlažita (18).«

Sestavine: Aqua, Alcohol denat., Glycerin, Diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate, C12-15 alkylbenzoate, Titanium dioxide (nano), Ethylhexyl salicylate, Ethylhexyl benzoate, Diethylhexyl butamido triazone, **Tocopheryl acetate**, Vp/hexadecene copolymer, Silica, Panthenol, Triacantanyl pvp, Caprylyl glycol, Parfum, Acrylates/c10-30 alkyl acrylate crosspolymer, Ethylhexylglycerin, Dimethicone, Sodium hydroxide, Carbomer, Xanthan gum, Disodium edta, *Leontopodium alpinum extract*, Benzoic acid, **Tocopherol**.

6. **Apilana Face** krema za obraz (Medex)

Opis delovanja kozmetičnega izdelka: »Krema je primerna za nego suhe, zelo suhe in občutljive kože obraza. Spodbuja naravno delovanje kože, podpira sposobnost obnavljanja in izboljša njeno strukturo. Apilana face neguje suho in izsušeno kožo ter jo ohranja zdravo in lepo (19).«

Sestavine: Aqua, *Helianthus Annuus Seed Oil*, Lanolin, *Butyrospermum Parkii Butter*, Cera Alba, Octyldodecanol, *Passiflora Incarnata Seed Oil*, *Theobroma Cacao Seed Butter*, Dicaprylyl Carbonate, *Royal Jelly*, *Triticum Vulgare Seed Extract*, Potassium Sorbate, *Rosmarinus Officinalis Leaf Extract*, Olus Oil, Parfum, Linalool

7. **2in1 Waschgel + Augen Make-up Entferner** 2v1 gel za umivanje + odstranjevalec očesnih ličil (CadeaVera, Müller)

Opis delovanja kozmetičnega izdelka: »Z ekstraktom granatnega jabolka in ekstraktom kislice. Za vse tipe kože. Blaga formula temeljito odstrani umazanijo, ličila ter odvečen loj. Pusti svež in svilnat občutek na koži (20).«

Sestavine: Aqua, Coco-glucoside, Cocamidopropyl betaine, Caprylyl/capryl glucoside, Acrylates/C10-30 alkyl, acrylate cross polymer, Sodium chloride, Phenoxyethanol, Panthenol, Parfum, Sodium hidroksid, Glycerin, Ehtylhexylglycerin, Disodium edta, *Rumex acetosa leaf extract*, Alcohol, Linalool, Buthyl phenyl methylpropional, *Punica granatum fruit extract*, Tris (tetramethylhydroxypiperdinol) citrate, Pantolactone, Potassium sorbate, Citric Acid, Sorbic acid, CI 42090

8. **Snow Cladonia Day Cream** dnevna krema za pomlajevanje in lifting obraza (Natura Siberica)

Opis delovanja kozmetičnega izdelka: »Dnevna krema Snežna kladonija za zrelo kožo obnavlja celice v koži in upočasnjuje staranje, kar daje koži sijoč in mlad izgled (21).«

Sestavine: Aqua, Coco-Caprylate/Caprinate, Ethylhexyl Methoxycinnamate, Cetearyl Alcohol, Cetearyl Glucoside, Glyceryl Stearate, Glycerin, Hexyl Benzoate Diethylamino Hydroxybenzoyl, Bis - Methoxyphenyl Triazine Ethylhexyloxyphenol, *Prunus Persica Leaf Extract*, Sodium Stearoyl Glutamate, **Tocopherol**, Sodium Hyaluronate, Xanthan

Gum, Hydrolyzed Wheat Protein, *Pinus Sibirica Seed Oil Polyglyceryl -6 Esters*, *Triticum Vulgare (Wheat) Germ Oil*, Parfum, *Spiraea ulmaria Extract*, *Cetraria Nivalis Extract*, *Pinus Pumila Needle Extract*, *Sorbus Sibirica Extract*, Citric Acid, Palmitoyl Tripeptide -5 dipeptide Diaminobutyroyl Benzylamide diacetate, *Calendula Officinalis Flower Extract*, *Avena Sativa Seed Extract*, Dehydroacetic Acid, Benzyl Alcohol, Sodium Benzoate, Potassium Sorbate, Ethylhexylglycerin, CI 75810, Corn Starch, CI 75125, CI 75130

9. Body Milk Firming učvrstitveno mleko za telo (Nivea)

Opis delovanja kozmetičnega izdelka: »Body Milk Firming učvrstitveno mleko za telo (Nivea) z naprednim »energijskim kompleksom«, ki vsebuje koencim Q10, kreatin in L-karnitin izboljša videz vaše kože: spodbuja obnavljanje kožnih celic, opazno izboljša čvrstost kože v dveh tednih, kožo intenzivno nahrani in jo zaščiti pred izsušitvijo, kožo poživi – za čudovit občutek na koži, ki polepša vaš dan (22)!«

Sestavine: Aqua, Paraffinum liquidum, Glycerin, C13-16 isoparaffin, C12-15 alkylbenzoate, Polyglyceryl-3, Cetearyl alcohol, Myristyl alcohol, **Ubiquinone**, Carnitine, Creatine, 1-methylhydantoin-2-imide, *Macadamia ternifolia seed oil*, Glyceryl glucoside, Sorbitan stearate, Cera microcristallina, Hydrogenated coco-glyceride, Dimethicone, Sodium carbomer, Benzoic acid, Ethylparaben, Methylparaben, Phenoxyethanol, Linalool, Citronello, Butylphenyl methylpropional, Benzyl alcohol, Alpha-isomethyl ionone, Limonene, Parfum

10. Argan krema proti gubam za predele okrog oči (Sans Soucis)

Opis delovanja kozmetičnega izdelka: »Krema proti gubam za predele okrog oči neguje in napenja kožo. Omili gubice okrog oči in kožo oskrbuje z vlago. Koža na predelih oči je videti bolj čvrsta (23).«

Sestavine: Aqua, Glycerin, *Prunus Armeniaca (Apricot) Kernel Oil*, Glyceryl Stearate Se, *Helianthus Annuus (Sunflower) Seed Oil*, Alcohol, **Squalane**, Hydrogenated Palm Kernel Glycerides Betaine, Caprylic/Capric Triglyceride, *Argania Spinosa Kernel Oil*, Decyl Oleate, Xanthan Gum, Sodium Stearoyl Lactylate, *Amaranthus Caudatus Seed Extract*, Lecithin, **Tocopherol**, Hydrogenated Palm Glycerides, *Spilanthes Acmella Flower Extract*,

Sodium Hyaluronate, Benzyl Alcohol, Sodium Benzoate, Potassium Sorbate, Parfum (Fragrance), Limonene, Benzyl Salicylate, Linalool, Citric Acid, Levulinic Acid, Sodium Levulinate, **Ascorbyl Palmitate**, **Ascorbic Acid**, Terpineol, *Rosmarinus Officinalis* (Rosemary) Leaf Extract

3.2 Kemikalije

- Metanol p. a.: Carlo Erba Reagents S.A.S.
- DPPH: Sigma-aldrich (St. Louis, USA)

3.3 Laboratorijska oprema in aparature:

- Analizna tehtnica Mettler Ae240S SNR P39666: Mettler-Toledo (Švica)
- Vodna kopel Büchi heating bath B-490
- Ultrazvočna kadička Sonis 3: Iskra Pio
- Vorteks Vibromix 114: Tehnica (Slovenija)
- Mini centrifuga GMC-060: LMS (Južna Koreja)
- UV VIS spektrofotometer Cary 50 Conc: Varian
- Avtomatske pipete Transferpette: Eppendorf
- Nastavki za pipete: Brand (Wertheim, Nemčija)
- Mikrocentrifugirke Eppendorf (2 mL): Eppendorf (Nemčija)
- Plastične kivete (1,5 mL): Brand (Wertheim, Nemčija)

3.4 Metoda

Antioksidativno kapaciteto izbranih izdelkov smo ugotavljali z metodo redukcije DPPH radikala. Molekula antioksidanta odda vodikov atom DPPH radikal, ki ga sprejme in nastane DPPH₂. Pri tem pride do spremembe barve in znižanja absorbance pri 517 nm. Za topilo smo uporabili metanol, v katerem smo pripravili 700 µM osnovno raztopino DPPH. V metanolu je raztopina vijolične barve, ob dodatku antioksidantov pa preide v rumeno barvo. Spremembo barve smo spremljali po inkubacijskem času 1,5 h spektrofotometrijsko pri absorpcijskem maksimumu DPPH, ki je pri 517 nm.

Izmerili smo absorbanco različno koncentriranih vzorcev kozmetičnega izdelka. Meritve smo prilegali premici in za vsak izdelek ugotovili vrednost EC_{50} . Dobljena manjša vrednost EC_{50} je pomenila večjo antioksidativno kapaciteto, medtem ko je višja dobljena vrednost EC_{50} pomenila manjšo antioksidativno kapaciteto, saj je bila v tem primeru za zmanjšanje koncentracije DPPH radikala na 50 % potrebna večja koncentracija izdelka (11, 12, 13).

4 EKSPERIMENTALNI DEL

4.1 Ugotavljanje gostote kozmetičnih izdelkov

Vsakemu kozmetičnemu izdelku smo najprej določili gostoto. Ta podatek smo potrebovali za kasnejši izračun volumna. Vsi podatki in izračunana gostota za vsak kozmetični izdelek so prikazani v prilogi 1.

Predhodno stehtan merilni valj (5 mL) smo napolnili s kozmetičnim izdelkom do približno 4 mL in valj spet stehtali. Maso izdelka v valju smo izračunali po enačbi 5:

$$m(\text{izdelek}) = m(\text{valj} + \text{izdelek}) - m(\text{valj})$$

Enačba 5: Masa izdelka

Nato smo izdelek v valju segreti na vodni kopeli do 60°C, da se je raztalil in da v njem ni bilo več zračnih mehurčkov. Po potrebi smo temperaturo tudi povišali, saj so se nekatere komponente izdelkov raztalile šele pri višjih temperaturah. Po ohlavitvi na sobno temperaturo smo iz merilne skale na valju razbrali volumen izdelka. Gostoto izdelka smo izračunali po enačbi:

$$\rho = m / V$$

Enačba 6: Izračun gostote

V primeru, da se izdelek ni raztalil niti pri 100°C, smo uporabili alternativno metodo za ugotavljanje gostote. V merilni valj smo odpipetirali 2 mL metanola in vse skupaj stehtali. Nato smo dodali še izdelek ter ponovno stehtali. Volumen izdelka smo odčitali od dviga metanola v merilnem valju. Pri tem smo upoštevali, da smo na začetku že imeli 2 mL metanola. Gostoto smo izračunali po enačbi 6.

4.2 Priprava raztopine DPPH

V 25 mL merilno bučko smo zatehtali 6,90 mg DPPH. Do $\frac{3}{4}$ volumna smo jo napolnili z metanolom in sonicirali v ultrazvočni kadički, dokler se niso raztopili vsi kristali DPPH. Nato smo z metanolom bučko dopolnili do oznake. Raztopino smo premešali, tako da smo zaprto bučko nekajkrat obrnili. Pripravljeno raztopino smo hranili v hladilniku, zavito v aluminijasto folijo.

Iz osnovne raztopine DPPH smo nato pripravili še delovno raztopino. To smo naredili z redčenjem. Odpipetirali smo 5 mL osnovne raztopine DPPH in ji dodali 20 mL metanola. Tudi to raztopino smo hranili v hladilniku, zaščiteno z aluminijasto folijo pred svetlobo.

4.3 Priprava vzorcev

V dvanajst 2 mL Eppendorf epruvet smo po dvakrat natančno natehtali približno 10, 20, 30, 60, 90 in 120 mg posameznega kozmetičnega izdelka. Prva serija šestih vzorcev nam je služila za ugotavljanje antioksidativne kapacitete, druga pa kot serija slepih vzorcev za ozadje pri merjenju absorbance. Iz zatehtanih mas in izmerjene gostote smo izračunali volumen vzorca kozmetičnega izdelka po enačbi 6. Nato smo preostanek volumna do 1 mL dopolnili z metanolom. Pri seriji vzorcev smo v epruvete dodali 1 mL delovne raztopine DPPH, pri seriji slepih vzorcev pa smo dodali 1 mL metanola.

4.4 Inkubacija vzorcev

Najprej smo vse epruvete z vzorci dobro premešali na vorteksu. Nato smo jih 15 minut segrevali na vodni kopeli pri 50 °C. Segrete vzorce smo potem inkubirali pri sobni temperaturi še približno eno uro. Po poteku tega časa, smo vzorce centrifugirali, da so se morebitni plavajoči delci izdelka posedli. Centrifugirali smo jih 3 minute pri 6600 obratih na minuto. Skupen inkubacijski čas je bil 1,5 h.

4.5 Merjenje absorbance

Računalniški program: Cary Win UV

Vrednost ozadja smo izmerili tako, da smo v 1,5 mL kiveto odpipetirali metanol in pomerili absorbanco. Za tem smo izmerili absorbanco delovne raztopine DPPH in metanola v razmerju 1:1. Odpipetirali smo 750 µL delovne raztopine DPPH in dodali 750 µL metanola. S tem smo dobili $A_{100\%}$, ki nam pove kakšna je vrednost absorbance, če v vzorec ne dodamo antioksidanta, torej nezreagirani DPPH. Nato smo izmerili absorbanco vzorcev in slepih vzorcev. Iz vsake epruvete smo odpipetirali 1,5 mL vzorca in ga prenesli

v plastično kivetu. Od vsake vrednosti A vzorca (A_v) smo odšteli vrednost A slepega vzorca (A_s) z enako količino kozmetičnega izdelka. S tem smo izničili morebiten vpliv drugih snovi, ki bi lahko bile topne v metanolu in bi lahko vplivale na absorbanco. Primer za vzorec z maso x mg kozmetičnega izdelka:

$$A_x = A_{v_x} - A_{s_x}$$

4.6 Območje linearnosti

Vse rezultate smo vnesli v računalniški program Excel in izrisali grafa odvisnosti absorbance od koncentracije ter deleža nezreagiranega DPPH v odvisnosti od koncentracije. Iz grafov smo izračunali enačbi premice ter R^2 . V primeru, da točke na grafu niso bile na linearni premici, smo mase izdelka, ki smo jih na začetku natehtali, ustrezno spremenili. Ponovili smo celoten postopek od priprave vzorcev naprej. Morali smo dobiti linearne odzive iz katerih smo lahko ugotovili vrednost EC_{50} .

4.7 Ugotavljanje vrednosti EC_{50}

Vse mase, ki smo jih zatehtali na začetku, smo po enačbi 7 preračunali v koncentracije. Volumen vzorcev je bil 2 mL.

$$m = c \cdot V$$

Enačba 7: Povezava mase, koncentracije in volumna

Delež nezreagiranega DPPH smo izračunali po enačbi 8

$$\text{Delež nezreagiranega DPPH} = A_x \cdot 100 \% / A_{100\%}$$

Enačba 8: Izračun deleža nezreagiranega DPPH

S pomočjo računalniškega programa Excel smo eksperimentalne podatke prilegali premici in izračunali parametra k in n premice z enačbo 9:

$$y = k \cdot c + n \text{ (pri čemer je } y = \text{delež nezreagiranega DPPH in } c = \text{koncentracija)}$$

Enačba 9: Enačba premice

Iz dobljene enačbe premice smo izračunali vrednost EC_{50} po enačbi 10 tako, da smo v enačbo premice za vrednost y vstavili vrednost 50.

$$50 = k \cdot c + n \rightarrow c_{50} = (50 - n)/k$$

Enačba 10: Izračun EC_{50}

Dobili smo koncentracijo pri kateri se delež nezreagiranega DPPH zmanjša na 50%. Nato smo izračunali še standardni odklon s pomočjo Excelove funkcije STEYX po enačbi na sliki 6. Rezultat smo zapisali kot vrednost $EC_{50} \pm$ standardni odklon.

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

Slika 6: Enačba za standardni odklon

5 REZULTATI

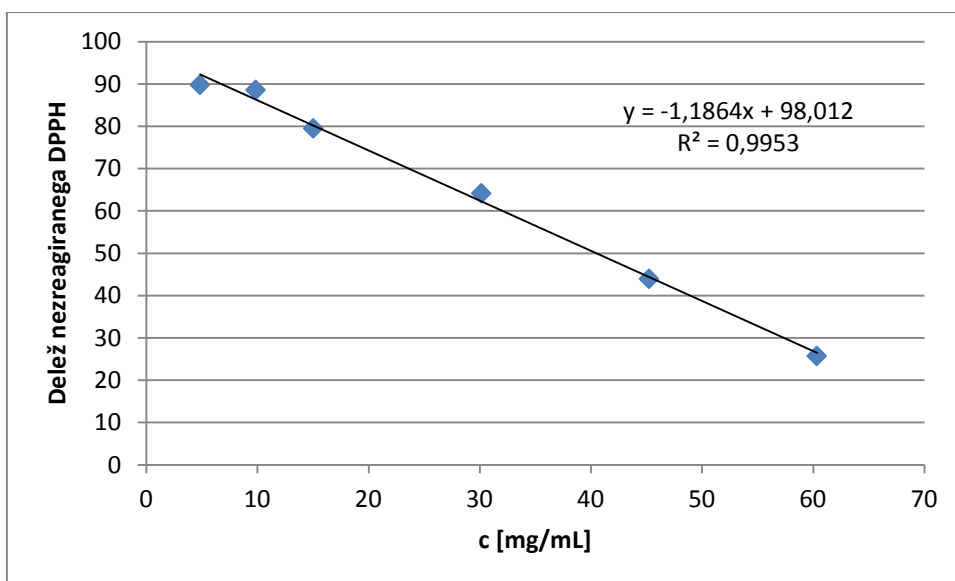
S pomočjo sestavin, navedenih na vsakem kozmetičnem izdelku in literature smo ugotovili število sestavin z antioksidantnim delovanjem v posameznem kozmetičnem izdelku. Rezultati so prikazani v preglednici I.

Preglednica I: Število sestavin z antioksidantnim delovanjem v posameznem kozmetičnem izdelku

Kozmetični izdelek	Število antioksidantov	Število sestavin rastlinskega izvora, ki tudi vsebujejo antioksidativne snovi	Skupaj
1. Natural lift	2	5	7
2. Amazing Reichhaltige Body Milk	1	3	4
3. Body Milk intensive care	4	1	5
4. Après lotion schisandra	1	5	6
5. Antiage Straffende Sonnenmilch	2	1	3
6. Apilana face	0	7	7
7. 2 in 1 Waschgel + Augen Make-up Entferner	0	2	2
8. Snow Cladonia Day Cream	1	9	10
9. Body Milk Firming	1	1	2
10. Argan	4	6	10

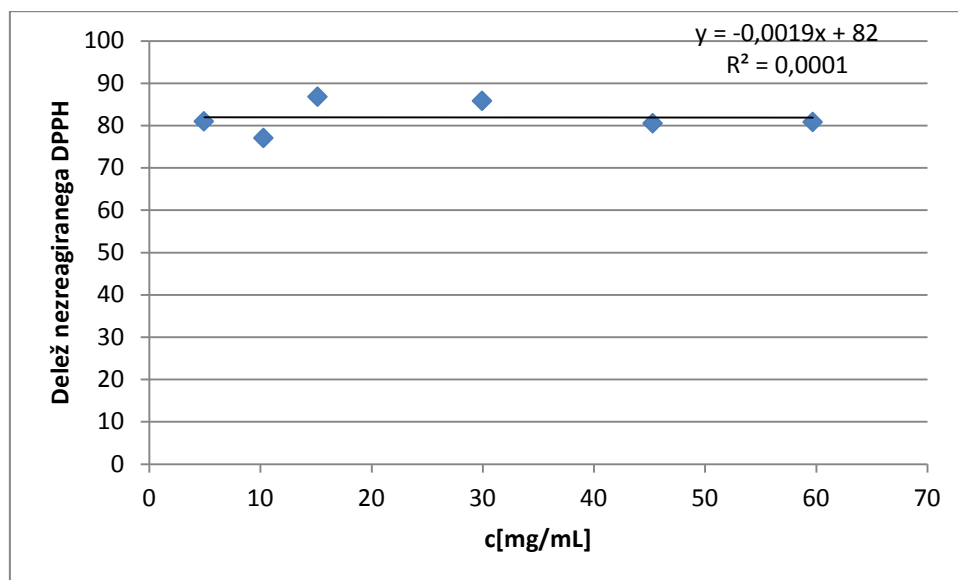
Po končanih meritvah smo dobljene rezultate vnesli v računalniški program Excel, s pomočjo katerega smo za vsak kozmetični izdelek narisali graf in izračunali EC_{50} . Rezultati za posamezni kozmetični izdelek so prikazani v grafih 1-10. Pri vsakem grafu je dopisana enačba premice, ki jo tvorijo točke ter R^2 . R^2 je statistično merilo, ki nam pove, kako dobro točke sovpadajo z linearno regresijo.

1. Natural lift vlažilni serum proti gubam (Afrodita)



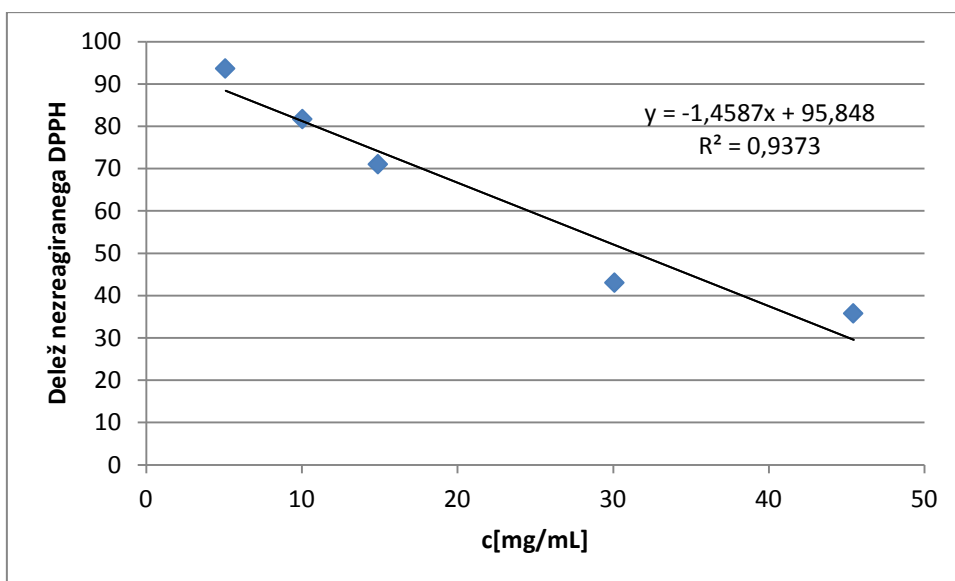
Graf 1: Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije za Natural lift (Afrodita)

2. Amazing Reichhaltige Body Milk mleko za telo (Aldo Vandini)



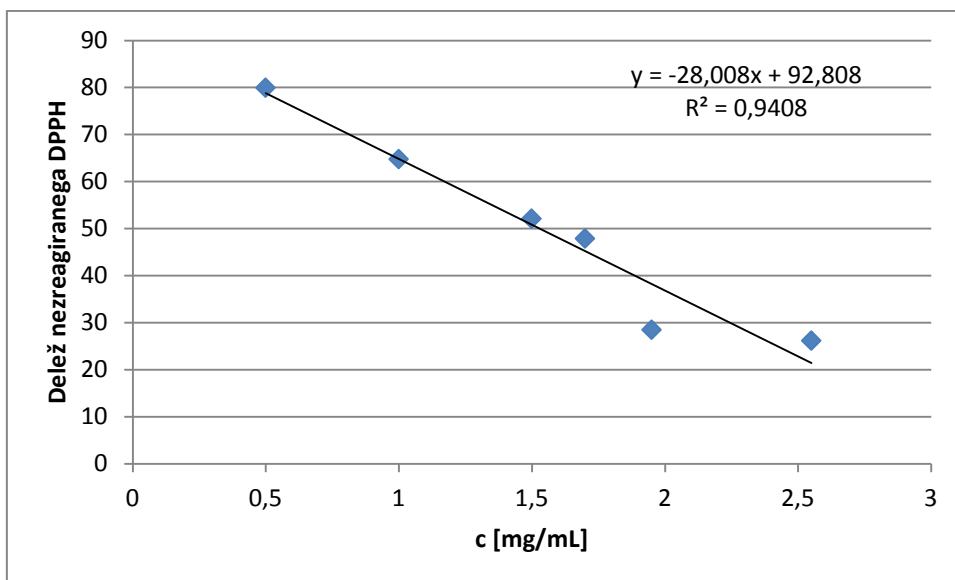
Graf 2: Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije za Amazing Reichhaltige Body Milk (Aldo Vandini)

3. Body Milk intensive care mleko za telo (Dahlia)



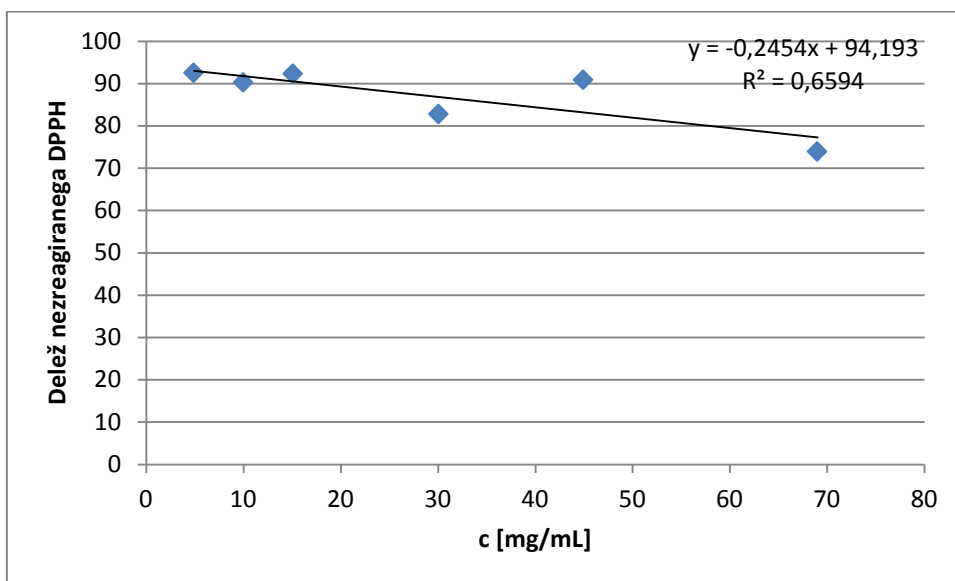
Graf 3: Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije za Body Milk intensive care (Dahlia)

4. Après Lotion Schisandra losjon za nego kože po sončenju s shizandro (Alverde, Dm)



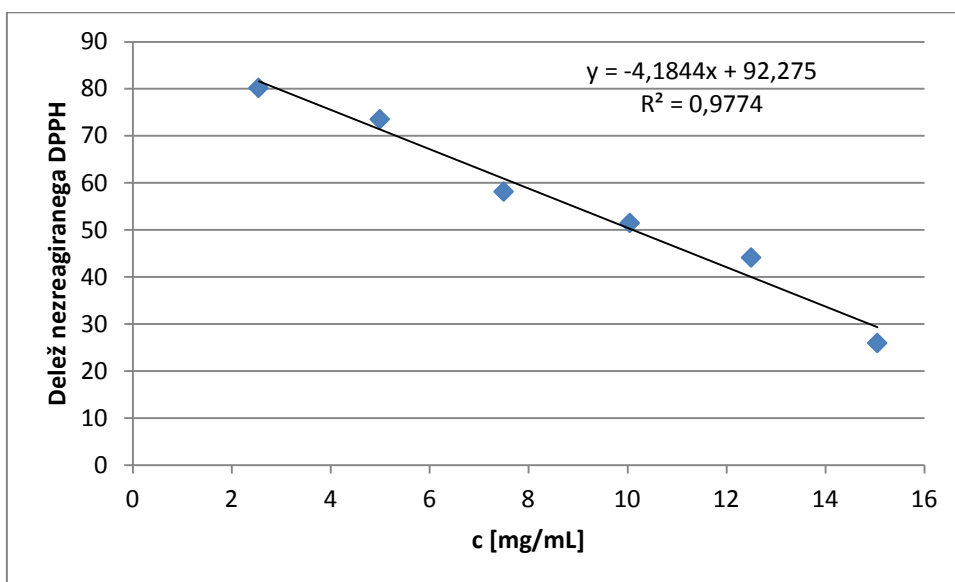
Graf 4: Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije za Après Lotion Schisandra (Alverde, Dm)

5. **Anti Age Straffende Sonnenmilch** učvrstitveno mleko za zaščito pred soncem
(Sundance, Dm)



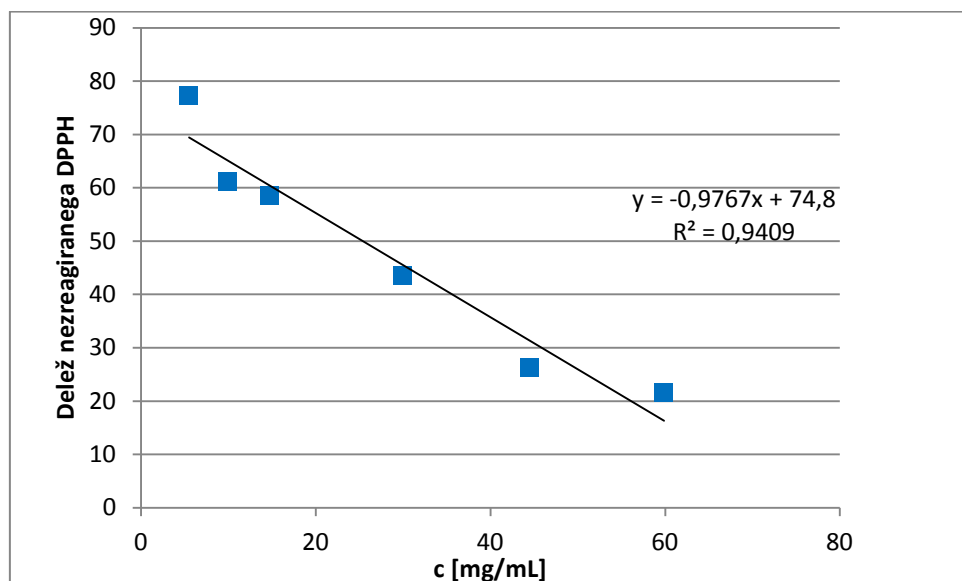
Graf 5: Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije za Anti Age Straffende Sonnenmilch (Sundance, Dm)

6. **Apilana Face** krema za obraz (Medex)



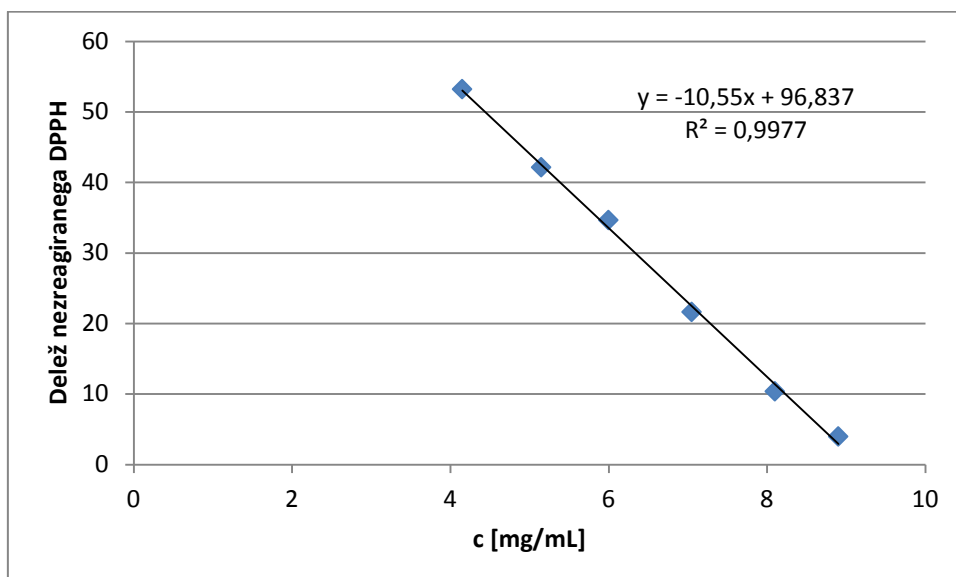
Graf 6: Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije za Apilana Face (Medex)

7. **2in1 Waschgel + Augen Make-up Entferner 2v1** gel za umivanje + odstranjevalec očesnih ličil (CadeaVera, Müller)



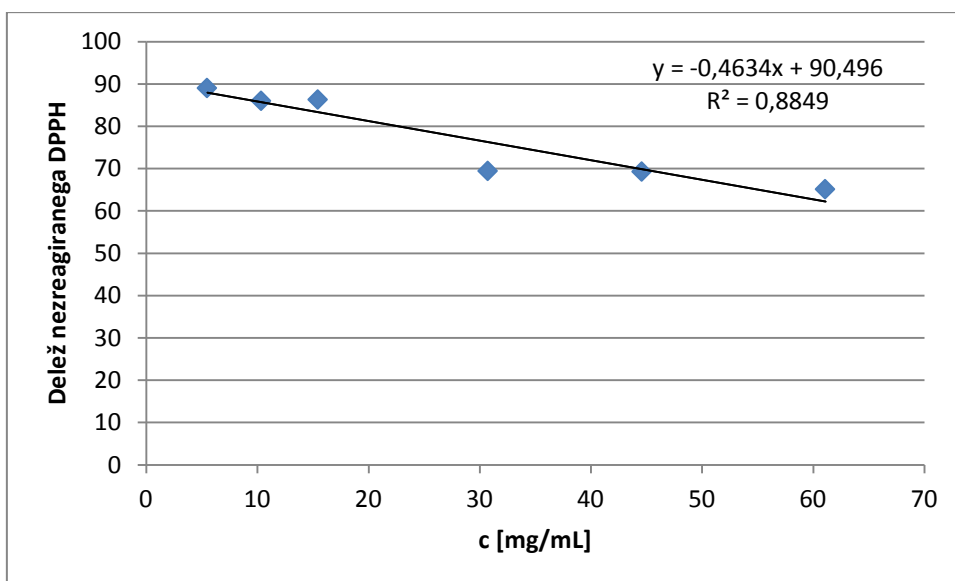
Graf 7: Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije za 2in1 Waschgel + Augen Make-up Entferner (CadeaVera, Müller)

8. **Snow Cladonia Day Cream** dnevna krema za pomlajevanje in lifting obraza (Natura Siberica)



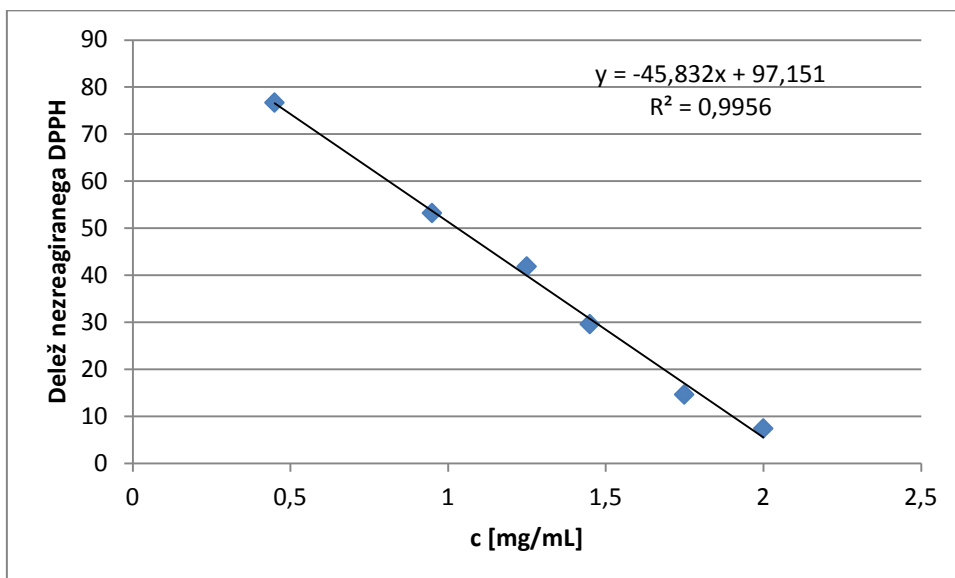
Graf 8: Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije za Snow Cladonia Day Cream (Natura Siberica)

9. Body Milk Firming učvrstitveno mleko za telo (Nivea)



Graf 9: Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije za Body Milk Firming (Nivea)

10. Argan krema proti gubam za predele okrog oči (Sans Soucis)

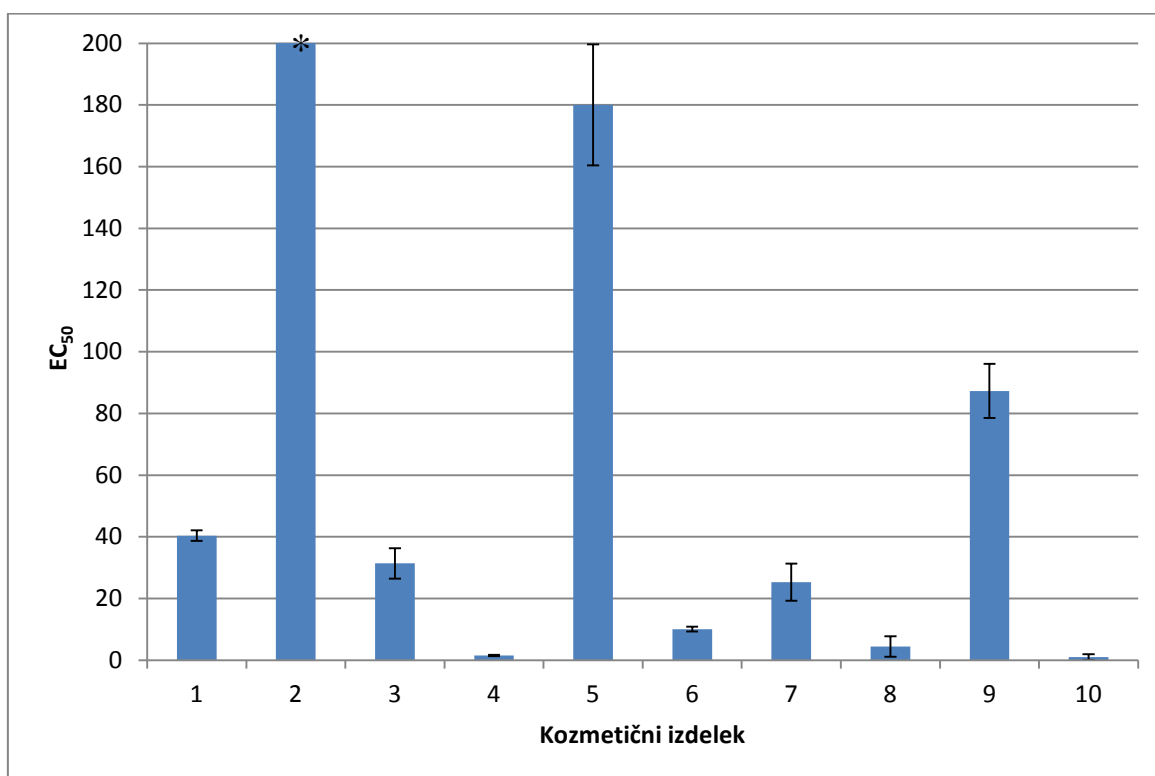


Graf 10: Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije za Argan (Sans Soucis)

Iz grafa delež nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije smo za vsak kozmetični izdelek izračunali vrednost EC_{50} . Rezultati so prikazani v preglednici II in grafu 11.

Preglednica II: Dobljene vrednosti EC₅₀ za posamezni kozmetični izdelek.

Kozmetični izdelek	EC ₅₀ ± SD [mg/mL]
1	40,4 ± 1,68
2	/
3	31,4 ± 4,93
4	1,53 ± 0,200
5	180 ± 19,6
6	10,1 ± 0,790
7	25,3 ± 6,01
8	4,44 ± 3,32
9	87,3 ± 8,75
10	1,03 ± 0,910



Graf 11: Dobljene vrednosti EC₅₀ za posamezni kozmetični izdelek s standardnim odklonom

*Pri najvišji izmerjeni koncentraciji (200 mg/mL) kozmetični izdelek ne izkazuje antioksidativnega delovanja.

Glede na vsebnost antioksidantov, upoštevajoč dobljeno vrednost EC_{50} , smo kozmetične izdelke razvrstili po padajoči antioksidativni kapaciteti.

1. mesto: Argan krema proti gubam za predele okrog oči (Sans Soucis)
2. mesto: Après Lotion Schisandra losjon za nego kože po sončenju s shizandro (Alverde, dm)
3. mesto: Snow Cladonia Day Cream dnevna krema za pomlajevanje in lifting obraza (Natura Siberica)
4. mesto: Apilana Face krema za obraz (Medex)
5. mesto: 2in1 Waschgel + Augen Make-up Entferner 2v1 gel za umivanje + odstranjevalec očesnih ličil (CadeaVera, Müller)
6. mesto: Body Milk intensive care mleko za telo (Dahlia)
7. mesto: Natural lift vlažilni serum proti gubam (Afrodita)
8. mesto: Body Milk Firming učvrstitveno mleko za telo (Nivea)
9. mesto: Anti Age Straffende Sonnenmilch učvrstitveno mleko za zaščito pred soncem (Sundance, dm)
10. mesto: Amazing Reichhaltige Body Milk mleko za telo (Aldo Vandini)

6 RAZPRAVA

Glede na število sestavin z antioksidantnim delovanjem, ki smo jih ugotovili za vsak kozmetični izdelek, smo ugotovili, da večje število teh sestavin ne pomeni nujno tudi višje antioksidativne kapacitete kozmetičnega izdelka. Presenetili so nas nekateri izdelki z manj antioksidativnimi sestavinami, ki so pokazali veliko antioksidativno kapaciteto, spet drugi pa so nas malo razočarali. V nadaljevanju bomo komentirali rezultate za vsak posamezni kozmetični izdelek.

1. **Natural lift** vlažilni serum proti gubam (Afrodita)

Za Afroditin kozmetični izdelek smo eksperimentalno ugotovili EC_{50} , ki je $40,4 \pm 1,68$ mg/mL. Ta vrednost ga uvršča na 7. mesto izmed desetih izbranih izdelkov. Kljub temu je EC_{50} , v primerjavi z izdelki, ki imajo manjšo sposobnost redukcije DPPH radikala, še vedno dokaj majhen. Če pogledamo sestavine kozmetičnega izdelka, lahko ugotovimo, da jih ima veliko antioksidativno delovanje. V izdelek sta dodana 2 antioksidanta: butilhidroksitoluen (BHT) in askorbilpalmitat ter 3 rastlinski izvlečki z antioksidantnim delovanjem. Gel *Aloe barbadensis* pridobivamo iz listov tropske rastline *Aloe vera*. Vsebuje veliko različnih polisaharidov, ki imajo antioksidativno delovanje (24). Izvleček zrn *Vigna aconitifolia* vsebuje fenole in tanine, ki imajo antioksidativno delovanje, saj reagirajo z radikali (25). Izvleček listov dvokrpega ginka (lat. *Ginkgo biloba*) vsebuje flavonoidne glukozide in biflavone, ki imajo dobro antioksidativno delovanje tudi v emulzijah olje v vodi, torej tudi v izdelku (26). Poleg tega v izdelku najdemo tudi sončnično olje (lat. *Helianthus annuus*), ki vsebuje vitamin E (27) ter jojobino olje (lat. *Simmondsia chinensis*), ki prav tako deluje antioksidantno. Izdelek lahko na podlagi rezultatov označimo kot soliden izdelek z zadovoljivo vsebnostjo antioksidantov.

2. **Amazing Reichhaltige Body Milk** mleko za telo (Aldo Vandini)

Pri mleku za telo Aldo Vandini nismo dobili vrednosti EC_{50} , saj se z višanjem koncentracije izdelka količina DPPH ne zmanjšuje. Iz tega lahko ugotovimo, da izdelek ne vsebuje antioksidantov. Pri pregledu sestavin smo kljub temu zaznali kar štiri: karitejevo maslo (lat. *Butyrospermum parkii*), olivno olje, tokoferilacetat ter izvleček granatnega jabolka (lat. *Punica granatum*). Karitejevo maslo oskrbuje kožo z vitaminoma A in E, ki

oba delujeta antioksidativno (27). Tudi olivno olje vsebuje nekaj vitamina E (28), a se v izdelku verjetno porabi že za oksidativno stabilizacijo samega olje. Za tokoferilacetat smo že omenili, da mora za izkazovanje antioksidativnega delovanja poteči njegova hidroliza do tokoferola. V vzorcih ni bilo encimov, ki katalizirajo to reakcijo, zato tokoferilacetat ni bil sposoben reducirati DPPH radikala. Za razliko od vzorcev pa človeška koža vsebuje encime, ki cepijo estrsko vez. Kljub temu, reakcija hidrolize poteče počasi in v majhnem obsegu (29), zato bi bil nujen še kakšen eksperiment ali tokoferilacetat v tem izdelku v koži lahko zviša koncentracijo tokoferola in tako izboljša antioksidativno kapaciteto kože. Tretja sestavina, ki naj bi imela antioksidativno delovanje je izvleček granatnega jabolka. Ta izvleček je eden najpogostejših rastlinskih izvlečkov v kozmetičnih izdelkih prav zaradi antioksidativnega delovanja (30). Antioksidativno delovanje je posledica velikih koncentracij in edinstvene sestave topnih fenolnih snovi (31). Verjetno je v našem izdelku tega izvlečka zelo malo, saj je med sestavinami podan med zadnjimi. Posledično je tudi antioksidativno delovanje izvlečka verjetno zelo majhno in neopazno z vidika celotnega izdelka. Za potrditev te domneve bi morali uporabiti druge metode, s katerimi bi dobili še kvantitativno sestavo tega kozmetičnega izdelka.

3. Body Milk intensive care mleko za telo (Dahlia)

Mleko za telo Dahlia se je med izdelki uvrstilo na 6. mesto. V primerjavi z mlekom za zaščito pred soncem ima opazno nižjo EC_{50} vrednost, torej ima še vedno dokaj veliko antioksidativno kapaciteto, ki je posledica kar štirih antioksidantov v izdelku ter olja sladkega mandljevca lat. *Prunus amygdalus dulcis*), ki vsebuje polifenole. Antioksidanti v izdelku so tokoferilacetat, tokoferol, askorbilpalmitat ter askorbinska kislina. Kot smo že omenili, tokoferilacetat v naših vzorcih zaradi odsotnosti encimov za hidrolizo esterske vezi ne deluje kot antioksidant. Drugi trije antioksidanti pa v izdelku delujejo sinergistično: askorbinska kislina je sposobna regenerirati oksidiran tokoferol. Kljub temu pa je askorbinska kislina zelo nestabilna in hidrofilna, zaradi česar slabo prehaja kožo. Njeno učinkovitost v koži bi morali tako dokazati še s kliničnimi testi (6). Glede na rezultate bi izdelek ocenili kot soliden izdelek z antioksidanti.

4. Après Lotion Schisandra losjon za nego kože po sončenju s shizandro (Alverde, dm)
Losjon za po sončenju se je uvrstil na 2. mesto po antioksidativni kapaciteti v preizkušanih izdelkih. Izdelek ima veliko antioksidativno kapaciteto, kar smo med eksperimentalnim delom takoj opazili, saj se je barva vzorcev že pri majhnih koncentracijah hitro spremenila iz vijolične v rumeno. Izdelek vsebuje kar nekaj sestavin z antioksidativnim delovanjem. Najprej opazimo »jabolčno vodo« (lat. *Pyrus malus*), ki vsebuje različne vitamine (A, C ter E) in polifenole, ki delujejo antioksidativno (32). Nato sledi olje breskvinih koščic (lat. *Prunus persica*), ki ima dobro antioksidativno aktivnost zaradi različnih fenolnih spojin (npr. nitin, epikatehin galat) (33). Sledita tokoferol, ki je najpomembnejši antioksidant v izdelku ter izvleček plodu shizandre (lat. *Schizandra sphenanthera*). Plod shizandre, ki vsebuje veliko bioaktivnih ligninov, nima samo antioksidativnega delovanja, ampak se uporablja tudi za zdravljenje hiperproliferativnih in vnetnih kožnih bolezni. Je zelo poznan in uporabljen predvsem v Kitajski medicini (34). Izdelek vsebuje tudi sončnično olje ter prah *Aloe barbadensis*. Za obe sestavini smo že omenili, da delujeta antioksidativno. Glede na dobljene rezultate, lahko potrdimo navedbe na nalepki izdelka, ki navajajo, da izdelek kožo ščiti pred radikali in prezgodnjim staranjem, povzročnim s sončno svetlobo. Izdelek je lahko primeren tudi za uporabo pred sončenjem, saj v koži zviša vsebnost antioksidantov, ki preprečujejo poškodbe zaradi UV sevanja. Antioksidanti, ki jih na kožo vnesemo po sončenju, imajo le omejen učinek, saj ne morejo več preprečiti verižnih reakcij, ki so jih že povzročili radikali (2).

5. Anti Age Straffende Sonnenmilch učvrstitveno mleko za zaščito pred soncem
(Sundance, dm)

Med vsemi izdelki, ki so izkazovali antioksidativno delovanje, ima prav mleko za zaščito pred soncem najmanjšo kapaciteto antioksidantov, kljub temu da med sestavinami lahko najdemo kar 3 antioksidante. Prvi se med sestavinami pojavi tokoferilacetat, za katerega smo že ugotovili, da v zaestreni obliki pri DPPH testu ne izkazuje antioksidativnega delovanja. Proti koncu sestavin se pojavi izvleček planike (lat. *Leontopodium alpinum*). Izvleček vsebuje flavonoide in fenolne kisline, ki imajo antioksidativno delovanje (35). Na zadnjem mestu sestavin najdemo še tokoferol. Ker sta oba glavna antioksidanta v izdelku navedena na koncu spiska sestavin, sta verjetno v zelo majhnih količinah, zato je velika EC₅₀ vrednost, ki pomeni manjšo antioksidativno kapaciteto izdelka, pričakovana. Kljub

temu bi si v varovalnih izdelkih za zaščito pred soncem želeli veliko antioksidantov. Najboljši izdelki za zaščito pred soncem ne morejo preprečiti več kot približno polovice UV inducirane tvorbe radikalov. Poleg tega je zaščita teh izdelkov odvisna od zaščitnega faktorja pred soncem (SPF) ter količine nanosa in se lahko odstrani s potenjem, drgnjenjem ter kopanjem v bazenu ali morju. Na drugi strani, antioksidanti delujejo v koži. Tako jih ne moremo odstraniti z umivanjem in drgnjenjem. Ko pridejo v kožo, nam lahko nudijo zaščito za več dni (36). Tako bi izdelek z vidika antioksidantov ocenili kot pomanjkljiv.

6. Apilana Face krema za obraz (Medex)

Krema za obraz pri prvem pregledu sestavin ni bila videti preveč obetavno, saj ni imela dodanih znanih in navadnih antioksidantov. Kljub temu smo med eksperimentalnim delom ugotovili, da ima zelo veliko antioksidativno kapaciteto. Krema vsebuje kar 7 sestavin z antioksidativnim delovanjem, kar je skoraj polovica vseh sestavin, ki jih je 16. Prvi sestavini, ki delujeta tudi antioksidativno sta sončnično olje ter karitejevo maslo (lat. *Butyrospermum parkii*), ki smo ju omenili že pri prejšnjih izdelkih. Sledi jima olje plodu pasijonke (lat. *Passiflora incarnata*). Vsebuje fenolne in flavonoidne snovi (37). Antioksidativno delovanje ima tudi kakavovo maslo (lat. *Theobroma cacao*), ki vsebuje različne polifenole (npr. flavanole in flavonole) (38). Sledi matični mleček, ki ima poleg drugih snovi, ki negujejo kožo tudi snovi, ki delujejo antioksidativno. Vsebuje majhne količine fenolov in vitaminov, najpomembnejši pa so antioksidativni peptidi. Izolirali so jih že 29 (39). Antioksidativno deluje tudi izvleček pšenice (lat. *Triticum vulgare*), ki vsebuje vitamin E (28, 40). Zadnja sestavina je izvleček lista rožmarina (lat. *Rosmarinus officinalis*). Glavne antioksidativne sestavine v tem izvlečku so fenolni diterpenoidi (41). Izdelek se je z vsemi navedenimi sestavinami dokazal kot učinkovit izdelek z veliko antioksidanti.

7. 2in1 Waschgel + Augen Make-up Entferner 2v1 gel za umivanje + odstranjevalec očesnih ličil (CadeaVera, Müller)

Tudi Müllerjev gel za čiščenje obraza nas je glede na sestavine pozitivno presenetil. Vsebuje le dva izvlečka, ki delujeta tudi antioksidativno. To sta izvlečka kislice (lat. *Rumex acetosa*) in granatnega jabolka (lat. *Punica granatum*). Oba vsebujeta fenolne snovi (31, 42). Glede na rezultat, ki izdelek uvršča med najboljših 5, sta izvlečka v dokaj velikih

količinah. Ker pa je izdelek namenjen za čiščenje obraza, je vprašanje, koliko antioksidantov sploh preide v kožo v nekaj minutah, preden izdelek izperemo. Tako je zelo verjetno, da izdelek ne povečuje antioksidativne kapacitete v koži, saj je za to v prekratkem stiku z njo. Kljub temu je glede na rezultate antioksidativna kapaciteta izdelka dobra.

8. Snow Cladonia Day Cream dnevna krema za pomlajevanje in lifting obraza (Natura Siberica)

Dnevna krema Natura Siberica je izkazala zelo veliko sposobnost redukcije DPPH radikala. Rezultat ni presenetljiv, saj krema vsebuje veliko antioksidantov. Med sestavinami hitro opazimo tokoferol, ki je že dobro poznan antioksidant, izvleček pšenice (lat. *Triticum vulgare*), ki smo ga omenili že pri Medexovem izdelku ter izvleček listov breskve (lat. *Prunus persica*), ki zaradi vsebnosti fenolnih snovi prav tako vsebuje antioksidante. Poleg teh treh antioksidantov pa izdelek vsebuje še 7 sestavin z antioksidantnim delovanjem. Prve štiri so zelo zanimive, saj vse izvirajo iz Sibirije. Prva je olje sibirskega bora (lat. *Pinus sibirica*), ki ima poleg antioksidativnih lastnosti tudi druge lastnosti: deluje kot antiseptik, pospešuje rast las ter deluje na limfni sistem (43). Sledi ji izvleček snežnega lišaja (lat. *Cetraria nivalis*), ki vsebuje usninsko kislino ter druge snovi z antioksidativnim delovanjem kot so flavonoidi in polioli (43, 44). Sledi ji izvleček sibirskega pritlikavega bora (lat. *Pinus pumila*), ki vsebuje vitamin C (43). Zadnja zanimiva sibirski sestavina pa je sibirski jerebika (lat. *Sorbus sibirica*), ki vsebuje vitamine (askorbinsko kislino, karoten) ter flavonoide (45). Poleg teh sestavin, imajo antioksidantno delovanje tudi sestavine opisane v nadaljevanju. Brestovolistni oslad (lat. *Spiraea ulmaria*) krepi in obnavlja kožo saj med drugim vsebuje tudi vitamin C ter flavonoide (43). Ognjič (lat. *Calendula officinalis*) je zaradi različnih farmakoloških lastnosti pogosto uporabljena sestavina, ki ne deluje samo antioksidativno, temveč tudi antibakterijsko, antivirusno, citotoksično ter protivnetno (46). V zadnjem delu sestavin pa opazimo še izvleček ovsa (lat. *Avena sativa*), ki vsebuje vitamin E (28). Sama krema ima tudi zaščitni faktor pred soncem (SPF) 15. Tako kožo neposredno varuje pred UV sevanjem in poškodbami, ki jih povzročata. Poleg tega ima veliko antioksidantov, ki delujejo v koži in preprečujejo poškodbe, ki jih povzročita UV sevanje, ki pride do kože. Izdelek bi tako ocenili kot zelo dober in sposoben preprečevanja prezgodnjega staranja kože, ki ga povzročata UV sevanje.

9. Body Milk Firming učvrstitveno mleko za telo (Nivea)

Niveino mleko za telo ni pokazalo velike sposobnosti lovljenja radikalov. Edina antioksidanta v izdelku sta ubikinon in olje makadamije (lat. *Macadamia ternifolia*), ki ju verjetno ni v velikih koncentracijah. Poleg tega izdelek ni namenjen pomlajevanju kože oziroma preprečevanju radikalskih poškodb, ampak je namenjen povečanju čvrstosti kože. Tudi ubikinon je dodan s tem namenom, saj sodeluje pri pretvarjanju energije v telesu. Tako bi izdelek z vidika antioksidativne kapacitete ocenili kot slab in z majhno sposobnostjo redukcije radikalov. Kljub temu pa je to pričakovano glede na sestavine in opis izdelka, kjer ni navedenih nobenih antioksidativnih lastnosti oz. ni omenjeno, da bi izdelek preprečeval pojav prezgodnjega staranja.

10. Argan krema proti gubam za predele okrog oči (Sans Soucis)

Krema za predele okrog oči je v naši raziskavi pokazala največjo sposobnost lovljenja radikalov. Izdelek vsebuje zelo veliko antioksidantov, zato smo pričakovali dober rezultat. Izdelek vsebuje skvalen, tokoferol, askorbilpalmitat, askorbinsko kislino, sončnično olje (lat. *Helianthus annuus*) ter izvleček listov rožmarina (lat. *Rosmarinus Officinalis*). Vse te antioksidante smo že spoznali. Poleg teh antioksidantov pa vsebuje še olje mareličnih koščic (lat. *Prunus armeniaca*), arganovo olje (lat. *Argania spinosa*), repati ščir (lat. *Amaranthus caudatus*) ter brazilsko krešo (lat. *Spilanthes acmella*). Olji mareličnih koščic ter arganije sta bogati s polifenoli ter tokoferoli (47, 48). Repati ščir vsebuje več fenolnih in flavonoidnih snovi, ki so odgovorne za njegovo antioksidativno delovanje (49). Brazilska kreša oziroma zobobolka vsebuje spilantol, derivate izobutilamida, estre α - in β -amirina, stigmasterol ter druge snovi, ki imajo veliko ugodnih lastnosti, med drugim tudi antioksidativno delovanje. Nekateri jo zaradi učinka glajenja gub imenujejo kar naravni »botox« (50). Krema je glede na rezultate in tudi na same sestavine absolutna zmagovalka, saj vsebuje tako lipofilne kot hidrofilne antioksidante ter tudi veliko število različnih izvlečkov, ki imajo dokazano antioksidativne lastnosti in druge različne pozitivne vplive na kožo. Izdelek tako zelo dobro varuje predele oči pred prezgodnjim staranjem.

Vrednotenje metode in laboratorijskega dela

DPPH metoda se je izkazala kot primerna metoda za ugotavljanje antioksidativne kapacitete naših kozmetičnih izdelkov. Metoda je bila razmeroma preprosta in dobili smo dobre rezultate. Tudi sam postopek ni bil zahteven, saj ni vseboval veliko korakov, zato je bilo možnosti za napake manj. Kljub temu je med eksperimentalnim delom verjetno prišlo do napak, zato smo rezultate podali z vrednostjo in standardnim odklonom. Napake so verjetno posledica manjše natančnosti pri tehtanju in merjenju gostote kozmetičnih izdelkov. Ko smo izdelek tehtali v mikrocentrifugirke, so lahko manjše količine ostale na njihovem vrhu. Tako so bile zaznane na tehtnici, niso pa bile v reakcijski zmesi z metanolom. Tudi pri merjenju gostote je lahko prišlo do napak, saj smo jo merili z merilnim valjem na samo eno decimalko natančno. Tudi pri nadaljnjem postopku je bila možna eksperimentalna napaka. Volumen smo izračunali iz mase in gostote, zato je bil rezultat pravilen in tudi v mikrocentrifugirke smo tako vnesli pravilne količine metanola, saj smo uporabili natančne pipete, vendar je pri raztapljanju lahko prišlo do kontrakcije volumna. Na rezultate bi lahko vplival še čas mešanja izdelka na vorteksu. Pogoji inkubiranja in centrifugiranja so bili za vse izdelke enaki. Sama raztopina DPPH je bila vsak dan drugačna, saj smo jo pripravili znova. To ne bi smelo vplivati na rezultate, saj smo učinkovitost antioksidantov merili kot delež nezreagirane DPPH.

Za potrditev dobljenih rezultatov DPPH metode, bi lahko uporabili še kakšno drugo metodo ugotavljanja antioksidativne kapacitete. Ena metoda za ugotavljanje celotne antioksidativne kapacitete ni dovolj, saj so si snovi različne. Dobro bi bilo, da bi uporabili vsaj dve metodi (33).

Vrednotenje rezultatov

Rezultati meritev odražajo antioksidativno kapaciteto izdelka *in vitro*, ne pa tudi antioksidativnih učinkov v koži (*in vivo*). Nekateri so zelo nestabilni in morda sploh ne preidejo v kožo v aktivni obliki. Drugi so hidrofilni in zato težje prehajajo kožno bariero. Tretji so v zaestreni obliki (npr. tokoferilacetat) in v vzorcih niso mogli izkazovati antioksidativnega delovanja, lahko pa bi ga v koži, kjer so encimi za hidrolizo esterske vezi. Tako bi morali za potrditev rezultatov, kateri izdelki so dobri in kateri ne, narediti še druge teste. Najprej bi lahko izvedli teste dermalne absorpcije, kjer bi ugotavljali, ali sestavine v izdelkih sploh prehajajo v kožo. V nasprotnem primeru še tako dobra krema z

veliko antioksidativno kapaciteto koži ne more pomagati pri zmanjševanju poškodb, ki jih povzročajo radikali. Naredili bi lahko tudi *in vitro* ali *in vivo* testiranja kože po nanosu izdelkov in izpostavitvi UV sevanju in tako bi dobili natančne rezultate, kateri izdelki koži dejansko povečajo njeno lastno kapaciteto antioksidantov in v kolikšni meri.

7 SKLEP

V diplomski nalogi smo ugotovili antioksidativno kapaciteto različnih izdelkov. Od izdelka z najvišjo do izdelka z najnižjo antioksidativno kapaciteto si sledijo v naslednjem zaporedju:

1. mesto: Argan
2. mesto: Après Lotion Schisandra
3. mesto: Snow Cladonia Day Cream
4. mesto: Apilana Face
5. mesto: 2in1 Waschgel + Augen Make-up Entferner
6. mesto: Body Milk intensive care
7. mesto: Natural lift
8. mesto: Body Milk Firming
9. mesto: Anti Age Straffende Sonnenmilch
10. mesto: Amazing Reichhaltige Body Milk

Ugotovili smo, da število antioksidantov, ki jih opazimo med sestavinami na prvi pogled (npr. tokoferol in askorbinska kislina) ni nujno enako številu vseh antioksidantnih sestavin v izdelku. Veliko k antioksidativni kapaciteti izdelkov pripomorejo tudi različni rastlinski izvlečki. Hipotezo, da izdelki, ki vsebujejo več sestavin z antioksidativnim delovanjem, izkazujejo večjo antioksidativno kapaciteto od izdelkov, ki vsebujejo samo eno ali dve sestavini z antioksidativnim delovanjem, smo delno potrdili, saj izdelka 2 in 7 odstopata. Potrdili pa smo hipotezo, da izdelki, ki imajo sestavine z antioksidativnim delovanjem napisane med zadnjimi, ne izkazujejo velike antioksidativne kapacitete, saj so te sestavine v izdelku zastopane v majhnih koncentracijah.

Raziskavo bi lahko izboljšali, če bi uporabili več različnih metod, saj bi tako dokazali pravilnost rezultatov, dobljenih z DPPH metodo. Poleg tega bi lahko v nadaljnjih študijah naredili tudi teste dermalne absorpcije, da bi ugotavljali sposobnost prehajanja sestavin izdelka v kožo. Samo učinkovitost delovanja pa bi lahko ugotavljali z *in vivo* ter *in vitro* testi ob izpostavljenosti UV sevanju.

8 VIRI

- 1 Farage M, Miller K, Maibach H: Textbook of Aging Skin, Springer-Verlag, Berlin, 2010.
- 2 Pečar S: Radikali v našem okolju, Kemija v šoli, 2, 2006, str. 26-30.
- 3 Pečar S: Radikali v našem življenju, Kemija v šoli, 3, 2006, str. 13-19.
- 4 Mravljak J, Pecar S: Šumi življenja, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2015.
- 5 Farage M, Miller K, Elsner P, Maibach H: Characteristics of the Aging Skin, Advances in Wound Care, ZDA, 2, 2013, str. 5-10.
- 6 Ramos-e-Silva M, Ribeiro Celem L, Ramos-e-Silva S, Fucci-da-Costa A: Anti-aging cosmetics: Facts and controversies, Clinics in Dermatology, VB, 31, 2013, str. 750-758.
- 7 Thiele J, Elsner P, Oxidants and Antioxidants in Cutaneous Biology 2001; 29: 157-163.
- 8 Bogdan Alleman I, Baumann L: Antioxidants Used in Skin Care Formulations, Skin Therapy Letter, ZDA, 13, 2008, str. 5-8.
- 9 Lupu M: Antioxidants and vitamins in cosmetics, Clinics in Dermatology, VB, 19, 2001: str. 467-473.
- 10 Campos P, Gianeti M, Camargo F, Gaspar L: Application of tetra-isopalmitoyl ascorbic acid in cosmetic formulations: Stability studies and in vivo efficacy, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, VB, 82, 2012, str. 580-586.
- 11 Sharma O, Bhat T: DPPH assay revisited, Food Chemistry, VB, 113, 2009, str. 1202-1205.
- 12 Mishra K, Ojha H, Chaunhury N: Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results, Food Chemistry, VB, 130, 2012, str. 1036-1043.
- 13 Hossain U, Bhattachary S: Synthesis of O-prenylated and O-geranylated derivatives of 5-benzylidene-2,4-thiazolidinediones and evaluation of their free radical scavenging activity as well as effect on some phase II antioxidant/detoxifying enzymes, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, VB, 17, 2007, str. 1149-1154.
- 14 http://webshop.afroditacosmetics.com/index.php?route=product/product&product_id=107 Datum dostopa: 27.7.2015.

- 15 <http://www.aldo-vandini.de/moments/amazing/reichhaltige-koerpermilch.html> Datum dostopa: 27.7.2015.
- 16 http://dahliacosmetic.com/proizvodi/nega_tela/mleko_za_telo/vitaminE.html# Datum dostopa: 27.7.2015.
- 17 http://www.dm-drogeriemarkt.si/si_homepage/lepota/naravna_kozmetika/alverde-izdelki/alverde-telo/535874/155121-sun-losjon-po-soncenju-3-2-2015.html Datum dostopa: 27.7.2015.
- 18 http://www.dm-drogeriemarkt.si/si_homepage/lepota/soncna_kozmetika/sundance2/zascita-pred-soncem/547644/162336-mleko-anti-age-zf30-4-3-2015.html Datum dostopa: 27.7.2015.
- 19 <http://www.medex.si/shop/apilana-face/> Datum dostopa: 27.7.2015.
- 20 Etiketa na izdelku 2 in 1 Waschgel + Augen Make-up Entfernet
- 21 <http://naturasiberica.si/nega-obraza/kreme-in-serumi/dnevna-krema-snezna-kladonija-lifting-in-pomladitev-SPF-15> Datum dostopa: 27.7.2015.
- 22 <http://www.nivea.si/Izdelki/Nega-telesa/q10plus/q10-energy-mleko-za-telo> Datum dostopa: 27.7.2015.
- 23 <http://www.sans-soucis-shop.nl/products/argan-anti-wrinkle-eye-care-15-ml> Datum dostopa: 27.7.2015.
- 24 Chun-hui L, Chang-hai W: Isolation, chemical characterization and antioxidant activities of two polysaccharides from the gel and the skin of *Aloe barbadensis* Miller irrigated with sea water, *Process Biochemistry*, VB, 42, 2007, str. 961-970.
- 25 Siddhuraju P: The antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of phenolics of raw and dry heated moth bean (*Vigna aconitifolia*) (Jacq.) Marechal seed extracts, *Food Chemistry*, VB, 99, 2006, str. 149-157.
- 26 Yang D, Wang X, Gan L, et al: Effects of flavonoid glycosides obtained from a *Ginkgo biloba* extract fraction on the physical and oxidative stabilities of oil-in-water emulsions prepared from a stripped structured lipid with a low omega-6 to omega-3 ratio, *Food Chemistry*, VB, 174, 2015, str. 124-131.
- 27 <http://www.secretspa.com/Shea-Butter> Datum dostopa: 18.8.2015.
- 28 Kreft S et al: *Sodobna fitoterapija: z dokazi podprta uporaba zdravilnih rastlin*, Slovensko farmacevtsko društvo, Slovenija, 2013.

- 29 Beijersbergen van Henegouwen GM, Junginger HE, de Vries H: Hydrolysis of RRR-alpha-tocopheryl acetate (vitamin E acetate) in the skin and its UV protecting activity (an in vivo study with the rat), *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, VB, 28, 1995, str. 45-51.
- 30 Ricci D, Giamperi L, Bucchini A, Fraternali D: Antioxidant activity of *Punica granatum* fruits, *Fitoterapia*, VB, 77, 2006, str. 310-312.
- 31 Borochoy-Neori H et al: Seasonal and cultivar variations in antioxidant and sensory quality of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit, *Journal of Food Composition and Analysis*, VB, 22, 2009, str. 189-195.
- 32 Wong-Paz J et al: Enzymatic synthesis, purification and in vitro antioxidant capacity of polyphenolic oxidation products from apple juice, *Food Science and Technology*, VB, 64, 2015, str. 1091- 1098.
- 33 Wu H et al: Essential oil extracted from peach (*Prunus persica*) kernel and its physicochemical and antioxidant properties, *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, Nemčija, 12, 2011, str. 2032-2039.
- 34 Lu Y, Chen D: Analysis of *Schisandra chinensis* and *Schisandra sphenanthera*, *Journal of Chromatography A*, VB, 1261, 2009, str. 1980-1990.
- 35 Ganzera M, Greifeneder V, Schwaiger S, Suppner H: Chemical profiling of Edelweiss (*Leontopodium alpinum* Cass.) extracts by micellar electrokinetic capillary chromatography, *Fitoterapia*, VB, 83, 2012, str. 1680-1686.
- 36 Murray J et al: A topical antioxidant solution containing vitamins C and E stabilized by ferulic acid provides protection for human skin against damage caused by ultraviolet irradiation, *Journal of the American Academy of Dermatology*, VB, 59, 2008, str. 418-425.
- 37 Zhang D et al: Variation of active constituents and antioxidant activity in pyrola [*P. incarnata* Fisch.] from different sites in Northeast China, *Food Chemistry*, VB, 141, 2013, str. 2213-2219.
- 38 Kim J, Lee K, Lee H: Chapter 42 – Cocoa (*Theobroma cacao*) Seeds and Phytochemicals in Human Health, *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention*, VB, 2011, str. 351-360
- 39 Ramadan M, Al-Ghamdi A: Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly: A review, *Journal of Functional Foods*, VB, 3, 2012, str. 29-52.
- 40 [http://www.seacretspa.com/Wheat-Oil Datum dostopa 28.7.2015](http://www.seacretspa.com/Wheat-Oil-Datum-dostopa-28.7.2015).

- 41 Yesil Celiktas O, Bedir E, Vardar Sukan F: In vitro antioxidant activities of *Rosmarinus officinalis* extracts treated with supercritical carbon dioxide, Food Chemistry, VB, 101, 2007, str. 1457-1464.
- 42 Bae J et al: A Comparison between Water and Ethanol Extracts of *Rumex acetosa* for Protective Effects on Gastric Ulcers in Mice, Biomolecules&Therapeutics, Republika Koreja, 20, 2012, str. 425-430.
- 43 <http://naturasiberica.si/zelisca-in-rastline> Datum dostopa: 28.7.2015.
- 44 Singh S, Singh P, Ravindra R: Screening of antioxidant potential of Arctic lichens, Polar Biology, Nemčija, 34, 2011, str. 1775-1782.
- 45 Wei J et al: Biological activities of extract prepared from *Sorbus sibirica* fruit, Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, Indija, 6, 2014, str. 1369-1372.
- 46 Chandran P, Kuttan R: Effect of *Calendula officinalis* Flower Extract on Acute Phase Proteins, Antioxidant Defense Mechanism and Granuloma Formation During Thermal Burns, Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition, Japonska, 43, 2008, str. 58-64.
- 47 Erdogan-Orhan I, Kartal M: Insights into research on phytochemistry and biological activities of *Prunus armeniaca* L. (apricot), Food Research, VB, 44, 2011, str. 1238-1243.
- 48 Drissi A et al: Evidence of hypolipemiant and antioxidant properties of argan oil derived from the argan tree (*Argania spinosa*), Clinical Nutrition, VB, 23, 2004, str. 1159-1166.
- 49 Li H et al: Characterization of phenolics, betacyanins and antioxidant activities of the seed, leaf, sprout, flower and stalk extracts of three *Amaranthus* species, Journal of Food Composition and Analysis, VB, 37, 2015, str. 75-81.
- 50 Wongsawatkul O et al: Vasorelaxant and Antioxidant Activities of *Spilanthes acmella* Murr., International Journal of Molecular Sciences, Švica, 9, 2008, str. 2724-2744.

9 PRILOGA

Priloga 1: Zatehtane mase, odčitani volumen in izračunana gostota za posamezni kozmetični izdelek

Preglednica III: Masa, volumen in gostota posameznega kozmetičnega izdelka

Kozmetični izdelek	m [g]	V [mL]	ρ [g/mL]
1	3,61	3,8	0,95
2	4,07	4,1	0,99
3	4,50	4,3	1,0
4	3,13	3,1	1,0
5	4,90	4,3	1,1
6	3,76	3,8	0,99
7	1,54	1,6	0,96
8	3,04	3,1	0,98
9	4,19	4,2	0,99
10	2,67	2,9	0,95