

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TADEJA GOJKOVIČ

**NAČRTOVANJE SESTAVE IN PREUČEVANJE
STABILNOSTI KREM S POLHOVIM OLJEM**

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM INDUSTRIJSKA
FARMACIJA

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TADEJA GOJKOVIČ

**NAČRTOVANJE SESTAVE IN PREUČEVANJE
STABILNOSTI KREM S POLHOVIM OLJEM**

DEVELOPMENT AND STABILITY STUDY OF CREAMS
CONTAINING DORMOUSE OIL

MASTER'S STUDY PROGRAMME INDUSTRIAL PHARMACY

Ljubljana, 2014

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, pod mentorstvom prof. dr. Mirjane Gašperlin, mag. farm.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorici, prof. dr. Mirjani Gašperlin, mag. farm za pomoč, strokovne nasvete in spodbudo pri opravljanju magistrske naloge. Prav tako se iskreno zahvaljujem Tatjani Hrovatič, Mojci Keržan in Valeriji Garb za pomoč pri delu v laboratoriju in praktične nasvete.

Posebna zahvala velja moji družini, ki mi je tekom študija stala ob strani, me spodbujala in mi omogočila brezskrben študij in vsem ostalim prijateljem, ki so mi vsa ta leta stali ob strani.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom prof. dr. Mirjane Gašperlin, mag. farm.

VSEBINA

KAZALO SLIK.....	IV
KAZALO PREGLEDNIC.....	V
POVZETEK	VI
ABSTRACT	VIII
1. UVOD	1
1. 1. POLHI IN POLHOVO OLJE	1
1. 2. KAKOVOST LIPIDNIH SESTAVIN.....	2
1. 2. 1. FIZIKALNO KEMIČNE KONSTANTE	2
1. 3. KREME	6
1. 3. 1. POVRŠINSKO AKTIVNE SNOVI	6
1. 3. 2. HIDROFILNO-LIPOFILNO RAVNOTEŽJE.....	7
1. 3. 3. SENZORIČNE LASTNOSTI KREM	8
1. 3. 4. FIZIKALNA STABILNOST KREM	10
1. 3. 5. VREDNOTENJE FIZIKALNE STABILNOSTI KREM.....	13
1. 3. 5. 1. POSPEŠENI TESTI STARANJA.....	13
1. 3. 5. 2. REOLOŠKE LASTNOSTI	14
1. 3. 5. 3. ANALIZA VELIKOSTI KAPLJIC	15
1. 3. 5. 4. ELEKTRIČNA PREVODNOST	15
2. NAMEN DELA.....	17
3. MATERIALI IN METODE	18
3. 1. MATERIALI	18
3. 1. 1. NAPRAVE.....	18
3. 1. 2. KEMIKALIJE.....	18
3. 2. METODE.....	19

3. 2. 1. DOLOČANJE ZAHTEVANEGA HLB ZA LIPOFILNO FAZO.....	19
3. 2. 2. DOLOČANJE KEMIČNIH KONSTANT POLHOVEGA OLJA	20
3. 2. 3. IZDELAVA KREM.....	21
3. 2. 3. 1. ZGRADBA IN VLOGA SESTAVIN V KREMAH.....	22
3. 2. 3. 2. STRESNI TESTI ZA IZBIRO OPTIMALNE PODLAGE	24
3. 2. 2. 3. OPTIMIZIRANJE RECEPTURE KREM	24
3. 2. 4. VREDNOTENJE FIZIKALNE STABILNOSTI OPTIMIZIRANIH KREM.....	25
3. 2. 5 DSC ANALIZA	27
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	28
4. 1. ZAHTEVANE HLB VREDNOSTI ZA LIPOFILNO FAZO	28
4. 2. KEMIČNE KONSTANTE POLHOVEHA OLJA.....	29
4. 3. IZBOR OPTIMALNE PODLAGE ZA VGRADITEV POLHOVEGA OLJA.....	29
4. 4. FIZIKALNA STABILNOST	33
4. 4. 1. IZOTERMNO STARANJE	33
4. 4. 2. NEIZOTERMNO STARANJE.....	39
4. 6. DSC ANALIZA.....	43
5. SKLEP.....	46
6. LITERATURA.....	48

KAZALO SLIK

Slika 1: Navadni polh (1)	2
Slika 2: Prikaz fizikalne nestabilnosti emulzij (35)	10
Slika 3: Odvisnost pH od časa pri različnih pogojih staranja za VZOREC 1 in VZOREC 2..	33
Slika 4: Odvisnost električne prevodnosti od časa pri različnih pogojih staranja za VZOREC 1 in VZOREC 2.....	36
Slika 5: Reogram sveže pripravljene vzorca (t_0): levo VZOREC 1, desno VZOREC 2.....	38
Slika 6: Odvisnost viskoznosti od časa za VZOREC 1 in VZOREC 2, ki sta bila starana pri različnih pogojih.....	39
Slika 7: Viskoznost VZORCA 1: sveže pripravljen vzorec in viskoznost vzorca po 10. ciklih-1. del (levo) in viskoznost sveže pripravljene vzorca in viskoznost vzorca po 10. ciklih-2. del (desno).....	41
Slika 8: Viskoznost VZORCA 2: sveže pripravljen vzorec in viskoznost vzorca po 10. ciklih-1. del (levo) in viskoznost sveže pripravljene vzorca in viskoznost vzorca po 10. ciklih-2. del (desno).....	42
Slika 9: Termogram posameznih sestavin izdelanih krem.....	43
Slika 10: Termogram VZORCA 1 staranega pri različnih pogojih	44
Slika 11: Termogram VZORCA 2 staranega pri različnih pogojih	45

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Uporabljena laboratorijska oprema.....	18
Preglednica II: Uporabljene kemikalije.....	18
Preglednica III: Recepture emulzij z zahtevanimi HLB vrednostmi od 10-15	20
Preglednica IV: Recepture izdelanih krem za stresna testiranja fizikalne stabilnosti.....	22
Preglednica V: Kemijska sestava in vloga sestavin v kremah	22
Preglednica VI: Preglednica sestave optimiziranih receptur KREME 3.....	24
Preglednica VII: Čas razpada emulzije glede na HLB emulgatorske zmesi	28
Preglednica VIII: Kemične konstante polhovega olja.....	29
Preglednica IX: Rezultati preliminarne stresnega testiranja stabilnosti krem.....	30
Preglednica X: Preliminarno stresno testiranje stabilnosti optimiziranih receptur KREME 3	31
Preglednica XI: Vrednosti fizikalnih parametrov sveže pripravljenih vzorcev in po 10. ciklu za VZOREC 1 in VZOREC 2	40

POVZETEK

Polhovo olje se v ljudski medicini uporablja že od 16. stoletja in še danes je cenjen njegov zdravilni učinek (pospeši celjenje ran, uporablja se kot mazilo pri ozeblinah, opeklinah, krvavečih in odprtih ranah, ki se nočejo zasušiti, ipd.). Pomembno je, da je olje ustrezne kakovosti, ki jo v Evropi predpisuje Evropska farmakopeja s kislinskim številom, peroksidnim številom in saponifikacijskim številom.

V farmaciji in kozmetiki se za aplikacijo na kožo veliko uporabljajo kreme, ki so poltrdne emulzije, tipa O/V in V/O. Zaradi termodinamske nestabilnosti emulzij je potreben dodatek površinsko aktivnih snovi (emulgatorjev), ki znižajo medfazno napetost in tako tvorijo homogeno emulzijo.

Fizikalno nestabilnost emulzij, ki se kaže kot flokulacija, koalescenca, flotacija, sedimentacija, Ostwaldova rast in fazna inverzija lahko vrednotimo z različnimi metodami. Izdelane kreme lahko izpostavimo pospešenim testom staranja, ki nam dajo hiter odgovor o njihovi fizikalni (ne)stabilnosti. Glede na temperaturo, pri katerih se izvajajo pospešeni testi staranja, jih razdelimo na izotermne, ki predstavljajo osnovno obliko pospešenega staranja, in na neizotermne, pri katerih je krema izpostavljena cikličnim temperaturnim obremenitvam.

Med potekom in po koncu pospešenih testov staranja spremljamo spremembe v stabilnosti kreme, ki jih vrednotimo z določanjem pH, velikosti kapljic dispergirane faze in električne prevodnosti.

Namen magistrske naloge je bil, da z optimalno recepturo pripravimo fizikalno stabilno kremo s polhovim oljem.

V postopku izdelovanja formulacij smo najprej določili optimalno HLB vrednost emulgatorja, ki smo ga nato uporabili za izdelavo krem s polhovim oljem. Za emulgatorsko zmes, sestavljeno iz Spana 80 in Tweena 80 smo določili HLB 10. Kakovost polhovega olja smo preverili z določanjem kislinskega, peroksidnega in jodnega števila. Polhovemu olju smo določili kislinsko število 11,142, kar nakazuje na večji deleže prostih maščobnih kislin v olju in jodno število 119,27, ki smo ga tudi pričakovali glede na kemijsko sestavo. Vrednosti peroksidnega števila nismo mogli določiti, saj v olju ni bilo prisotnih peroksidov.

Na osnovi literaturnih podatkov o sestavi kozmetičnih emulzij in določene vrednosti HLB smo na začetku izdelali osem podlag z različno sestavo tako, da je delež celokupne lipofilne (33 %), hidrofilne (61 %) faze in emulgatorske zmesi (6 %) ostal enak. Spreminjali pa smo deleže posameznih sestavin (olivno olje, mandljevo olje, cetostearol, dimetikon, idr.). S

preliminarnim testiranjem stabilnosti (centrifugiranje) smo izbrali recepturo, pri kateri je krema po videzu ostala nespremenjena (homogena). To recepturo smo v nadaljevanju še optimizirali tako, da smo zmanjšali delež oljne in povečali delež vodne faze. Izdelali smo pet krem, jih organoleptično ocenili in jih ponovno izpostavili centrifugiranju. V najstabilnejšo kremo smo nato vgradili 5 % polhovega olja. Ker smo želeli dodatno primerjavo izbrane emulgatorske zmesi s Spanom 80 in Tweenom 80 (HLB 10), smo pripravili še kremo z emulgatorsko zmesjo Cremophorja RH in Cremophorja EL, ki sodita med najpogosteje uporabljene emulgatorje v kozmetičnih kremah.

Izdelanim kremam smo vrednotili fizikalno stabilnost z izotermnim testom staranja, ki je potekal pri sobni temperaturi, pri 4 °C in pri 40 °C in z neizotermnim testom, ki ga predstavljajo ciklične temperaturne obremenitve. Po naprej določenem časovnem planu smo vzorcem, shranjenim pri različnih pogojih, merili viskoznost, pH in električno prevodnost. Kremam, izpostavljenim cikličnim obremenitvam, smo te parametre izmerili pred začetkom testiranja in po 10. ciklu.

Pri izotermnem staranju na 40 °C smo pri vzorcih z obema emulgatorskima zmesema zaznali zmanjševanje pH vzorca, ki ga pripisujemo mikrobiološki kontaminaciji vzorca, saj pri izdelavi nismo uporabili konzervansov. Vendar pa na fizikalno nestabilnost VZORCA 1 (emulgatorska zmes Spana 80 in Tweena 80 s HLB 10) in VZORCA 2 (emulgatorska zmes Cremophorja RH in Cremophorja EL v razmerju 1:1) nakazuje povišana električna prevodnost, prvega, ki je bil shranjevan na 40 °C, drugega pa shranjenega v hladilniku. V obeh primerih smo spremembe v strukturi zaznali že organoleptično.

Kljub temu, da smo z načrtovanjem sestave skušali pripraviti fizikalno stabilno kremo, smo z vrednotenjem fizikalnih parametrov ugotovili, da bi bila potrebna še dodatna optimizacija recepture, s katero bi dosegli zadostno fizikalno stabilnost izdelane kreme.

ABSTRACT

Dormouse oil has been used in folk medicine since the 16th century and its therapeutic effect is still highly valued today (e.g. faster healing of wounds such as frostbite burns or openwounds that do not heal easily). It is important that the oil is of adequate quality, and is in line with the European Pharmacopoeia rules that define the acid value and the peroxide and saponification number. In pharmaceuticals and cosmetics semi-solid emulsions of the type O/W and W/O are widely used. Due to the thermodynamic instability of emulsions, the addition of surfactants (emulsifiers), which reduce the interfacial tension and form a homogeneous emulsion, is required.

Physical instability of emulsions such as flocculation, coalescence, flotation, sedimentation, Ostwald ripening and phase inversion, can be evaluated by various methods. Produced creams can be exposed to accelerated aging tests, which provide a fast method for testing their stability. Depending on the temperature at which the accelerated aging tests are carried out, they are divided into two main methods: isothermal tests, where there is only the basic form of accelerated aging and non-isothermal tests, where the cream is exposed to cyclic thermal stresses. During the course of and after the end of accelerated aging tests changes in the stability of the cream are monitored, By determining three measures: pH value, droplet size, and electrical conductivity.

The purpose of the master's thesis was to prepare a physically stable dormouse oil cream with an optimal recipe.

In the process of making the formulations, we first determined the HLB value of the emulsifier, which was then used for the production of creams with dormouse oil. For the emulsifier mixture, composed of Span 80 and Tween 80 the HLB was at value 10. The quality of dormouse oil was evaluated by three measures; the acid, peroxide and iodine number. The determined acid number of dormouse oil was 11.142, which indicates higher proportions of free fatty acids in the oil and the iodine number was 119.27, which was expected due to the chemical composition. The values of the peroxide number could not be determined because the oil did not contain peroxides.

On the basis of the literature data on the composition of cosmetic emulsions and of the determined HLB value we developed eight bases with different composition, where the proportion of total lipophilic (33%) and hydrophilic (61%) phase and of the emulsifier mixture (6%) remained constant. We varied only the proportions of individual ingredients (olive oil, almond oil, cetostearyl, dimethicone, etc.). With preliminary testing of the stability

(centrifuge) we selected the recipe, in which the cream remained unchanged in appearance (homogeneous). We further optimized this recipe by reducing the share of oil phase and increasing the proportion of the water phase. We made five creams, evaluated them organoleptically and re-exposed them to centrifugation. 5% of dormouse oil was then integrated into the overall cream. Because we wanted to compare the selected emulsifier mixture with Span 80 and Tween 80 (HLB 10), we prepared a second cream with an emulsion mixture of Cremophor RH and Cremophor EL, since these are the most commonly used emulsifiers in cosmetic creams.

We evaluated the physical stability of produced creams with the isothermal aging test at room temperature at 4 °C and at 40 °C and with the non-isothermal test, for which cyclic temperature loads are used. After a predetermined time schedule, we measured the viscosity, the pH and electrical conductivity of samples, which were stored under different conditions. The parameters of creams, exposed to cyclic loads were measured before the first and after the 10th cycle.

We did not detect physical instability with the cycling temperature loads testing. In the case of isothermal aging, however, the results showed instability. At 40 °C, we discovered a reduction of the pH value in samples with both emulsifier mixtures, which we attributed to microbial contamination of the sample, as we did not use preservatives in the preparation of the samples. The physical instability of SAMPLE 1 (an emulsifier mixture of Span 80 and Tween 80 with a HLB of 10) and SAMPLE 2 (emulsifier mixture of Cremophor RH and Cremophor EL in the ratio of 1: 1) was indicated by an increased electrical conductivity. In both cases of the isothermal aging tests (the one at 40 °C and the one at 4 °C) the tests showed instability of the structure already at the organoleptic phase.

To conclude, despite the fact that we tried to prepare a physically stable cream, the evaluation of physical parameters showed, that the dormouse cream still needs to be further optimised in order to ensure sufficient physical stability of the cream.

1. UVOD

1. 1. POLHI IN POLHOVO OLJE

Polhi so majhni do srednje veliki glodavci. Trup z glavo meri 60-200 mm, rep je dolg 40 – 135 mm, tehtajo pa od 8 – 200 g. Največji predstavnik družine je navadni polh (Slika 1). Mladi polhi so povsem sivi, s starostjo se v dlaki pojavijo rjavkasti toni. Prehranjujejo se z mehкими in sočnimi plodovi, ki imajo visoko hranilno vrednost. Razmnožujejo se počasi, samice imajo na leto največ dve legli. Polhi sklenjeno živijo v Evropi, v sosednjih delih Zahodne Azije in v Afriki, razen v Sahari. Večinoma živijo na drevju ali v grmovju, po katerem spretno plezajo in se le redko spustijo na tla.

Na Slovenskem zelo cenjena sestavina polha, je polhova mast, ki je v rabi že več stoletij. Prvi zapis, ki omenja uporabo polhove masti, sega v 16. stoletje. Uporaba je bila namenjena zdravljenju marsikatere telesne poškodbe.

Polhovo mast v ljudski medicini uporabljajo kot zdravilo za zunanje in notranje bolezni pri ljudeh in živalih. Z njo so mazali rane, zlasti opekline, kožne lišaje in razpokano kožo. Namenjena je bila zoper angino, z njo so zdravili tudi različne bolezni pri domači živini, zlasti pri prašičih, govedu in konjih. Drvarji na Savinjskem so polšjo mast uporabljali za mazanje ozeblin, splavarji in vozniki pa so jo uporabili kot zdravilo pri prsnem obolenju.

Tudi danes je cenjen zdravilni učinek polhove masti pri ljudeh in živalih, saj pospeši celjenje ran. V zdravilne namene jo največ uporabljajo kot mazilo pri ozeblinah, opeklinah, krvavečih in odprtih ranah, ki se nočejo zasušiti, pri usekih, urezih, odrgninah, udarninah, pri zastarelih gnojnih ranah, krastah, proti vsem kožnim boleznim, ekcemom, hemeroidom, prhljaju, izpadanju las, luskavici, revmi ipd. Uporablja se tudi za zdravljenje bolezni, kot so vnetje v ustih, angina in drugih obolenja v grlu, pri hudem kašlju in drugih bolečinah v prsih, pljučnim slabostim, zaprtju, pri ranah na želodcu in dvanajstniku. Polhova mast naj bi po ustnih virih pomagala celo pri zdravljenju rakastih obolenj na želodcu in debelem črevesu ter pri rakastih obolenjih nasploh in tudi pri vnetju sluznice (1). Kljub vsem navedbam uporabe polhove masti, pa ni aktualnih člankov, ki bi opisovali zdravilne učinke, prej omenjene tradicionalne uporabe.

Danes se polšja mast pripravlja podobno kot v preteklosti. Najprej iz odrtih kožic, mesa in tudi zamaščenega drobovja (sala) oberejo vso maščobo. Nato nabrano maščobo več polhov razpustijo, počasi topijo oz. cvrejo na štedilniku. Potrebno je previdno cvrtje maščobe, da se ta razpusti in da ocvirki ne zarumenijo. V primeru, da jo prežgemo, izgubi precej zdravilnih

lastnosti. Ko je mast oz. olje razpuščeno, ga je potrebno precediti, preliti v steklenice in dobro zamašiti. Zanimivost polšjega olja je, da ostane tekoče tudi pri temperaturi -36°C (1).



Slika 1: Navadni polh (1)

1. 2. KAKOVOST LIPIDNIH SESTAVIN

V Evropi Evropska farmakopeja (Ph. Eur.) podaja pravno zavezujoče zahteve za nadzor kakovosti in identifikacijo lipidov, ki se uporabljajo v farmacevtskih izdelkih. Indeksi, kot so kislinsko število, peroksidno število in saponifikacijsko število, imajo pomembno vlogo pri nadzoru kakovosti in identifikaciji lipidov (2).

Olja so tekoči produkti, pridobljeni z različnimi tehnikami iz rastlinskih plodov ali nekaterih živalskih tkiv. V glavnem so sestavljeni iz trigliceridov, vsebujejo pa še tudi druge lipofilne komponente v manjših deležih (maščobne alkohole, maščobne kisline, vitamine, fitosterole,...) (3).

Na oksidativno stabilnost olj med shranjevanjem vpliva več faktorjev. Eden od njih je stopnja nenasičenja, na katero vpliva relativna vsebnost oleinske in linolenske kisline. Na rok uporabnosti olj vplivajo proizvodni procesi npr. način pridobivanja, dodatek antioksidantov in vrsta embalaže. Drugi pomembni dejavniki, ki vplivajo na oksidativno stabilnost, so pogoji shranjevanja olj: čas, temperatura in svetloba (4).

Fizikalno kemijske lastnosti so pomemben faktor, ki določajo kakovost in stabilnost olj (5).

1. 2. 1. FIZIKALNO KEMIČNE KONSTANTE

KISLINSKO ŠTEVILO

Je parameter, ki pove količino prostih maščobnih kislin v lipidih. Proste maščobne kisline nastanejo s hidrolizo trigliceridov med proizvodnjo in shranjevanjem olj. Nadaljnji viri prostih maščobnih kislin so razgradnji procesi v lipidih. Sekundarna oksidacija nenasičenih aldehydov ali drugih oksidativnih produktov, ki nastanejo s cepitvijo lipidnih peroksidov, vodijo do tvorbe kratko verižnih prostih maščobnih kislin (2).

Kislinsko število I_A je število, ki izraža v mg količino kalijevega hidroksida (KOH), ki se porabi za nevtralizacijo prostih maščobnih kislin prisotnih v 1 g pripravka (6):

$$I_A = \frac{5,610 \cdot n}{m}$$

kjer je m masa preiskovanega lipida v gramih in n volumen titranta 0,1 M KOH v mililitrih (6).

PEROKSIDNO ŠTEVILO

Peroksidno število je pokazatelj primarne oksidacije olj, pri čemer molekula kisika prodre v maščobno molekulo v obliki peroksidne skupine (7, 8). Ta parameter določa koncentracijo vodikovega peroksida (primarna oksidacija spojin), ki ni stabilen in zlahka razpade na sekundarne oksidativne produkte (ketone in aldehide) in je odgovoren za poslabšanje okusa oksidiranega olja (7). Oksidativni procesi, ki vključujejo tvorbo vodikovih peroksidov, se lahko pojavijo med predelavo ali shranjevanjem, ki potekajo z avtooksidacijo ali fotooksidacijo (9).

Peroksidno število I_P je število, ki nam v miliekvivalentih aktivnega kisika pove količino peroksida v 1000 ml snovi (6):

$$I_P = \frac{10 \cdot (n_2 - n_1)}{m}$$

kjer je m masa preiskovanega lipida v gramih, n_1 volumen 0,01 M natrijevega tiosulfata ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) v mililitrih in n_2 volumen 0,01 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ v mililitrih, ki se je porabil pri slepem preskusu (6).

Glede na pričakovano peroksidno število, izberemo zatehto preiskovanega lipida (6):

Pričakovano peroksidno število I_p	Masa preiskovanega lipida (g)
0 do 2	2,00 do 5,00
12 do 20	1,2 do 2,0
20 do 30	0,80 do 1,20
30 do 50	0,500 do 0,800
50 do 90	0,300 do 0,500

JODNO ŠTEVILO

Jodno število je pokazatelj stopnje nenasičenosti olj in s tem prisotnosti dvojnih vezi (5). Nasičena olja, maščobe in voski ne prevzamejo joda, zato je njihovo jodno število nič, za razliko od nenasičenih olj, maščob in voskov, ki jod vežejo. Nenasičene spojine vsebujejo molekule z dvojnimi ali trojnimi vezmi, ki so zelo reaktivne in posledično vežejo jod. Več joda kot je vezanega, večje je jodno število, bolj reaktivni, manj stabilni, mehkejši in bolj dovzetni za oksidacijo so lipidi (10).

Jodno število I_I je število, ki nam pove, koliko gramov halogena, izračunanega kot jod, se pri predpisanih pogojih veže na 100 g preskušane snovi (6):

$$I_I = \frac{1,269 \cdot (n_2 - n_1)}{m}$$

kjer je m masa preiskovanega lipida v gramih, n_1 volumen 0,1 M natrijevega tiosulfata ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) v mililitrih in n_2 volumen 0,1 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ v mililitrih, ki se je porabil pri slepem preskusu (6).

Glede na domnevno jodno število izberemo zatehto preiskovanega lipida (6):

Domnevno jodno število I_I	Količina vzorca (g)
Manj kot 20	1,0
20 do 60	0,5 do 0,25
60 do 100	0,25 do 0,15
Več kot 100	0,15 do 0,10

SAPONIFIKACIJSKO ŠTEVILO

Saponifikacija je hidroliza maščob ali olj, pri čemer nastane glicerol in sol ustrezne maščobne kisline. Saponifikacija pomeni »miljenje« (11).

Saponifikacijsko število I_S je število, ki v miligramih izraža količino kalijevega hidroksida, ki je potreben za nevtralizacijo prostih kislin in za saponifikacijo estrov, prisotnih v 1 g snovi (6).

Če ni drugače predpisano, se za določitev saponifikacijskega števila uporabijo naslednje količine (6):

Domnevno saponifikacijsko število I_S	Količina vzorca (g)
<3	20
3 do 10	12 do 15
10 do 50	8 do 12
40 do 60	5 do 8
60 do 100	3 do 5
100 do 200	2,5 do 3
200 do 300	1 do 2
300 do 400	0,5 do 1

ESTERSKO ŠTEVILO

Estersko število I_E je število, ki v miligramih izraža količino kalijevega hidroksida, ki je potreben za saponifikacijo estrov, prisotnih v 1g snovi. Izračuna se iz saponifikacijskega števila I_S in kislinskega števila I_A (6):

$$I_E = I_S - I_A$$

HIDROKSILNO ŠTEVILO

Je pokazatelj prostih hidroksilnih skupin v vzorcu. Hidroksilno število I_{OH} je število, ki v miligramih izraža količino kalijevega hidroksida, ki je potreben za nevtralizacijo kisline nastale z aciliranjem v 1g snovi (6).

1. 3. KREME

Kreme so poltrdne emulzije tipa olje v vodi (O/V) ali voda v olju (V/O) (8, 9). Medtem ko O/V emulzije običajno vsebujejo 10 % do 15 % oljne faze, pri čemer voda predstavlja zunanjo fazo, V/O emulzije vsebujejo 45 % do 80 % oljne faze (12).

Pomembna aplikacija farmacevtskih emulzij je zdravljenje kože, saj se uporabljajo kot vehikel za dostavo zdravilnih učinkovin, njihova uporaba v kozmetiki pa je namenjena predvsem izboljšanju stanja kože in dostavi aktivnih kozmetičnih snovi (13, 14). V kozmetiki sodijo kreme med najpogostejše dostavne sisteme.

Emulzije so termodinamsko nestabilni sistemi, ki jih tvori zmes dveh tekočin, ki se med seboj ne mešata in tretja faza, ki se imenuje emulgator (15). Vloga slednjih je znižanje medfazne napetosti med oljno in vodno fazo, ki omogoča dispergirano stanje sistema določen čas.

Za poltrdne emulzije je značilna poltrdna konsistenca, sestavljena iz trdnih komponent, ki tvorijo ogrodje in tekočih sestavin, ki so na ogrodje šibko vezane, njena struktura pa se ob aplikaciji poruši (16). So visokoelastični geli, v katerih površinsko aktivne snovi ali njihove zmesi interagirajo same s seboj in/ali z lipofilno ali hidrofilno fazo in tvorijo gel povezavo (17).

1. 3. 1. POVRŠINSKO AKTIVNE SNOVI

Razumno stopnjo fizikalne stabilnosti emulzijskih sistemov skozi čas je mogoče doseči z uporabo ustreznih površinsko aktivnih snovi, koemulgatorjev in drugih aditivov. Vrsta in vsebnost teh komponent kot tudi prisotnost zdravilne učinkovine tako vplivajo na fizikalne lastnosti sistema in posledično na njegovo fizikalno stabilnost. Slednja je predvsem odvisna od parametrov, kot so velikost kapljic dispergirane faze, reološke lastnosti, prevodnost, porazdeljevanje interlamelarne in proste vode v sistemih O/V in spremembe temperature (17). Površinsko aktivne snovi so amfifilne molekule, ki imajo v svoji strukturi tako polaren hidrofilen del kot nepolaren lipofilen del. Porazdeljujejo se med fazama na različne načine in tako znižajo medfazno napetost (18). Stabilen molekularni film površinsko aktivne snovi na medfazi tvori homogeno in stabilno emulzijo (19). Iz tega razloga se površinsko aktivne snovi uporabljajo kot stabilizatorji emulzij ali emulgatorji (18).

Emulgatorje lahko razvrstimo glede na prevladujoč kemijski naboj: anionski, kationski, neionski in amfoterni. Neodvisno od naboja molekule v vodni disperziji ima vsak emulgator poseben mehanizem stabilizacije emulzijskega sistema (15).

Najpogosteje uporabljeni anionski emulgatorji so natrijev lauril sulfat, trietanolamin stearat, alkalijska mila in mila divalentnih in trivalentnih kovin. Kvarterni amonijevi in piridinijevi

emulgatorji (npr. benzalkonijev klorid) so najpogostejši kationski emulgatorji. Med neionskimi emulgatorji se najpogosteje uporabljajo višji maščobni alkoholi: etilen oksid/propilen oksid, blok kopolimeri, alkilpoliglikozidi, estri polietilenglikola z maščobnimi kislinami, mono in digliceridi, karbohidrati, estri in derivati sorbitana. Estri sorbitana z višjimi maščobnimi kislinami so eni od najpomembnejših predstavnikov neionskih emulgatorjev in, so na voljo na tržišču kot Span[®]-i (20, 21).

Poleg Spanov[®] se zelo pogosto uporabljajo tudi polisorbati, ki so kompleksne zmesi estrov sorbitana z višjimi maščobnimi kislinami in etri s polietilenglikoli. Ti so na tržišču na voljo kot Tween[®]-i (22).

Najpogostejši amfoterni emulgatorji so N-alkil derivati preprostih aminokislin kot je glicin, aminopropionska kislina z natrijem, alkil betaini in lecitin oz. fosfolipidi (23).

Mehanizem delovanja estrov sorbitana, ki učinkovito zmanjšajo medfazno napetost, je naslednji: na medfazi olje-voda se verige ogljikovodikov monoestrov sorbitana usmerijo v olje, obroč sorbitana pa na vodno stran. Medfazne in molekulske lastnosti monoestrov sorbitana so glede na literaturne podatke podrobno preučene. Znano je, da dolžina in dvojne vezi v verigi ogljikovodika monoestrov sorbitana bistveno vplivajo na medfazo in molekulske lastnosti teh površinsko aktivnih snovi (19).

Molekulska struktura površinsko aktivne snovi vpliva na reološke lastnosti in stabilnost kreme. Spremembe v reoloških lastnostih (obnovljivo elastično, delno obnovljivo viskoelastično in neobnovljivo viskozno obnašanje) lahko pomenijo nestabilnost in podajajo kvalitativno in kvantitativno informacijo o notranjih povezavah v strukturi kreme (19). Razen na reološke lastnosti, vplivajo značilnost in koncentracija površinsko aktivnih snovi na medfazno energijo površinskega filma, volumski delež dispergirane faze, viskoznost kapljic, porazdelitev velikosti kapljic in tudi na viskoznost in na kemijsko sestavo medija (24).

1. 3. 2. HIDROFILNO-LIPOFILNO RAVNOTEŽJE

Izraz hidrofilno-lipofilno ravnotežje (HLB- hydrophilic-lipophilic balance) je prvi predlagal Clayton in se nanaša na ravnotežje med velikostjo in močjo med hidrofilnim in lipofilnim delom površinsko aktivne snovi. Kasneje je Griffin razvil empiričen koncept HLB vrednosti za površinsko aktivne snovi ali emulgatorje na osnovi njihove topnosti v vodi (25). Ta pristop temelji na deležu med hidrofilnimi in lipofilnimi skupinami v molekuli površinsko aktivne snovi. Pri emulzijah O/V je lipofilna veriga usmerjena v kapljice oljne faze, medtem ko je hidrofilna glava usmerjena proti vodni fazi. Nasprotno je pri emulzijah V/O, pri čemer je hidrofilna glava usmerjena v kapljice vodne faze medtem ko so lipofilne skupine usmerjene v

oljno fazo. Poleg tega je Griffin razvil tudi enostavne enačbe za izračun HLB vrednosti, ki so veljale za enostavne neionske površinsko aktivne snovi (26).

Danes lahko HLB vrednost obravnavamo kot empirično število, ki je dodeljeno površinsko aktivni snovi, ki temelji na osnovi testov topnosti za različne emulzije in površinsko aktivne snovi (25).

HLB vrednost je v območju med 1 in 40 (25). Nižja števila so na splošno dodeljena površinsko aktivnim snovem, ki so topne v olju, višja pa so dodeljena tistim topnim v vodi. Občasno se površinsko aktivne snovi z enakimi HLB vrednostmi razlikujejo v topnosti v vodi. Velik pomen HLB vrednosti je mogoče najti v dveh praktičnih prednostih: številčna vrednost dopušča napovedati tip emulzije, ki lahko nastane: olje v vodi (O/V) ali voda v olju (V/O) in HLB vrednosti v zmesih so aditivne (25):

$$HLB = \sum_i x_i (HLB)_i$$

kjer i označuje i -to komponento neke mešanice. HLB v zmesi površinsko aktivnih snovi je povprečje čistih HLB vrednosti površinsko aktivnih snovi z numeričnim masnim faktorjem identičnih z molarnim deležem x_i . To je osnovni ključ za oblikovanje emulzij. Nekateri avtorji obravnavajo to enačbo kot revolucionarno, ker vpliva na vse vidike teorije nastanka emulzij.

Bilo je več poizkusov, da bi izboljšali opredelitev HLB s konceptualnega vidika. Tako je Davies ocenil HLB vrednost z dodelitvijo prispevkov funkcionalnih skupin v površinsko aktivni snovi po enačbi (25):

$$HLB = \sum_i [chg]_i - \sum_i [lpg]_i + 7$$

kjer je chg prispevek različnih hidrofilnih skupin, lpg pa predstavlja prispevek različnih lipofilnih komponent. Ta enačba je zelo pomembna, saj se uporablja tako za ionske kot neionske površinsko aktivne snovi.

Lin in drugi so nadaljevali izvirno delo Daviesa. Razpravljali so o omejitvah HLB koncepta, medtem ko so drugi avtorji predpostavili nove pojme, kot sta indeks polarnosti in topnostni parameter, da se ohranijo prednosti HLB koncepta (25).

1. 3. 3. SENZORIČNE LASTNOSTI KREM

Danes so raziskave na področju poltrdnih izdelkov vedno bolj inovativne in uspešne, predvsem pa se skušajo popolnoma približati senzoričnim lastnostim, ki jih pričakujejo

potrošniki. Potrošniki na splošno izberejo kremo zaradi njene funkcije, obljube o učinkovitosti ali pa se odločijo na osnovi senzoričnega občutka, ki ga prinaša tekstura (27).

Potrošniki ocenjujejo kakovost izdelkov po senzoričnih merilih, imenovanih »kozmetična eleganca«. Če želimo ugotoviti kozmetično eleganco, izvedemo niz preizkusov s testnimi osebami. Te ocenijo izdelek v skladu z opredeljenimi merili, kot so barva, vonj, videz, absorpcijska sposobnost in splošni občutek po nanosu na kožo. Vendar so ti testi dragi, zamudni in subjektivni (28).

Eden od ciljev raziskav kozmetične elegance je postaviti objektivno oceno in korelacijo z merjenjem fizikalnih parametrov, ki določajo, kakšen občutek na koži sproži kozmetičen izdelek. Reološke lastnosti izdelkov so zelo pomembne, saj vplivajo na konsistenco in mazljivost.

V zadnjih tridesetih letih so poročali o različnih študijah, ki so poskušale najti specifične povezave med različnimi občutki izdelka na koži in njegovimi reološkimi lastnostmi. Brummer in Godersky sta občutek na koži razdelila na dva različna dela:

- primarni občutek na koži, v povezavi s stresom in dinamično viskoznostjo
- sekundarni občutek na koži, v povezavi s stacionarno viskoznostjo za stopnjo striga po koncu aplikacije na kožo (približno 500 s^{-1} za kreme in 5000 s^{-1} za losjone) (27)

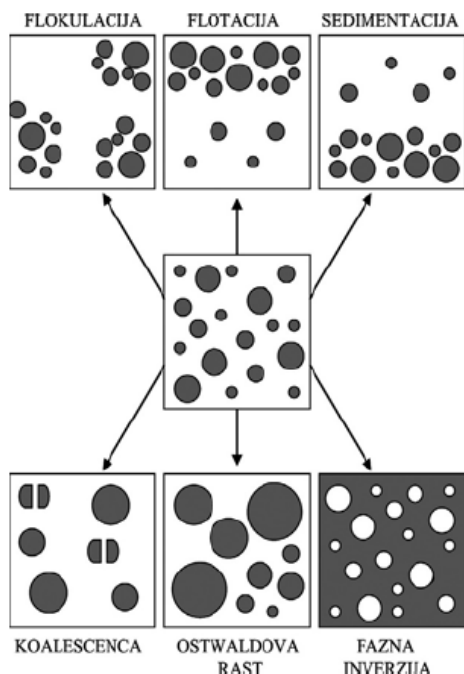
Na senzorične lastnosti izdelkov za nego kože vplivajo predvsem sestavine, kot so emolienti, zgoščevala, emulgatorji in vlažilci. Na splošno velja, da emolienti, ki se v emulzijah uporabljajo v velikih količinah (med 3 in 20 % (v/v)) predstavljajo drugo glavno sestavino za vodo. Emolienti so lahko različnih kemijskih struktur, vključno z estri in silikoni (29). Najpogostejši in najpomembnejši emolienti v kremah so rastlinska olja. Glavna sestavina rastlinskih olj so trigliceridi, ki so estri glicerola s tremi molekulami maščobnih kislin (14). Tiste maščobe, ki so trdne ali poltrdne, se običajno imenujejo masti ali masla, medtem ko tiste, ki so tekoče pri določenih pogojih, imenujemo olja (3). Najpogostejša olja, ki se uporabljajo kot emolienti, so: mandljevo olje, olje mareličnih jedrc, avokadovo in sojino olje, kakavovo in palmovo maslo, idr. Vsebujejo velike količine nenasičenih maščobnih kislin, kot so oleinska, linolna in linolenska kislina (14). Silikona, ki se pogosto uporabljata kot emolienta v kremah, sta dimetikon in ciklodimetikon. Estri (npr. izopropil miristat in izopropil palmitat) in silikoni so hidrofobne spojine, ki predstavljajo del oljne faze, če jih vključimo v kozmetično emulzijo. Kljub dvomljivemu slovesu, najdemo ciklične silikone pogosto v izdelkih za nego kože zaradi njihovih specifičnih lastnosti v primerjavi z drugimi emolienti. Estri pripadajo veliki družini spojin, ki se uporabljajo kot emolienti ali emulgatorji v kozmetičnih emulzijah in jih lahko zamenjamo s silikoni. Glede na njihove fizikalno kemijske

lastnosti so občutki na koži kompleksni in jih je mogoče zaznati med in/ali po nanosu na kožo: drsenje, vlaženje, plastificiranje, zaščita, regeneriranje, mehčanje, glajenje idr. Kar zadeva lastnosti med uporabo na koži, emolienti zmanjšajo koeficient trenja, zaradi njihovih mazalnih lastnosti (29).

1. 3. 4. FIZIKALNA STABILNOST KREM

Dobro je znano, da so kreme termodinamsko nestabilni sistemi (30). Poleg termodinamske nestabilnosti pa se lahko pojavijo še kemična, mikrobiološka in fotokemična nestabilnost. Fizikalna nestabilnost se lahko kaže v različnih časovnih obdobjih in z različnimi fizikalno kemijskimi procesi. (31). Vrste fizikalne nestabilnosti emulzij prikazuje Slika 2, procesi so bolj izraziti pri tekočih emulzijah.

Pojave fizikalne nestabilnosti emulzij lahko razdelimo na reverzibilne (flotacija, sedimentacija, agregacija in flokulacija) in ireverzibilne (Ostwaldova rast in koalescenca) oblike. Reverzibilno nestabilnost lahko odpravimo s stresanjem, pri čemer se emulzija povrne v prvotno stabilno stanje, ireverzibilne stabilnosti emulzij pa ne moremo odpraviti in taka emulzija je nesprejemljiva.



Slika 2: Prikaz fizikalne nestabilnosti emulzij (32)

FLOTACIJA

Je proces, pri katerem se po navadi plovna emulzijska kapljica dvigne do vrha posode, ker se koncentracijski gradient kopiči v sistemu tako, da se večje kapljice hitreje gibljejo proti vrhu vsebnika (če je njihova gostota nižja od medija) (33, 34). Je enak postopek kot sedimentacija, le da poteka v nasprotni smeri (35). Značilna je za emulzijske sisteme O/V, ker je gostota olja po navadi manjša od vode.

Obseg flotacije je mogoče oceniti iz Stokesove enačbe:

$$v = \frac{2r^2(\rho - \rho_0)g}{9\eta}$$

kjer je v hitrost nastanka flotacije, r polmer kapljic, ρ gostota dispergirane faze (kapljic), ρ_0 gostota disperznega medija, η viskoznost disperznega medija in g lokalni gravitacijski pospešek.

Iz Stokesove enačbe je razvidno, da je pojav flotacije manjši, če je premer kapljic manjši, če je večja viskoznost disperznega medija in čim manjša mora biti razlika med gostotama oljne in vodne faze. Majhna velikost kapljic izboljšuje stabilnost emulzij, saj Brownovo gibanje lahko zadošča za premagovanja gravitacije (36).

Flotacija je povečana, če se velikost kapljic poveča zaradi flokulacije ali koalescence (37). Pogosto flotacija povzroči, da se kapljice zblížajo, zato pride do agregacije in koalescence (38).

SEDIMENTACIJA

Sedimentacija je posledica delovanja zunanjih sil, po navadi gravitacijske ali centrifugalne sile. Kadar te sile presežejo termično gibanje kapljic (Brownovo gibanje), se koncentracijski gradient kopiči v sistemu tako, da se večje kapljice hitreje gibljejo proti dnu (če je njihova gostota večja, kot je gostota medija) vsebnika (34). Sedimentacija je značilnejša za V/O emulzije.

Zaradi poltrdne konsistence so kreme manj izpostavljene pojavi sedimentacije kot tekoče emulzije. Prav tako kot hitrost nastanka flotacije, tudi hitrost sedimentacije opisuje Stokesova enačba.

FLOKULACIJA

Flokulacijo povzročijo van der Waalove privlačne sile, ki nastanejo, ko ni dovolj odboja med kapljicami in Ostwaldovo zorenje, ki nastane zaradi razlik v kemijskem potencialu med majhnimi in velikimi kapljicami (33).

Flokulacija je reverzibilen zgodnji proces razpada emulzij, pri čemer se dve ali več kapljic držijo skupaj in tvorijo agregate, brez da bi izgubili svojo integriteto (39).

KOALESCENCA

Se pojavi, če sta dve kapljici zelo blizu in se združita zaradi poškodbe medfaznega filma. Takoj, ko se film prekine, se dve kapljici združita v večjo kapljico, kar je posledica lokalno višjega Laplaceovega tlaka. Iz tega razloga olje priteka v mesta, kjer je tlak nižji. Olje nato prevzame obliko krogle, ker ta daje najnižji možen Laplaceov tlak (40). Oljne kapljice, ki nastanejo, so tako velike, da jih ni več mogoče redispersirati in tako je koalescenca ireverzibilen pojav fizikalne nestabilnosti, ki se ne sme pojaviti pri farmacevtskih in kozmetičnih emulzijah (37).

Delna koalescenca je pojav, kjer maščobni kristal iz ene od delno kristalinične kapljice prodre v matriks tekočine in/ali v tekočo regijo druge delno kristalinične kapljice. Dokazano je bilo, da prisotnost strižnih sil povečuje stopnjo trkov med kapljicami in tako vodi do večje težnje do delne koalescence. Med delno koalescenco kapljice ohranijo obliko, vendar molekularni stik kapljic vodi do npr. rasti kristalov. Delno koalescenca je težko identificirati, ker mikroskopski pregled kapljic ne kaže tega pojava (zlasti pri emulzijah, ki vsebujejo velike količine frakcij) (13).

OSTWALDOVA RAST

Molekule dispergirane faze se transportirajo iz manjših v večje, zaradi razlik v Laplacevem tlaku. Laplace je navedel, da je tlak na konkavni strani ukrivljenega stičišča večji kot tlak na konveksni strani, v razsežnosti, ki je sorazmerna z medfazno napetostjo pomnoženo s krivino; za kroglo se krivina podaja kot recipročna vrednost njenega radija. Posledica tega je večja topnost manjših kapljic v kontinuirani fazi. Zato se majhni delci skrčijo (in bodo s časoma izginili), večji pa se povečujejo v še večje delce. To je najlažje predvideti pri plinskih mehurčkih, vendar velja tudi za kapljice (in trdne delce). Hitrost, pri kateri bo prišlo do transporta, je sorazmerna topnosti olja v kontinuirani fazi (40).

Ostwaldova rast predstavlja ireverzibilno obliko fizikalne nestabilnosti. Pojav preprečimo tako, da so kapljice dispergirane faze čim manjše in čim bolj enotne velikosti.

1. 3. 5. VREDNOTENJE FIZIKALNE STABILNOSTI KREM

Kreme kot termodinamsko nestabilen sistem lahko izkazujejo različne oblike fizikalne nestabilnosti. Z razvojem nove formulacije želimo preprečiti to obliko nestabilnosti in zagotoviti kakovostno kozmetično kremo, ki bo ostala fizikalno nespremenjena do deklariranega roka uporabnosti. V ta namen imamo na voljo različne metode, s katerimi bomo napovedali oz. bomo zaznali morebitno obliko fizikalne nestabilnosti.

Erós in sodelavci so raziskavo strukture kreme razdelili na več korakov, ki se časovno ne morejo ločiti in se med seboj prekrivajo. Prvi korak predstavljajo reološke metode. Z rotacijsko in oscilacijsko viskozometrijo pojasnjujejo vlogo površinsko aktivnih snovi pri oblikovanju koherentne strukture, vlogo emulgirane vode v strukturi in vpliv povečanja deleža vode. S pomočjo termične analize so pojasnili, da se voda v strukturi kreme lahko določi kot interlamelarno vezana in prosta »bulk« voda. Naslednji sklop raziskave predstavlja razvoj strukturne teorije. V prvi znanstveni teoriji je koherentna struktura kreme razložena s tvorbo kompleksa emulzijskega para. Po Barryjevi teoriji je struktura sistemov sestavljena iz površinsko aktivnih snovi, dolgo verižnih alkoholov in vode. Lamelarna teorija o mikrostrukturi krem povzema rezultate rentgenske difrakcije, mikroskopije, elektronske mikroskopije, termične analize, diferencialne dinamične kalorimetrije in reoloških študij. Voda predstavlja zunanjo fazo kreme, zato je mogoče najti med dvoplastjo, vodo vezano v gel fazo in »bulk« vodo. Pozornost so posvetili strukturnemu pregledu krem. Omembe vredne in pomembne rezultate so dosegli s hkratno uporabo reologije in termogravimetrije. Z reološkimi metodami bi bilo mogoče izbrati optimalno kombinacijo površinsko aktivnih snovi (41).

1. 3. 5. 1. POSPEŠENI TESTI STARANJA

Namen pospešenih testov staranja je, da napovemo fizikalno stabilnost kreme. Pripravljeni so na osnovi pospešenega razpada formulacije. Tako lahko v kratkem časovnem obdobju in cenovno ugodno določimo fizikalno stabilnost končnega izdelka.

Študije stabilnosti krem temeljijo na pospešenih testih (centrifugiranje, toplotna izpostavljenost s temperaturo shranjevanja v razponu 0 °C do 60 °C) stabilnosti (31). Termični stres lahko spremeni parametre, kot so viskoznost, olajša penjenje, povzroči koalescenco, taljenje voska ali hidratacijo polimerov. Sprememba temperature je glavni parameter, ki povzroči hitre kemijske in fizikalne spremembe v formulacijah, kar se običajno določi s kvantifikacijo nekaterih komponent skozi daljše časovno obdobje (42).

Številni proizvodni procesi, ki vključujejo mešanje ali črpanje, vplivajo na mikrostrukturo, tako da povzročijo destabilizacijo emulzije, kar lahko zmanjša rok uporabnosti kreme in učinkovitost končnega izdelka. Iz teh razlogov nestabilnost pospešimo z različnimi tehnikami:

- izpostavljanje formulacije temperaturnim spremembam (zamrzovanje, taljenje)
- uporaba velikih centrifugalnih sil za odkrivanje ločevanje emulzije
- uporaba reoloških strižnih napetosti
- izpostavljanje emulzij vibracijam in mikroskopski pregled umetno staranih emulzij (13)

Tudi AFNOR (Association Française de Normalisation- Francoska nacionalna organizacija za standardizacijo in njena mednarodna organizacija za člane) standardi ne zagotavljajo veliko informacij, razen, da se shranjevanje izvede pri 23 ± 2 °C in da so vzorci izpostavljeni temperaturnemu območju med 0 °C in 40 °C za nekaj tednov, pri čemer jih primerjamo z vzorci, ki so izpostavljeni temperaturi okolice (31).

1. 3. 5. 2. REOLOŠKE LASTNOSTI

Spremembe v reoloških lastnostih kreme predstavljajo pomembna zgodnja opozorila o fizikalni nestabilnosti pripravljene formulacije (43).

Reološke meritve niso pomembne samo za ocenitev fizikalne stabilnosti, ampak odražajo tudi kakovost in uporabnost poltrdnega sistema. Študije teh lastnosti so postale pomembno orodje za analizo poltrdnih pripravkov, zaradi možnosti izdelave točnega profila fizikalne in strukturne stabilnosti (42). Reološke meritve zagotavljajo informacije o fizikalni stabilnosti emulzij. Dejavniki, ki nadzorujejo reologijo emulzij so:

- reologija zunanje faze
- narava delcev/kapljic (njihova porazdelitev velikosti, deformacija, notranja viskoznost in koncentracija)
- narava interakcij med delci/kapljicami (33)

Kreme so eden najbolj zahtevnih sistemov za vrednotenje reoloških lastnosti, ker imajo hkrati viskozne in elastične lastnosti, ki odražajo njihovo notranjo strukturo. Notranja struktura bistveno vpliva na videz, fizikalno stabilnost in transport zdravilne učinkovine. Pretočne lastnosti teh sistemov so med najbolj pomembnimi fizikalnimi lastnostmi iz osnovnega in aplikativnega vidika. Na osnovni ravni so reološke lastnosti emulzije neposredni znak različnih interakcijskih sil, ki se pojavljajo v sistemu. Uporaba reologije je ključnega pomena pri nekaterih industrijskih aplikacijah, ker je zelo uporabna lastnost za kvantitativno analizo

surovin ali končnih izdelkov. Zato je sposobnost merjenja, prilagajanja in predvidevanje reoloških lastnosti bistvenega pomena (17).

1. 3. 5. 3. ANALIZA VELIKOSTI KAPLJIC

Z analizo velikosti kapljic lahko zaznamo potencialno nestabilno formulacijo, še preden se izrazito spremenijo drugi parametri. Fizikalno stabilnost emulzij je mogoče oceniti s pregledom stopnje koalescence, ki se pojavi v določenem časovnem obdobju.

Srednja velikost kapljic emulzije se s časom povečuje in s tem se njihovo število zmanjšuje, za kar se domneva, da je vzrok koalescenca. Zato je mogoče primerjati stopnjo koalescence različnih emulzij z meritvami spremembe v velikosti in številu kapljic. Najpogosteje se za analizo velikosti kapljic uporabljajo mikroskop, elektronski števec delcev (kot je Coulter števec), prav tako pa je mogoče analizirati velikost kapljic s pomočjo laserske difrakcije (21).

Optična mikroskopija je verjetno najbolj natančna med obstoječimi metodami za določanje velikosti kapljic. Glavna prednost optične mikroskopije je direktnost metode, z enostavno kalibracijo in dobro razumljivimi omejitvami, ki so posledica valovne dolžine svetlobe. Mikroskop se pogosto uporablja v kombinaciji s tehnikami za analizo slike, katere izboljšajo kakovost slike in natančnost določanja velikosti kapljic.

Vendar pa konvencionalna optična mikroskopija zahteva redčenje vzorca (navadno 1 volumski % dispergiranih kapljic), je zamudna in zahteva izkušenega operaterja za pridobitev natančnih rezultatov. Nekoliko novejša je metoda konfokalnega skenirajočega laserskega mikroskopa, kjer lahko uporabljamo nerazredčene emulzije z visokim volumskim deležem kapljic. Ta mikroskop je precej drag, poleg tega pa je običajno potrebno obarvanje vzorca s fluorescentnimi barvili. Iz teh razlogov se optična mikroskopija za določitev velikosti kapljic uporablja v znanstvene namene, kjer so potrebni zelo natančni rezultati (44).

1. 3. 5. 4. ELEKTRIČNA PREVODNOST

Meritve prevodnosti se zdi primerna metoda za določitev stabilnosti emulzij. Prevodnost je občutljiva na majhne spremembe v frakciji dispergirane faze (45).

Volumski delež dispergirane faze emulzije lahko prikladno določimo z merjenjem njene električne prevodnosti (ϵ). Električna prevodnost vode je veliko večja kot električna prevodnost olja. Tako se električna prevodnost zmanjša, če se poveča količina olja v emulziji (46). Poleg tega električna prevodnost narašča s temperaturo (47). V razredčenih emulzijah je volumski delež dispergirane faze, ki je povezan z električno prevodnostjo, podan z enačbo:

$$\Phi = \left(\frac{\varepsilon_e - \varepsilon_1}{\varepsilon_e + 2\varepsilon_1} \right) \left(\frac{\varepsilon_2 + 2\varepsilon_1}{\varepsilon_2 - \varepsilon_1} \right)$$

pri čemer se indeksi 1, 2 in e nanašajo na kontinuirano in dispergirano fazo oz. emulzijo. Bolj kompleksni izrazi za določanje električnih lastnosti so izpeljani v povezavi z volumskim deležem dispergirane faze koncentrirane emulzije (46).

2. NAMEN DELA

Namen magistrske naloge bo razvoj, izdelava in vrednotenje fizikalne stabilnosti dnevne vlažilne kreme s polhovim oljem, ki se že od nekdaj uporablja v ljudski medicini.

Najprej bomo izbrali sestavine kreme, primerne za uporabo v kozmetiki. Poudarek bo na emulgatorju, ki ga bomo izbrali glede na optimalno HLB vrednost, ki jo bomo predhodno določili z izdelavo emulzij. Uporabili bomo emulgatorja iz zmesi Span[®] 80 in Tween[®] 80, ki se pogosteje uporabljata v farmacevtskih pripravkih in iz zmesi Cremophor[®] RH 40 in Cremophor[®] EL, ki sta pogostejša v kozmetičnih izdelkih. Pripravljeno kremo bomo organoleptično ocenili. Poleg tega pa bomo ovrednotili še njeno fizikalno stabilnost, tako da jo bomo izpostavili cikličnim temperaturnim obremenitvam, pri katerih se spreminja temperatura shranjevanja (40 °C, 4 °C, sobna temperatura) in normalnemu testu staranja (pri sobni temperaturi) ter pospešenemu testu staranja, ki ga bomo izvajali pri nižani temperaturi v hladilniku (4 °C) in povišani temperaturi v termostatu (40 °C).

Omenjenim vzorcem bomo izmerili pH, električno prevodnost in viskoznost. Vzorcem, ki bo izpostavljen cikličnim obremenitvam, bomo meritve opravili po desetih ciklih, vzorcem, ki bodo izpostavljeni testu izotermnega staranja pa v naslednjih časovnih intervalih: po 3, 7, 14, 30, 45, 60, 75 in 90 dneh hranjenja pri določeni temperaturi.

S primerjavo rezultatov bomo ugotovili, katera krema ima boljše organoleptične lastnosti in je bolj stabilna glede na izbran emulgator.

3. MATERIALI IN METODE

3. 1. MATERIALI

3. 1. 1. NAPRAVE

Preglednica I: Uporabljena laboratorijska oprema

OPREMA	OZNAKA	PROIZVAJALEC
analitska tehtnica	XS 205 Duo Range	Mettler Toledo, Švica
centrifugirka	322 A	Tehtnica, Železniki, Slovenija
DCS analizator	DSC1 STAR ^e System	Mettler Toledo, Švica
hladilnik (4 °C)		Gorenje, Slovenija
homogenizator	T-25 ULTRA TURRAX [®]	IKA [®] , Nemčija
konduktometer	MC 226	Mettler Toledo, Švica
pH meter	Seven Compact	Mettler Toledo, Švica
pipete		Brand, Nemčija
pipetor	macro [™]	Brand, Nemčija
reometer	MCR 301	Anton Paar Physica, Avstrija
precizna tehtnica	AJ	Vibra, Tuning-fork Balance, Japonska
termostat (40 °C)	SP-45	Kambič, Slovenija
vibracijski stresalnik	Vibromix 10	Tehtnica, Železniki, Slovenija
vodna kopel		GFL, Nemčija

3. 1. 2. KEMIKALIJE

Preglednica II: Uporabljene kemikalije

KEMIKALIJA	PROIZVAJALEC
cetostearol, p. a.	Lex d. o. o., Slovenija
cremophor EL, p. a.	BASF
cremophor RH 40, p. a.	Sigma Aldrich, Nemčija
ciklodimetikon, p. a.	Lex d. o. o., Slovenija
dimetikon, p. a.	Lex d. o. o., Slovenija
etanol (96 %), p. a.	Kefo d. o. o. Slovenija
fenolftalein, p. a.	Riedel de Haën, Nemčija
glicerol, p. a.	Lex d. o. o., Slovenija
hanus reagent (0,1 M jodov bromid), p. a.	Merck, Nemčija
izopropil miristat, p. a.	Lex d. o. o., Slovenija
jodna raztopina, p. a.	Merck, Nemčija
jojoba olje, p. a.	Lex d. o. o., Slovenija
kalijev hidroksid (0,1 M) , p. a.	Merck, Nemčija
kloroform, p. a.	Merck, Nemčija
ledocetna kislina, p. a.	Merck, Nemčija
mandljevo olje, p. a.	Lex d. o. o., Slovenija
natrijev tiosulfat (0,1 M in 0,01 M) , p. a.	Merck, Nemčija
olivno olje	Lex d. o. o., Slovenija
petroleter, p. a.	Merck, Nemčija
polhovo olje, l. 2011	
Span 80, p. a.	Merck, Nemčija
škrob, p. a.	Merck, Nemčija
Tween 80, p. a.	Sigma Aldrich, Nemčija

3. 2. METODE

3. 2. 1. DOLOČANJE ZAHTEVANEGA HLB ZA LIPOFILNO FAZO

Pripravili smo 5 g emulzije z določenimi HLB vrednostmi v intervalu od 10 – 15 (6 različnih vzorcev). Sestavo emulzij prikazuje Preglednica III. Vse emulzije smo izdelali po enakem postopku. V 50 mL centrifugirko smo odmerili 3,77 g prečiščene vode in 0,300 g emulgatorske zmesi z določeno HLB vrednostjo. Kot emulgatorsko zmes smo uporabili zmes Spana 80 in Tweena 80 v razmerju, kot ga zahteva določen HLB. Izdelali smo emulgatorske

zmesi s HLB vrednostmi od 10 do 15. Vsebino centrifugirke smo homogeno pomešali z rotor-stator homogenizatorjem (T-25 ULTRA TURRAX®). Nato smo polhovo olje postopoma vmešali v vodno fazo (2 dodatka po 0,460 g). Po vsakem dodatku oljne faze, smo vsebino centrifugirke mešali z rotor-stator homogenizatorjem s hitrostjo 8000 obratov/min, približno 1 minuto. Po ustreznem času (15-60 min) smo vizualno ocenili videz in stabilnost emulzij.

Preglednica III: Recepture emulzij z zahtevanimi HLB vrednostmi od 10-15

HLB		10	11	12	13	14	15
emulgatorske zmesi							
Oljna faza (g)		0,92	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92
Emulgatorska zmes (g)	Span 80	0,136	0,109	0,082	0,055	0,027	0
	Tween 80	0,164	0,191	0,218	0,245	0,273	0,300
Prečiščena voda (g)	3,77	3,77	3,77	3,77	3,77	3,77	3,7

3. 2. 2. DOLOČANJE KEMIČNIH KONSTANT POLHOVEGA OLJA

KISLINSKO ŠTEVILO

2 g polhovega olja smo raztopili v mešanici enakih volumskih deležev alkohola R in petroletra R. Dodali smo 0,5 mL indikatorja fenolftaleina R1. Vzorec smo segrevali nad 90⁰C, da se je polhovo olje popolnoma raztopilo. Ko se je polhovo olje raztopilo, smo vsebino erlenmajerice titriral z 0,02 M KOH, dokler se ni pojavila roza barva vsaj za 15 s (n: mL titranta- 0,02 M KOH). Ker je bilo potrebno za popolno raztapljanje polhovega olja segrevanje nad 90⁰C, smo to temperaturo vzdrževali tudi med titriranjem.

JODNO ŠTEVILO

0,15 g polhovega olja smo natehtali v 250 mL erlenmajerico z obrusom, opremljeno s steklenim zamaškom, ki smo jo predhodno sušili oz. splaknili z ledocetno kislino R, dodali smo 15 mL kloroforma R in pomešali, da se je zatehtano polhovo olje raztopilo. Nato smo počasi dolili 25 mL Hanus reagenta. Erlenmajerico smo zamašili in jo ovili z alufolijo, da je bila vsebina zaščitena pred svetlobo. Med tem časom smo erlenmajerico pogosto pretresli, da se je vsebina dobro premešala. Po 30 min smo dodali 10 mL raztopine kalijevega jodida R, s

koncentracijo 100 g/L in 100 mL vode R. Vsebino erlenmajerice smo nato po kapljicah titrirali z 0,1 M natrijevim tiosulfatom, dokler se rumeno obarvana raztopina skoraj ni razbarvala. Nato smo dodali 5 mL škrobne raztopine R in nadaljevali s titriranjem, dokler se raztopina ni popolnoma razbarvala (n_1 : mL natrijevega tiosulfata). Pod enakimi pogoji smo izvedli tudi slepi preskus (n_2 : mL natrijevega tiosulfata), pri katerem v erlenmajerico nismo zatehtali polhovega olja.

PEROKSIDNO ŠTEVILO

2 g polhovega olja smo natehtali v 250 mL erlenmajerico z obrusom, opremljeno s steklenim zamaškom. Dodali smo 30 mL zmesi kloroform R: ledocetna kislina R= 2:3 (v/v). Erlenmajerico smo pokrili s steklenim zamaškom in jo rahlo stresali, da se je polhovo olje popolnoma raztopilo. Nato smo dodali 500 μ L nasičene raztopine kalijevega jodida R, nakar smo erlenmajerico stresali 1 minuto. Po točno 1 minuti stresanja smo dodali 30 mL vode R. Vsebino erlenmajerice smo nato med intenzivnim krožnim mešanjem po kapljicah titrirali z 0,01 M natrijevim tiosulfatom, dokler se rumena raztopina skoraj ni razbarvala. Nato smo dodali 5 mL škrobne raztopine R in ob intenzivnem krožnem mešanju vsebine erlenmajerice nadaljevali s titriranjem, dokler se raztopina ni popolnoma razbarvala (n_1 : mL 0,01 M natrijevega tiosulfata). Pod enakimi pogoji smo izvedli tudi slepi preskus (n_2 : mL 0,01 M natrijevega tiosulfata), pri katerem v erlenmajerico nismo zatehtali polhovega olja. Volumen porabljenega 0,01 M natrijevega tiosulfata pri titriranju slepega vzorca ni smel presežati 0,1 mL.

3. 2. 3. IZDELAVA KREM

Izdelali smo 30 g kreme po recepturah, ki jih prikazuje Preglednica IV. Vse kreme smo izdelali po enakem postopku, in sicer tako, da smo natehtali lipofilne komponente skupaj z emulgatorsko zmesjo s HLB 10, ki je bila sestavljena iz 46 % Spana 80 in 54 % Tweena 80, v pateno. Natehtane komponente smo segrevali na vodni kopeli na 70 °C, da so se trdne komponente stalile. V čašo smo natehtali še glicerol in vodo in ju segreli na enako temperaturo kot lipofilne komponente. Segreto vodno fazo smo vmešali v lipofilno in s pestilom mešali do ohladitve do homogene kreme. Izdelane kreme smo nato izpostavili stresnim testom (centrifugiranje pri različnih obratih in kombinacija segrevanja in centrifugiranja), da smo ocenili njihovo fizikalno stabilnost.

V izdelane kreme nismo vgradili aktivne sestavine, polhovega olja, ampak smo izdelali prazne podlage, ki bodo osnova, za nadaljnjo formulacijo kreme. Izdelane podlage so bile sestavljene iz 33 % oljne faze (9,9 g), 6 % emulgatorske zmesi (1,8 g) in 61 % vode (18,3 g).

Preglednica IV: Recepture izdelanih krem za stresna testiranja fizikalne stabilnosti

KREMA	1	2	3	4	5	6	7	8
SESTAVINA (%)								
olivno olje	25	20	10	10	15	10	7	12
jojoba olje		3	10	8	6	3		5
mandljevo olje						10	12	7
cetostearol	5	5	8	5	6	5	8	3
dimetikon		2	2	2	3	2	3	3
izopropilmiristat				5				
emulgatorska zmes	6	6	6	6	6	6	6	6
glicerol	3	3	3	3	3	3	3	3
voda	61	61	61	61	61	61	61	61

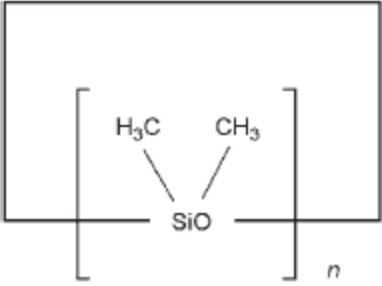
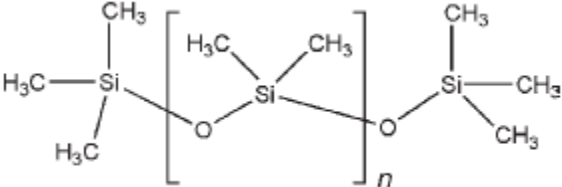
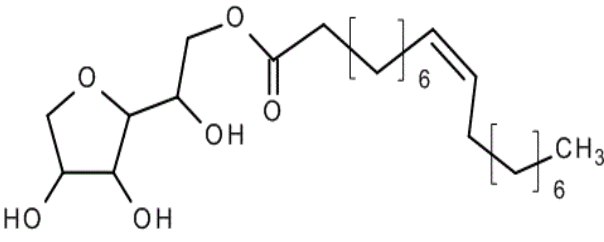
3. 2. 3. 1. ZGRADBA IN VLOGA SESTAVIN V KREMAH

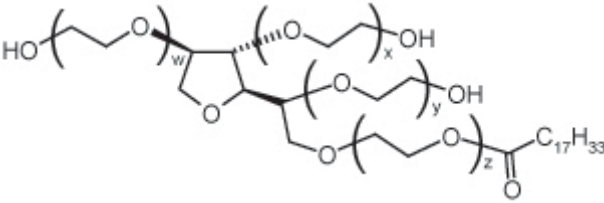
V kremah, ki smo jih izdelali po recepturah, podanih v Preglednici IV, smo uporabili sestavine, ki imajo navedeno kemijsko sestavo in vlogo (Preglednica V). V optimiziranih recepturah smo kot aktivno sestavino uporabili polhovo olje.

Preglednica V: Kemijska sestava in vloga sestavin v kremah

(48, 49, 50, 51, 52, 53)

Uporabljena sestavina	Kemijska sestava	Vloga v kremi
Cetostearol	mešanica trdnih alifatskih alkoholov, v glavnem oktadekan-1-ola in heksadekan-1-ola živalskega ali rastlinskega izvora	sredstvo za povečanje viskoznosti, lipofilni koemulgator

Cremonphor EL	glavna sestavina je gliceril-polietilen-glikol-ricinolat	neionska površinsko aktivna snov
Cremonphor RH 40	glavna sestavina je gliceril-polietilen-glikol-hidroksi stearat	neionska površinsko aktivna snov
Ciklodimetikon		emolient, sredstvo za povečanje viskoznosti
Dimetikon		emolient
Glicerol	propan-1, 2, 3-triol	emolient, vlažilec
Izopropilmiristat	1-metiletil tetradekanoat	emolient, oljni vehikel
Jojoba olje	tekoči vosek, ester C ₂₀ -C ₂₂ nenasičenih maščobnih kislin z nenasičenimi alifatskimi alkoholi podobne dolžine	emolient
Mandljevo olje	trigliceridi pretežno oleinske kisline, z manjšimi količinami linolne in palmitinske kisline	emolient
Olivno olje	mešanica gliceridov oleinske kisline (83,5 %), palmitinske (9,4 %), linolne (4,0 %), stearinske (2,0 %) in ikozanoične kisline (0,9 %)	oljni vehikel
Span 80		neionska površinsko aktivna snov

Tween 80		neionska površinsko aktivna snov
-----------------	--	----------------------------------

3. 2. 3. 2. STRESNI TESTI ZA IZBIRO OPTIMALNE PODLAGE

Za izbiro optimalne podlage, v katero smo naknadno vgradili polhovo olje, smo kot del stresnih testov uporabili centrifugiranje pri različnih obratih in segrevanje. Centrifugalno silo uporabimo z namenom, da pospešimo fizikalno nestabilnost, pri kateri pride do ločitve vodne in oljne faze emulzije.

Vseh osem izdelanih podlag smo izpostavili centrifugiranju pri različnih pogojih:

- 2500 obratov, 10 minut
- 3500 obratov, 10 minut
- segrevanje podlage pri 50 °C, 30 minut, ohlajanje na sobno temperaturo, nato centrifugiranje pri 3500 obratih, 10 minut

Stabilne podlage smo dodatno centrifugirali še pri 4000 obratih, 10 minut.

Na podlagi teh stresnih testov smo izbrali najbolj stabilne podlage, ki smo jih uporabili za nadaljnje načrtovanje formulacije.

3. 2. 2. 3. OPTIMIZIRANJE RECEPTURE KREM

S preliminarnim testiranjem stabilnosti podlage, na osnovi centrifugiranja in preverjanjem organoleptičnih lastnosti smo izmed vseh osmih receptur izbrali KREMO 3, ki smo jo še nadalje optimizirali. Pripravili smo 5 novih receptur, pri čemer smo ponovili stresno centrifugiranje in kombinacijo segrevanja in centrifugiranja. Preskušane recepture so se razlikovale po deležih posameznih sestavin, ki so navedeni v Preglednici VI. V najstabilnejšo novo recepturo smo vgradili 5 % polhovega olja.

Preglednica VI: Preglednica sestave optimiziranih receptur KREME 3

KREMA SESTAVINA (%)	3a	3b	3c	3d	3e
olivno olje	10	10	8	10	8

jojoba olje	6	4	7	6	3
cetostearyl	5	7	5	3	4
dimetikon	4	4	5	6	5
emulgatorska zmes	6	6	6	6	6
glicerol	4	4	4	4	7
voda	65	65	65	65	67

3. 2. 4. VREDNOTENJE FIZIKALNE STABILNOSTI OPTIMIZIRANIH KREM

Na podlagi preliminarnega stresnega centrifugiranja smo izbrali recepturo PODLAGE 3a, v katero smo vgradili polhovo olje. Izdelali smo dva krat po 100 g kreme, pri čemer smo pri prvih dveh kremah (VZOREC 1: Vzorec 1 1. del, Vzorec 1 2. del) uporabili emulgatorsko zmes s HLB 10, ki je sestavljena iz 46 % Spana 80 in iz 54 % Tweena 80 in smo ju določili na osnovi eksperimentalnega določanja zahtevanega HLB. Za primerjavo smo uporabili še drugo emulgatorsko zmes, sestavljeno iz, Cremophorja RH 40 in Cremophorja EL v razmerju 1:1 (VZOREC 2: Vzorec 2 1. del, Vzorec 2 2. del). Slednja emulgatorja sta zelo pogosta v kozmetičnih izdelkih, zato smo ju tudi vključili v študijo. V obeh vzorcih smo uporabili 5 % polhovega olja (v ta namen smo zmanjšali delež ostalih lipofilnih komponent) in 6% emulgatorske zmesi in ju izpostavili različnim testom staranja za vrednotenje fizikalne stabilnosti.

IZOTERMNI TESTI STARANJA

Izotermni testi se izvajajo pri povišani ali znižani temperaturi skozi celotno obdobje staranja. Izdelane kreme (VZOREC 1 in VZOREC 2) smo razdelili na 4 dele, z namenom, da bo vsak del shranjen pri določeni temperaturi za obdobje treh mesecev (90 dni), oziroma podvržen cikličnim obremenitvam. Del vzorca smo hranili pri sobni temperaturi, del v hladilniku pri 4 °C, del v termostatu na 40 °C. Po naprej določenem časovnem intervalu smo staranim kremam shranjenih, pri določenih pogojih določili pH, električno prevodnost in viskoznost.

NEIZOTERMNI TESTI STARANJA/CIKLIČNE TEMPERATURNE OBREMENITVE

Ciklične temperaturne obremenitve predstavljajo stresne pogoje in nam lahko hitro dajo informacije o fizikalni stabilnosti pripravljene formulacije.

Obe kremi (VZOREC 1 in VZOREC 2) smo izpostavili cikličnim temperaturnim obremenitvam. Vzorec je bil izpostavljen 24 ur 40 °C, nato smo ga prestavili v hladilnik na 4

$^{\circ}\text{C}$ za 24 ur in ga nato še shranili za 24 ur pri sobni temperaturi. Izvedli smo takih 10 ciklov. Po 10. ciklih smo staranim vzorcem določili pH, električno prevodnost in viskoznost.

MERJENJE pH IZDELANIM KREMAM

Kremam, v katere smo vgradili polhovo olje, in smo jih hranili pri različnih temperaturnih pogojih, smo po naprej določenem časovnem načrtu izmerili pH. Meritve pH smo opravljali v naslednjih časovnih intervalih: sveže pripravljenim formulacijam (t_0), po 3, 7, 14, 30, 45, 60, 75 in 90 dneh hranjenja pri določeni temperaturi. Kremam, ki so bile izpostavljene cikličnim obremenitvam, pa smo pH izmerili po 10 ciklih. Uporabili smo pH meter Seven Compact. pH smo izmerili pri sobni temperaturi tako, da smo elektrodo potopili v kremo in odčitali rezultat. Med posameznimi meritvami smo elektrodo dobro očistili s prečiščeno vodo, vendar je elektroda vseeno morala ostati rahlo vlažna. Po končanem merjenju smo elektrodo potopili v pufer s pH 7,0.

DOLOČANJE ELEKTRIČNIH LASTNOSTI IZDELANIM KREMAM

Istim vzorcem, ki smo jim izmerili pH, smo v enakem časovnem razporedu izmerili tudi električno prevodnost. Kot merilno napravo smo uporabili konduktometer MC 226. Meritve smo opravljali pri sobni temperaturi. Električno prevodnost smo izmerili tako, da smo elektrodo potopili v kremo in jo dobro premešali ter odčitali rezultat. Med posameznimi meritvami smo elektrodo dobro očistili in obrisali, saj ta mora ostati suha, ker drugače vpliva na izmerjeno prevodnost.

MERJENJE VISKOZNOSTI KREM

Istim vzorcem, ki smo jim določili pH in električno prevodnost, smo izmerili tudi viskoznost po enakem časovnem razporedu. Za določanje viskoznosti smo uporabili reometer MCR 301, Anton Paar Physica. Uporabili smo senzorni sistem stožec-ploščica CP50-2 (premer: 49,96 mm, kot $2,001^{\circ}$), pri temperaturi 23°C in strižni hitrosti 0-50 1/s v času 200 s.

Na ploščico smo nanесли približno 1 g kreme. Ko smo nanесли kremo, se je stožec spustil na ploščico. S sočasnim vrtenjem stožca se je risala krivulja odvisnosti viskoznosti od strižne hitrosti. Izmerili smo 30 točk, pri čemer je strižna hitrosti linearno naraščala od 0-50 1/s v času 200 s.

3. 2. 5 DSC ANALIZA

Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC) je med najpogostejšimi tehnikami, ki se uporabljajo v farmacevtskem razvoju za karakterizacijo potencialnih zdravilnih učinkovin, intermediatov, pomožnih snovi in prototipov zdravila. Uporablja se za merjenje entalpijskih sprememb, ki so posledica fizikalnih in kemijskih sprememb v odvisnosti od temperature ali časa (38). Podatki, ki jih pridobimo s toplotno spremembo pri DSC omogočajo preučevanje ključnih lastnosti materialov, kot je fazna sprememba (taljenje, steklast prehod), stabilnost (npr. razgradnja), polimorfna identifikacija, interakcije (npr. zdravilna učinkovina- pomožna snov) itd (39).

Tehnika omogoča identifikacijo in karakterizacijo snovi, je hitra, zelo občutljiva in preprosta za uporabo. Za analiziranje je potrebno samo nekaj miligramov vzorca (38).

DSC analizo smo opravili z namenom, da bi ugotovili, kaj je vzrok za razpad pripravljenih formulacij. Analizirali smo posamezne sestavine in že pripravljene formulacije (sveže pripravljene in tiste, ki so bile podvržene pospešenemu staranju, ki so bile shranjene pri 40 °C, 4 °C in pri sobni temperaturi in tiste, ki so bile podvržene cikličnim obremenitvam). Za analizo smo uporabili analizator DSC1 STAR^o System, Mettler Toledo.

Vzorci smo natančno natehtali v aluminijaste lončke. Mase vzorcev so bile natehtane na 2 decimalni mesti natančno in sicer od 8,82 mg do 27,68 mg. Dobro zaprt aluminijast lonček smo vstavili v kalorimetrično celico in ohlajali od 20 °C do -70 °C (z zamrzovanjem) s hitrostjo -2 K/min.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4. 1. ZAHTEVANE HLB VREDNOSTI ZA LIPOFILNO FAZO

Ker smo želeli pripraviti emulzijo tipa O/V, smo pričakovali, da bo ustrezna HLB vrednost emulgatorske zmesi v območju med 10 in 15. Zahtevana HLB vrednost, ki smo jo določili za lipofilno fazo, je tista, pri kateri je emulzija najbolj stabilna. To pomeni, da moramo za stabilizacijo emulzij uporabiti emulgatorje, katerih HLB vrednosti so najbolj podobna HLB vrednosti. Ker po navadi z enim samim emulgatorjem tega ni mogoče doseči, uporabljamo v ta namen zmesi emulgatorjev. V naši magistrski nalogi smo izbrali dva neiogena emulgatorja, in sicer Tween 80, s HLB 15 in Span 80 s, HLB 4. Izračunali smo kolikšen delež enega in drugega potrebujemo, da bo HLB v zmesi v intervalu od 10 – 15.

Emulzije smo pripravili tako, da smo združili vodno fazo in emulgatorsko zmes z določeno HLB vrednostjo, ter ju homogeno premešali z rotor-stator homogenizatorjem. Na koncu smo v dveh korakih dodali še polhovo olje in ponovno homogeno premešali. Po izdelavi so bile vse emulzije homogene mlečne barve, ne glede na HLB emulgatorske zmesi. Pripravljene emulzije smo nato pustili stati in spremljali čas, v katerem so ostale homogenega videza. Kriterij za izbiro najustreznejše emulgatorske zmesi je bil čim daljši čas do opažene ločitve faz emulzije. Rezultati so prikazani Preglednici VII.

Preglednica VII: Čas razpada emulzije glede na HLB emulgatorske zmesi

HLB emulgatorske zmesi	Čas ločbe faz emulzije (min)
10	40
11	30
12	27
13	18
14	19
15	10

Iz rezultatov je razvidno, da čas, potreben za razpad emulzij, pada z naraščajočim HLB. Visoke vrednosti HLB, ki napovedujejo prevladujoč hidrofilen delež emulgatorske zmesi, zato za naše emulzije niso primerne. Kot najbolj stabilna emulzija se je izkazala emulzija z emulgatorsko zmesjo s HLB 10, pri kateri je prišlo do ločbe faz najkasneje, in sicer po 40 minutah. Emulgatorska zmes je bila sestavljena iz 54 % Tweena 80 in iz 46 % Spana 80. Ta

HLB smo zato izbrali kot primeren HLB za kremo, ki bo kot lipofilno fazo vsebovala polhovo olje.

4. 2. KEMIČNE KONSTANTE POLHOVEHA OLJA

Polhovemu olju smo po določilu 8. Evropske farmakopeje določili kislinsko število, peroksidno število in jodno število. Te vrednosti nam podajo informacije o kakovosti uporabljenih lipidnih komponent. Rezultati so zbrani v Preglednici VIII.

Preglednica VIII: Kemične konstante polhovega olja

Kemična konstanta	Vrednost
kislinsko število	11,142
peroksidno število	-
jodno število	119,27

Vrednost kislinskega števila polhovega olja je 11,142. V primerjavi z maksimalno vrednostjo kislinskega števila olivnega in mandljevega olja (Ph Eur), ki je enako 2,0, določeno na 5,0 g olja, so vrednosti kislinskega števila polhovega olja precej višje, kar nakazuje na večje deleže prostih maščobnih kislin v olju (6).

Peroksidnega števila polhovemu olju nismo mogli določiti, kar kaže na to, da v olju ni prisotnih peroksidov, torej ni prišlo do kvarjenja olja. Vrednost jodnega števila znaša 119,27. Vrednost nad 100 predstavlja rezultat, ki je pričakovan glede na zatehtano količino vzorca. Večje je jodno število, več je v olju prisotnih prostih in zaestrenih nenasičenih maščobnih kislin. To pomeni večje tveganje za oksidacijsko kvarjenje.

4. 3. IZBOR OPTIMALNE PODLAGE ZA VGRADITEV POLHOVEGA OLJA

Izdelali smo osem podlag tipa O/V s HLB vrednostjo 10, da bi ugotovili, katera podlaga je fizikalno najbolj stabilna in bi bila primerna za izdelavo kreme s polhovim oljem. Vse izdelane podlage so bile sestavljene iz enakih deležev posameznih faz, in sicer: 33 % oljne faze, 6 % emulgatorske zmesi in 61 % vode, razlikovale pa so se glede na uporabljene komponente in njihov delež v lipofilni fazi, vendar smo ohranjali vedno enak skupen delež (33 %). Sestavine smo izbirali glede na to, kako bodo vplivale na konsistenco kreme in na njene organoleptične lastnosti. Natančna sestava podlag je navedena v Preglednici IV. Za izbiro najstabilnejše podlage smo izvedli preliminarno stresno testiranje s centrifugiranjem, ki

pospeši fizikalno nestabilnost, saj lahko hitro opazimo, če je prišlo do ločitve faz emulzije. Vzorce smo centrifugirali 10 minut pri 2500 in 3500 obratih. Še bolj obremenjujoča metoda kot samo centrifugiranje, je kombinacija predhodnega segrevanja na 50 °C in naknadnega centrifugiranja. Rezultate stresnega testiranja izdelanih krem prikazuje preglednica IX.

Preglednica IX: Rezultati preliminarnega stresnega testiranja stabilnosti krem

POGOJI IZVAJANJA KREMA	2500 obratov/min, 10 minut	3500 obratov/min, 10 minut	Segrevanje na 50 °C 30 minut, ohlajanje, 3500 obratov/min, 10 minut	4000 obratov/min, 10 minut
1	nespremenjena struktura	drobne oljne kapljice na površini	olje na površini	
2	nespremenjena struktura	drobne oljne kapljice na površini	olje na površini	
3	nespremenjena struktura	nespremenjena struktura	nespremenjena struktura	manjša ločitev v konici epruvete (svetlejša barva)
4	ločitev v konici epruvete (svetlejša barva)	ločitev v konici epruvete (svetlejša barva)	ločitev v konici epruvete, na površini je opazno olje	
5	nespremenjena struktura	na površini so opazne drobne oljne kapljice	manjša ločitev v konici epruvete (svetlejša barva)	manjša ločitev v konici (svetlejša barva)
6	nespremenjena struktura	na površini so opazne drobne oljne kapljice	manjša ločitev v konici epruvete (svetlejša barva)	manjša ločitev v konici epruvete (svetlejša barva), na površini je opazno olje
7	nespremenjena struktura	na površini so opazne drobne oljne kapljice	manjša ločitev v konici epruvete (svetlejša barva)	manjša ločitev v konici epruvete (svetlejša barva)
8	popolna ločitev faz, sp. plast je svetlejša kot zgornja	opazne so 3 plasti, ki se razlikujejo po barvi	opaznih je 6 plasti, ki se razlikujejo po barvi	

Najboljši rezultat pri stresnih testih centrifugiranja sta izkazovali KREMI 3 in 7. Kot sekundarni kriterij izbora najprimernejše podlage smo upoštevali tudi organoleptične lastnosti, glede na katere sta bile obe kremi sprejemljivi. KREMA 3 je bila homogena, svetlo rumene barve, primerne konsistence, zelo dobro se je razmazala in koži dajala prijeten občutek. KREMA 7 je bila homogena, bele barve zaradi večjega deleža mandljevega olja, gostejše konsistence, na koži se je dobro razmazala.

Odločili smo se, da bomo za nadaljnji razvoj izbrali KREMO 3, zaradi nekoliko boljših rezultatov stresnih testov centrifugiranja. KREMA 7 je namreč izkazovala nestabilnost že pri 3500 obratih/min, saj so bile na površini opazne drobne kapljice olja, manjšo ločitev v konici epruvete smo opazili tudi po segrevanju in po nadaljnjem centrifugiranju.

V nadaljevanju smo tako optimizirali recepturo KREME 3, da bi dobili kozmetično sprejemljivejši izgled kreme. Recepturo smo optimizirali tako, da smo zmanjšali delež oljne faze in povečali delež vodne faze. Glede na to, da smo delež vodne faze pri vseh kremah povečali samo za 4 % oz. pri KREMI 3a za 6 %, pri načrtovanju optimizacije nismo računali, da bo to imelo opazen vpliv na stabilnost. Prvotna receptura KREME 3 je bila sestavljena iz: 10% olivnega in 10 % jojoba olja, 8% cetostearola, 2 % dimetikona, 6 % emulgatorske zmesi, 3 % glicerola in 61 % vode. Optimizirane recepture prikazuje Preglednica VI.

Izdelane kreme smo ponovno centrifugirali, da bi ocenili njihovo fizikalno stabilnost. Rezultate prikazuje Preglednica X.

Preglednica X: Preliminarno stresno testiranje stabilnosti optimiziranih receptur KREME 3

POGOJI IZVAJANJA KREMA	2500 obratov/min, 10 minut	3500 obratov/min, 10 minut	Segrevanje na 50 °C 30 minut, ohlajanje, 3500 obratov/min, 10 minut
3a	nespremenjena struktura	manjša ločitev v konici epruvete (svetlejše barve)	manjša ločitev v konici epruvete (svetlejše barve)
3b	nespremenjena struktura	manjša ločitev v konici epruvete (svetlejše barve)	manjša ločitev v konici epruvete (svetlejše barve)
3c	nespremenjena struktura	manjša ločitev v konici epruvete (svetlejše barve)	manjša ločitev v konici epruvete (svetlejše barve)
3d	nespremenjena	ločitev faz: olje na	ločitev faz: olje na

	struktura	površini	površini
3e	nespremenjena struktura	ločitev faz: olje na površini	ločitev faz: olje na površini

Po centrifugiranju smo takoj izločili recepturi KREM 3d in 3e , saj je do ločitve prišlo že po 10 minutah centrifugiranja pri 3500 obratih. Ostale tri KREME 3a, 3b in 3c so izkazovale po stresnem testiranju približno enake rezultate, zato smo jim ocenili tudi senzorične lastnosti. Kot najbolj primerno recepturo za vgraditev polhovega olja smo izbrali KREMO 3a, v katero smo vgradili polhovo olje, v obsegu 5 %. Dodatek polhovega olja je šel na račun zmanjšanja deleža olivnega olja (iz 10 % na 8 %) in jojoba olja (iz 6 % na 3 %), tako, da je celokupen delež lipofilne faze in s tem razmerja med hidrofilno in lipofilno fazo ostal enak.

Receptura z vgrajenim polhovim oljem je naslednja:

Olivno olje	8 %
Jojoba olje	3 %
Polhovo olje	5 %
Cetostearol	5 %
Dimetikon	4 %
Emulgatorska zmes	6 %
Glicerol	4%
Voda	65 %

Ker smo želeli dodatno primerjavo izbrane emulgatorske zmesi s Spanom 80 in Tweenom 80, ki se pogosto uporabljata v farmaciji, smo pripravili dve različici kreme, ki smo ju poimenovali VZOREC 1 in VZOREC 2. VZOREC 1 je kot emulgatorsko zmes vseboval že omenjeno zmes Spana 80 in Tweena 80 s HLB 10, ki je sestavljena iz 46 % Spana 80 in 54 % Tweena 80. VZOREC 2 pa je kot emulgatorsko zmes vseboval zmes Cremophorja RH 40 (s HLB 14 – 16) in Cremophorja EL (s HLB 12 – 14), ki se pogosteje uporabljata v kozmetičnih izdelkih, v razmerju 1:1. Ta emulgatorska zmes ima višjo HLB vrednost (približno 14), kot izbrana emulgatorska zmes Spana 80 in Tweena 80.

Obe pripravljene kremi smo izpostavili testom, s katerimi smo vrednotili fizikalno stabilnost.

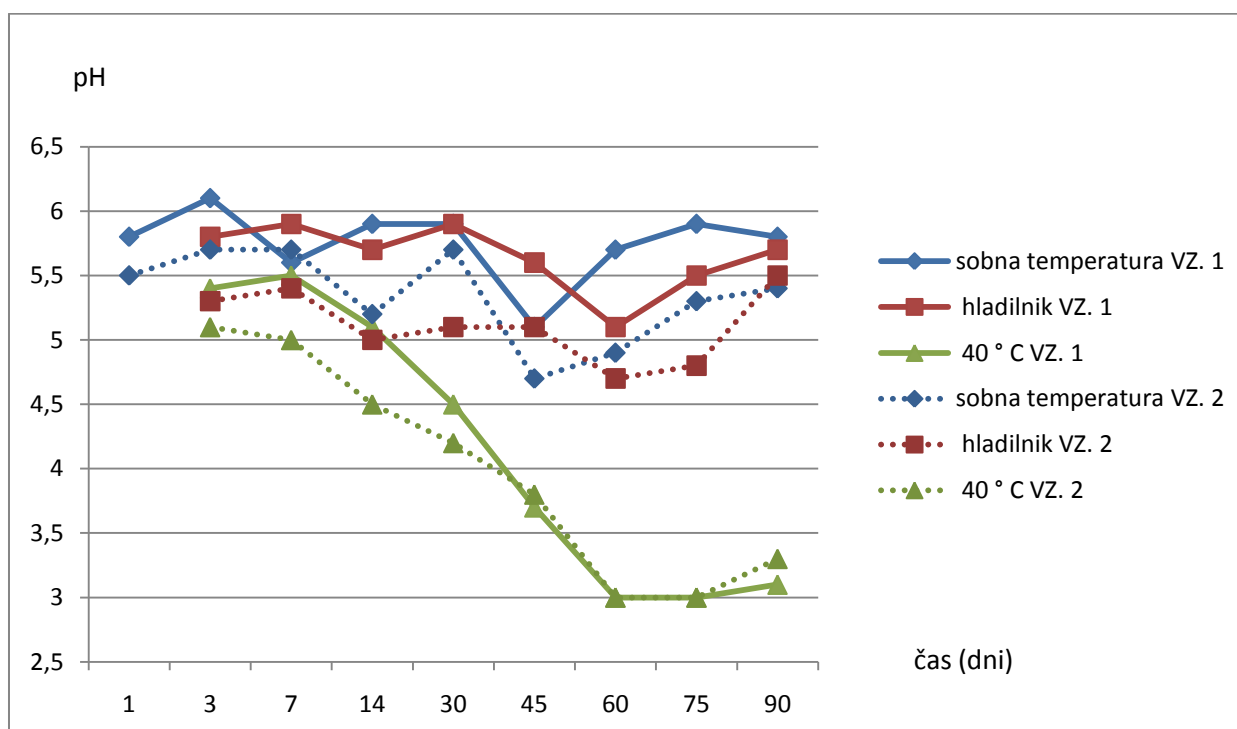
4. 4. FIZIKALNA STABILNOST

4. 4. 1. IZOTERMNO STARANJE

Izdelane kreme smo 3 mesece (90 dni) hranili na sobni temperaturi, v hladilniku pri 4 °C in v termostatu pri 40 °C. Po naprej določenem časovnem načrtu smo staranim kremam pri določenih pogojih izmerili pH, električno prevodnost in viskoznost, s katerimi smo ovrednotili njihovo fizikalno stabilnost.

pH

Rezultate meritev pH za VZOREC 1 in VZOREC 2 (od VZORCA 1 razlikuje samo v emulgatorski zmesi), ki sta bila starana pri različnih pogojih, prikazuje Slika 3.



Slika 3: Odvisnost pH od časa pri različnih pogojih staranja za VZOREC 1 in VZOREC 2

Iz Slike 3 je razvidno, da je pH VZORCA 1, ki je bil staran pri sobni temperaturi in v hladilniku v območju med 5,1 in 6,0. Najnižjo vrednost pH pri sobni temperaturi (5,1) smo izmerili 45. dan, najvišjo pa 3. dan, in sicer 6,0. Območje pH je fiziološko sprejemljivo,

nihanja pa pripisujemo eksperimentalni napaki. Potrebno je poudariti, da so razlike med pH vrednostmi minimalne. Podobni zaključki veljajo tudi za pH vzorca, ki smo ga shranjevali v hladilniku. Najbolj se je pH spreminjal vzorcu, ki je bil shranjen pri 40 °C. Izmerili smo pH vrednosti v intervalu med 3,0 in 5,7. pH je začel padati 30. dan shranjevanja, ko smo izmerili vrednost 4,5, najnižji vrednosti 3,0 pa smo izmerili 60. in 75. dan. Možen vzrok za padanje pH vrednosti je mikrobiološka kontaminacija vzorca, saj pri izdelavi nismo uporabili konzervansov.

Slika 3 prikazuje tudi, kako se je pH VZORCA 2 spreminjal skozi časovno obdobje 90 dni. Kremi, ki sta bili shranjeni na sobni temperaturi in v hladilniku pri 4 °C imata sprejemljive pH vrednosti, ki omogočajo aplikacijo kreme na kožo. pH vrednosti vzorca, shranjenega pri sobni temperaturi se gibljejo od 4,7 do 5,7 (najnižjo vrednost smo izmerili 45. dan), medtem ko so pH vrednosti vzorca, shranjenega v hladilniku med, 4,8 in 5,5 (najnižjo vrednost smo izmerili 60. dan, najvišjo pa 90. dan). Spremembe pH med shranjevanjem pri teh pogojih tako ocenjujemo kot minimalne in jih pripisujemo eksperimentalni napaki. pH kreme, ki je bila shranjena v termostatu pri 40 °C, je padal od 14. dne opravljanja meritev. Izmerili smo vrednost 4,5, ta vrednost pa s staranjem še pada do 3,0. Pri zadnji meritvi pa smo opazili rahel porast pH vrednosti na 3,3. Tudi pri tem vzorcu, je lahko tako kot pri VZORCU 1, možen vzrok za tako močno znižanje pH razrast mikroorganizmov, saj pri izdelavi kreme nismo uporabili konzervansov.

Če primerjamo oba vzorca, imata ob pripravi približno enak pH (VZOREC 1 5,8, VZOREC 2 5,5). Prav tako so razlike v spremembah pH pri shranjevanju pri sobni temperaturi in v hladilniku enakega reda velikosti, iz česar sklepamo, da uporabljen emulgator ne vpliva bistveno na pH kreme.

Če primerjamo oba vzorca (VZOREC 1 in VZOREC 2) opazimo, da se pri obeh kremah, ki sta bili shranjeni pri 40 °C, pH vrednost niža neodvisno od uporabljene emulgatorske zmesi, in sicer vse do vrednosti 3,0.

V literaturi je naveden variabilen pH kože, ki pa se nahaja v pretežno kislem območju med 4,0 in 7,0. (54). Čez dan se pH kože na nekaterih delih telesa spreminja (npr. podlahet). pH kože je višji zvečer in nižji ponoči. Med poletjem je pH kože običajno 0,5 nižji, kot med ostalim delom leta (12).

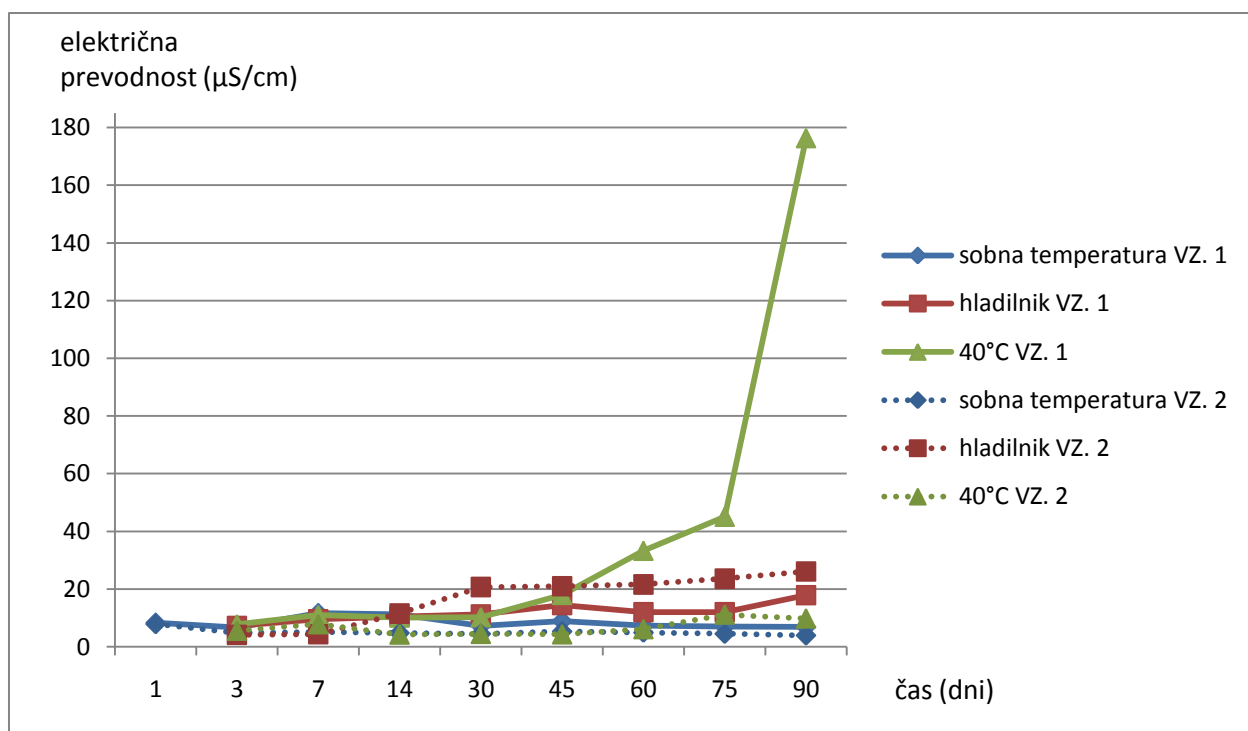
Kisel pH kože je rezultat fiziologije človeškega telesa, ki endogeno regulira kožno floro. Koža najbolje zagotavlja habitat za mikroorganizme, ki pod normalnimi pogoji varujejo kožo pred patogenimi mikroorganizmi. Znanih je veliko endogenih in eksogenih dejavnikov, ki vplivajo na pH kože: npr izločki znojnic in lojnic, anatomsko mesto, vlaga kože, genetski dejavniki in

starost. Tudi komponente pasivnega metabolizma, ki vključujejo proste maščobne kisline, holesterol fosfat, urokaninsko kislino, pirolidon karboksilno kislino prispevajo h kislemu pH kože (12). Poleg predhodne uporabe kozmetičnih izdelkov, predvsem mil, ki imajo velik vpliv na površinski pH kože, tudi vodovodna voda s pH vrednostjo okoli 8,0 poveča pH kože. Šele po 6 urah se bo pH kože vrnil na »naravno« vrednost, ki znaša okoli 5,0. Dokazano je bilo, da je koža s pH vrednostjo pod 5,0 v boljšem stanju, kot koža s pH vrednostjo nad 5,0, kar je prikazano z merjenjem biofizikalnih parametrov (barierna funkcija, vlaženje in luščenje) (12). To je razlog, da pri izdelavi kozmetičnih pripravkov stremimo k temu, da ne porušimo naravnega kislega pH kože. Če uporabljamo mila, ki imajo alkalen pH, ta ni tako problematičen, saj ostane milo v stiku s kožo malo časa, ker ga izpremo. Nato pa po navadi nanesemo kremo ali drug negovalni izdelek, ki ponovno vzpostavi kisel pH kože (34).

ELEKTRIČNA PREVODNOST

Merjenje električne prevodnosti je primerna metoda za določitev stabilnosti emulzij (45). Električna prevodnost vode je veliko večja kot električna prevodnost olja (46). Tako je električna prevodnost emulzij O/V večja kot emulzij V/O. Za fizikalno stabilne sisteme je zaželeno, da so vrednosti med staranjem čim manj spreminjajo. Istim vzorcem, ki smo jim določili pH, smo v enakih časovnih intervalih določili tudi električno prevodnost.

Rezultate opravljenih meritev električne prevodnosti za VZOREC 1 in VZOREC 2 prikazuje Slika 4.



Slika 4: Odvisnost električne prevodnosti od časa pri različnih pogojih staranja za VZOREC 1 in VZOREC 2

Iz Slike 4 je vidno, da je električna prevodnost VZORCA 1, staranega pri sobni temperaturi nihala od 6,72 do 11,63 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Najvišjo vrednost električne prevodnosti smo izmerili 7. dan (11,63 $\mu\text{S}/\text{cm}$). Podobne vrednosti smo izmerili tudi pri kremi, ki je bila starana pri 4 $^{\circ}\text{C}$. Najnižjo električno prevodnost smo izmerili 3. dan, in je znašala 7,2 $\mu\text{S}/\text{cm}$, na kar so vrednosti naraščale, najvišjo smo izmerili 90. dan 17,87 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Pri obeh pogojih shranjevanja so vrednosti električne prevodnosti sicer nihale, vendar so bile spremembe minimalne. Pri kremi, ki je bila starana na 40 $^{\circ}\text{C}$, so bile vrednosti električne prevodnosti primerljive do 30. dne, večje spremembe pa so bile opazne 45. dan, ko se je električna prevodnost povečala na 18,0 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Vrednost zadnje meritve (90. dan) je znašala 176,3 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Pri tem vzorcu smo lahko že organoleptično ocenili, da je prišlo do ločitve faz kreme.

Slika 4 nam prikazuje, kako se je električna prevodnost VZORCA 2 spreminjala s časom shranjevanja. VZORCU 2, ki je bil shranjen pri sobni temperaturi, smo najvišjo vrednost izmerili sveže pripravljene formulaciji (7,86 $\mu\text{S}/\text{cm}$) in najnižjo 90. (3,95 $\mu\text{S}/\text{cm}$) dan shranjevanja. Med tem časom so bile vrednosti bolj ali manj podobne. Električna prevodnost kreme starane v hladilniku, se je bistveno povečevala s časom staranja. Najnižjo vrednost smo izmerili 3. dan (4,14), najvišjo pa 90. dan (26,1 $\mu\text{S}/\text{cm}$). Največji porast vrednosti električne

prevodnosti opazimo med 14. in 30. dnevom staranja. Možen vzrok za tako velike spremembe v električni prevodnosti je porušenje strukture kreme. Ko smo vzorec vzeli iz hladilnika, smo organoleptično opazili, da krema ni ostala stabilna. Pričakovali bi, da bo vzorec v hladilniku ostal bolj trdne konsistence, kot pri sobni temperaturi, bilo je pa ravno nasprotno, saj je bil bolj tekoč, kot vzorec, ki je bil staran na 40 °C.

Vzorcu, staranem pri 40 °C, se vrednosti električne prevodnosti niso bistveno spreminjale, bile so med 4,25 in 6,14 $\mu\text{S}/\text{cm}$, povišano vrednost smo izmerili 75. dan in sicer 11,15 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

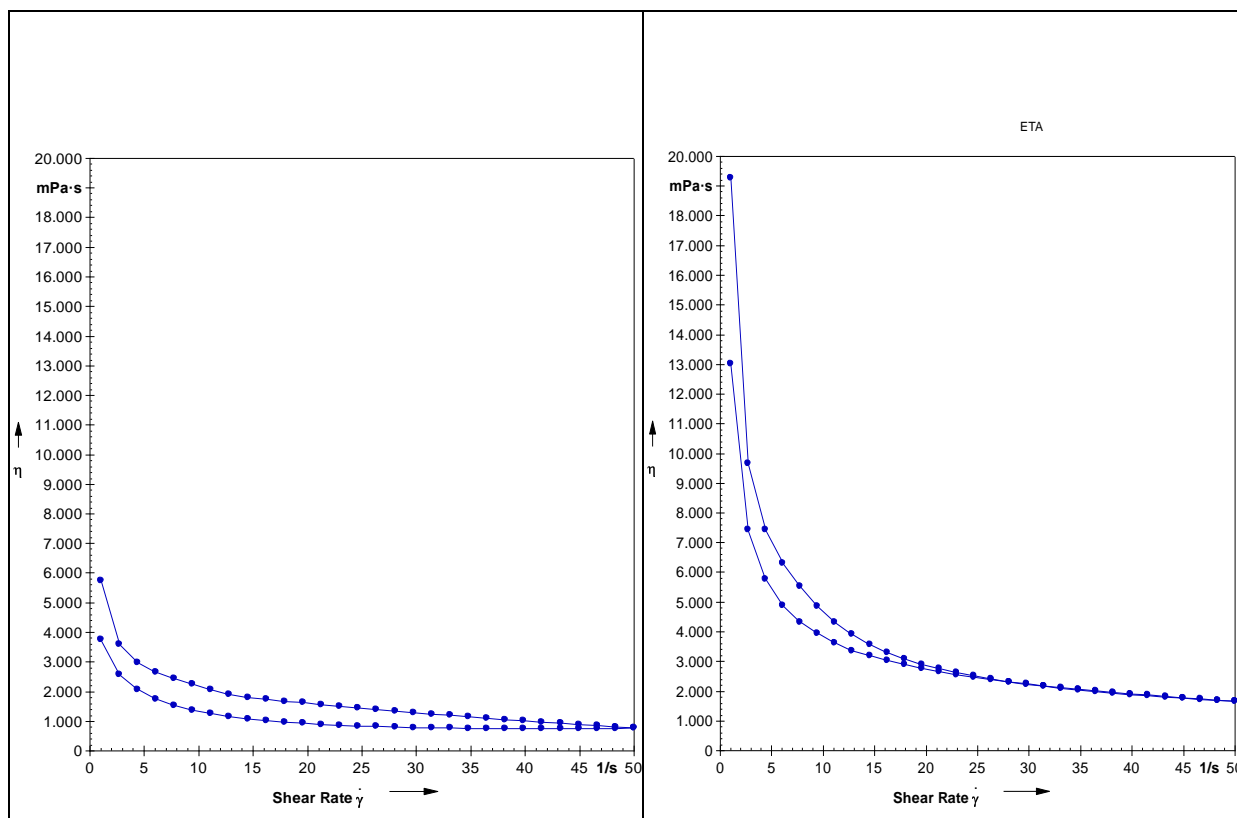
Vzorca ob izdelavi izkazujeta približno enake vrednosti električne prevodnosti (VZOREC 1 8,31 $\mu\text{S}/\text{cm}$, VZOREC 2 pa 7,86 $\mu\text{S}/\text{cm}$). Če primerjamo gibanje vrednosti električne prevodnosti, ki smo jih izmerili med staranjem pod določenimi pogoji, opazimo, da je do največje spremembe prišlo pri VZORCU 1, ki je bil shranjen na 40 °C. Pri tem vzorcu smo že organoleptično opazili, da je prišlo do razplastitve vzorca. Tudi pri VZORCU 2, ki je bil shranjen v hladilniku, smo opazili spremenjeno konsistenco kreme, kar se je odražalo tudi v meritvah električne prevodnosti.

VISKOZNOST

Merjenje viskoznosti se uporablja kot močno orodje za oceno fizikalne stabilnosti. Krema so neidealni ne-Newtonovi sistemi, kar pomeni, da je njihova viskoznost odvisna od obremenitve (mehanske sile) (21). Povečini izkazujejo plastično ali pseudoplastično reološko obnašanje, za katerega je značilno, da se viskoznost z naraščajočo strižno obremenitvijo zmanjšuje. Da snovi stečejo, je potrebna določena sila, kar je značilno za plastične sisteme.

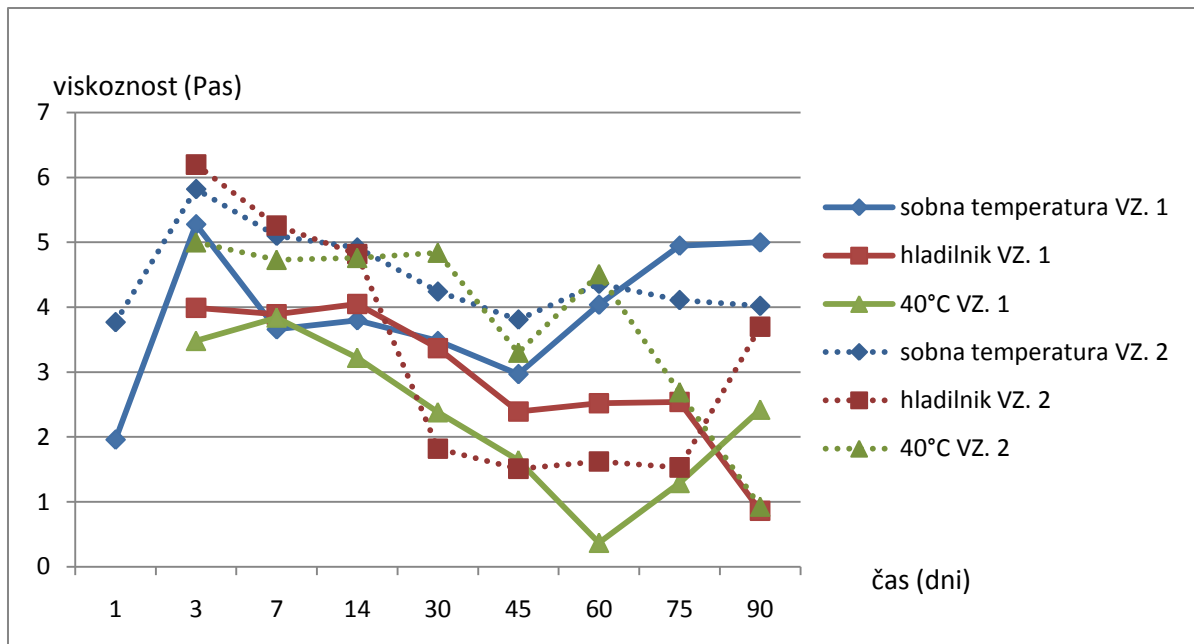
Rezultat reološkega vrednotenja je reogram, ki prikazuje spremembe viskoznosti ali strižne napetosti od strižne hitrosti. Ker so celotne krivulje za spremljanje fizikalne stabilnosti manj primerne, smo se odločili, da bomo prikazali samo določeno vrednost viskoznosti v odvisnosti od časa. Izbrali smo vrednosti pri strižni hitrosti 9,45 s^{-1} , kjer se pri večini vzorcev pojavi prevoj viskoznostne krivulje.

Reograma VZORCEV 1 in 2 prikazuje Slika 5. Oba vzorca izkazujeta pseudoplastično reološko obnašanje. Iz krivulj je razvidno, da se viskoznost zmanjšuje z naraščajočo strižno hitrostjo. Viskoznosti VZORCA 1 so v celotnem območju strižnih hitrosti manjše, kot pri VZORCU 2. Vzrok za tako velike razlike viskoznosti sveže pripravljenih vzorcev lahko pripišemo različnim emulgatorskima zmesema, ki različno vplivata na strukturo sistemov, katere odraz je viskoznost. Sklepamo, da so interakcije v primeru uporabljenih emulgatorjev Cremophorjev močnejše.



Slika 5: Reogram sveže pripravljene vzorca (t_0): levo VZOREC 1, desno VZOREC 2

Kot že omenjeno, smo za spremljanje fizikalne stabilnosti obeh vzorcev izbrali samo eno vrednost viskoznosti pri strižni napetosti 9, 45 s^{-1} down krivulje. Večje spremembe vrednostih nakazujejo spremembo strukture poltrdnih sistemov in so dober indikator za napovedovanje dolgoročne fizikalne stabilnosti. Rezultate v spremembah viskoznosti v odvisnosti od časa za VZOREC 1 in Vzorec 2 prikazuje Slika 6.



Slika 6: Odvisnost viskoznosti od časa za VZOREC 1 in VZOREC 2, ki sta bila starana pri različnih pogojih

Viskoznost VZORCA 1 se je sicer nekoliko spreminjala, vendar so spremembe viskoznosti za vzorca, ki sta bila shranjena pri sobni temperaturi in v hladilniku samo nekaj Pas, kar ocenjujemo kot nepomembno. Nestabilnost kreme bi lahko napovedale vrednosti do 60. dne, pri vzorcu shranjenem pri 40 °C. Rezultati se ujemajo z organoleptičnim pregledom, saj smo lahko opazili da je prišlo do razpada kreme, saj je bila očitno opazna ločitev faz kreme.

Viskoznost VZORCA 2, staranega pri sobni temperaturi se je ves čas shranjevanja rahlo zniževala. Izmerjene viskoznosti se gibljejo od 2 Pas do 6 Pas, kar je zanemarljiva sprememba viskoznosti. Krema, starana pri 40 °C ima viskoznost okrog 4,7 Pas, občutno znižana je 45. in 90. dan, kar je verjetno posledica prehitrega opravljanja meritev po odvzemu vzorca iz termostata. Zato ne moremo z gotovostjo reči, da je prišlo do porušnje strukture kreme. Na nestabilnost kreme nakazuje krivulja vzorca, staranega v hladilniku. Po organoleptični oceni je bila ta krema zelo tekoča, kar je v nasprotju s pričakovanji glede na pogoje hranjenja. Viskoznost se je znižala po 30 dneh, vzroka pa za enkrat ne znamo pojasniti.

4. 4. 2. NEIZOTERMNO STARANJE

S temperaturnim ciklanjem, ki je stresna oblika testiranja fizikalne stabilnosti, lahko v kratkem časovnem obdobju dobimo pomembne informacije o fizikalni stabilnosti izdelka.

Termični stres lahko spremeni parametre, kot so viskoznost, olajša penjenje, povzroči koalescenco, taljenje voska ali hidratacijo polimerov. Sprememba temperature je glavni parameter, ki povzroči hitre kemijske in fizikalne spremembe v formulacijah (42).

Test s cikličnimi obremenitvami smo izvedli tako, da smo oba vzorca (VZOREC 1 in VZOREC 2) izpostavili za 24 ur na 40 °C, ga prestavili za 24 ur na 4 °C in še za 24 ur na sobno temperaturo. To je predstavljalo en cikel. Po desetih ciklih smo vzorcema vrednotili enake fizikalne parametre kot pri izotermnem staranju: pH, električno prevodnost in viskoznost, ki smo jih primerjali z vrednosti sveže pripravljenih formulacij v času $t_0 = 0$.

Rezultate meritev fizikalnih parametrov v času $t_0 = 0$ in po 10. ciklih za VZOREC 1 in VZOREC 2 prikazujejo Preglednica XI, Slika 7 in Slika 8.

Preglednica XI: Vrednosti fizikalnih parametrov sveže pripravljenih vzorcev in po 10. ciklu za VZOREC 1 in VZOREC 2

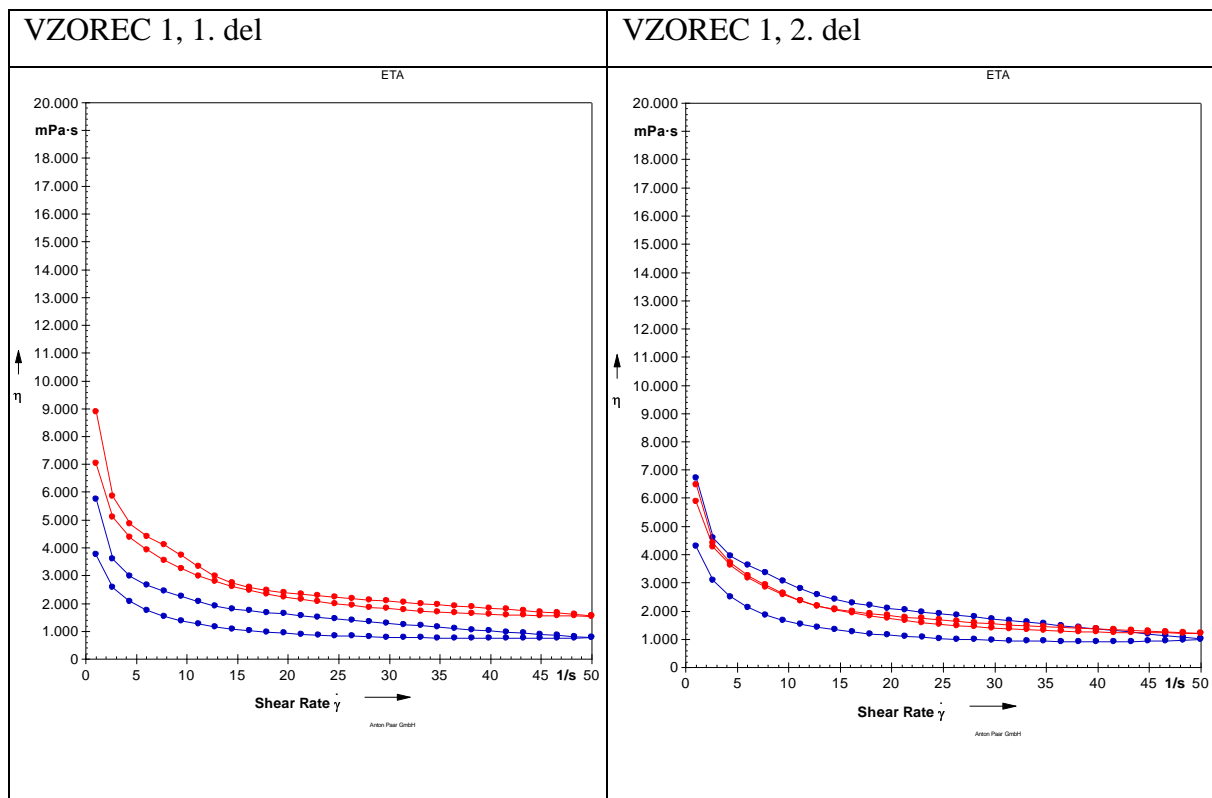
Čas meritve	VZOREC 1		VZOREC 2	
	pH	električna prevodnost ($\mu\text{S/cm}$)	pH	električna prevodnost ($\mu\text{S/cm}$)
t_0 (1.del)*	5,8	8,32	5,5	7,86
t_0 (2.del)*	5,7	8,31	5,6	7,85
po 10. ciklu (1.del)	5,0	12,72	4,5	6,72
po 10. ciklu (2.del)	4,9	12,62	4,5	7,01
* VZOREC 1 in 2 smo pripravili 1. dan: (1.del) in še naknadno naslednji dan:(2.del) Oba vzorca smo pripravili po enakem postopku in pri enakih pogojih.				

VZORCU 1 in VZORCU 2 smo izmerili pH in električno prevodnost takoj, ko smo ga pripravili prvi dan (1. del) in tudi nato, ko smo ga pripravili še naknadno naslednji dan, pod enakimi pogoji in po enaki recepturi (2. del). Oba dela vzorca smo tudi izpostavili cikličnim temperaturnim obremenitvam in prav tako smo obema deloma vzorcev po 10. ciklih izmerili pH in električno prevodnost. Oba vzorca (VZOREC 1 in VZOREC 2, oba dela) sta po 10. ciklih postala nekoliko bolj kislja (pH se je znižal za enoto). Znižanje pH bi lahko bil posledica mikrobiološke kontaminacije z glivicami, saj krem nismo konzervirali. Električna prevodnost VZORCA 1 se je po 10. ciklih minimalno povečala, medtem ko se vrednosti VZORCA 2 po 10. ciklih niso bistveno spremenile.

Na osnovi teh rezultatov lahko ocenimo, da sta oba vzorca prestala ciklične temperaturne obremenitve, saj so tako spremembe pH in električne prevodnosti minimalne.

Če upoštevamo rezultate pH izotermnega in neizotermnega staranja za VZOREC 1, lahko spremembe v pH pripišemo mikrobiološki kontaminaciji in ne fizikalni nestabilnosti. Na slednjo pa opozarja zelo povišana električna prevodnost pri 40 °C. podobne ugotovitve veljajo za VZOREC 2, le da smo tu zaznali povečanje električne prevodnosti vzorca, ki je bil shranjen pri 4 °C.

Za oba ciklana vzorca smo izvedli tudi reološko analizo. Slika 7 prikazuje reogram VZORCA 1: sveže pripravljenega vzorca ($t_{0,1.del}$, $t_{0,2.del}$ -modra krivulja) in vzorca, ki smo ga izpostavili cikličnim obremenitvam (rdeča krivulja).

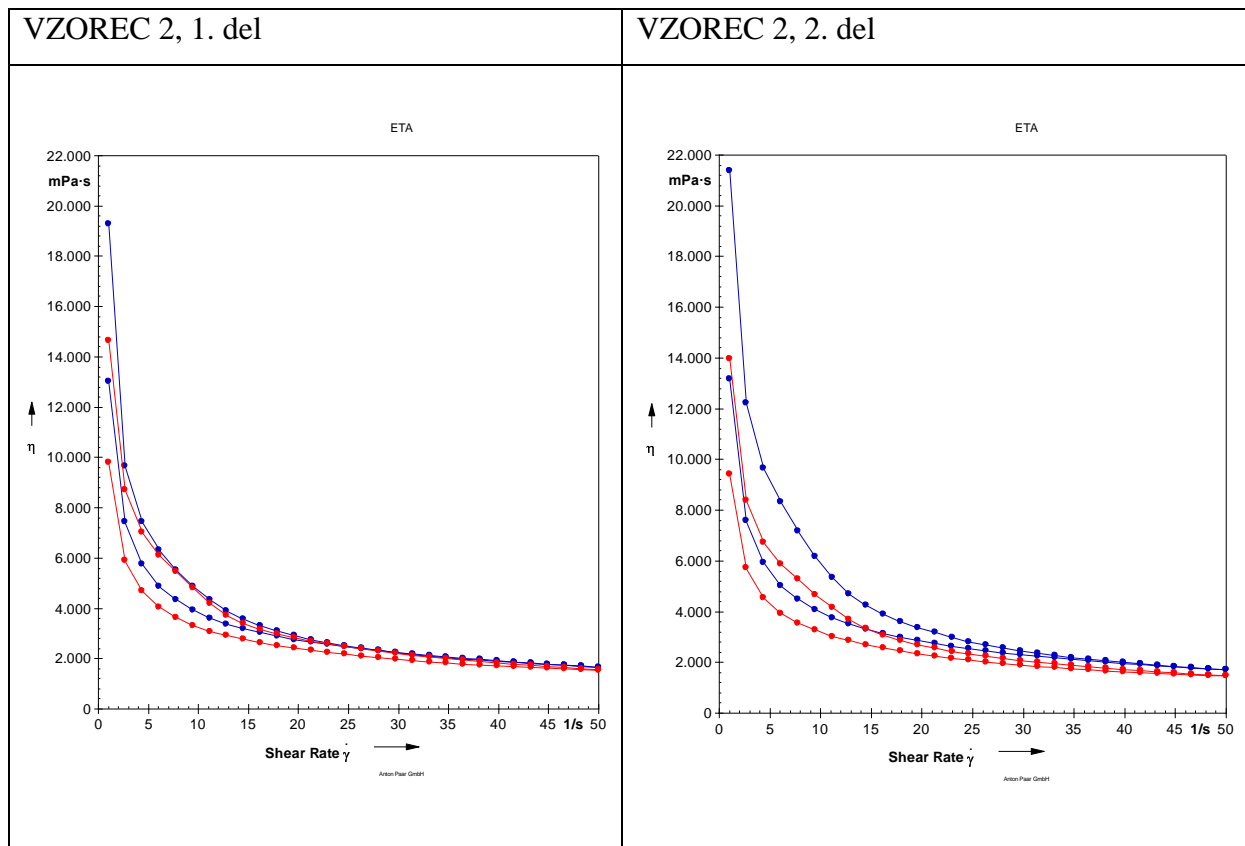


Slika 7: Viskoznost VZORCA 1: sveže pripravljen vzorec in viskoznost vzorca po 10. ciklih-1. del (levo) in viskoznost sveže pripravljenega vzorca in viskoznost vzorca po 10. ciklih-2. del (desno)

Iz teh krivulj lahko razberemo, da je viskoznost 1. dela VZORCA 1 po 10. ciklih v celotnem območju strižnih hitrosti večja kot pri sveže pripravljenem vzorcu. Viskoznost 2. dela vzorca, se v primerjavi s sveže pripravljenim vzorcem ni bistveno spremenila. Razlike v viskoznosti

1. in 2. dela sveže pripravljenega vzorca lahko pripišemo variabilnemu postopku izdelave, saj smo oba vzorca pripravili ročno.

Slika 8 prikazuje spremembe VZORCA 2 v viskoznosti: sveže pripravljenega vzorca ($t_{0,1.del}$, $t_{0,2.del}$ -modra krivulja) in vzorca, ki smo ga izpostavili cikličnim obremenitvam (rdeča krivulja).



Slika 8: Viskoznost VZORCA 2: sveže pripravljen vzorec in viskoznost vzorca po 10. ciklih-1. del (levo) in viskoznost sveže pripravljenega vzorca in viskoznost vzorca po 10. ciklih- 2. del (desno)

Majhne spremembe viskoznosti sveže pripravljenega VZORCA 2 1. in 2. dela lahko pripišemo temu, da smo vzorca pripravili ročno, kar nakazuje na variabilnost postopka izdelave. Prav tako se ni bistveno spremenila viskoznost po 10. ciklih, iz česar lahko zaključimo, da iz viskoznosti ne moremo sklepati na fizikalno stabilnost VZORCA 2.

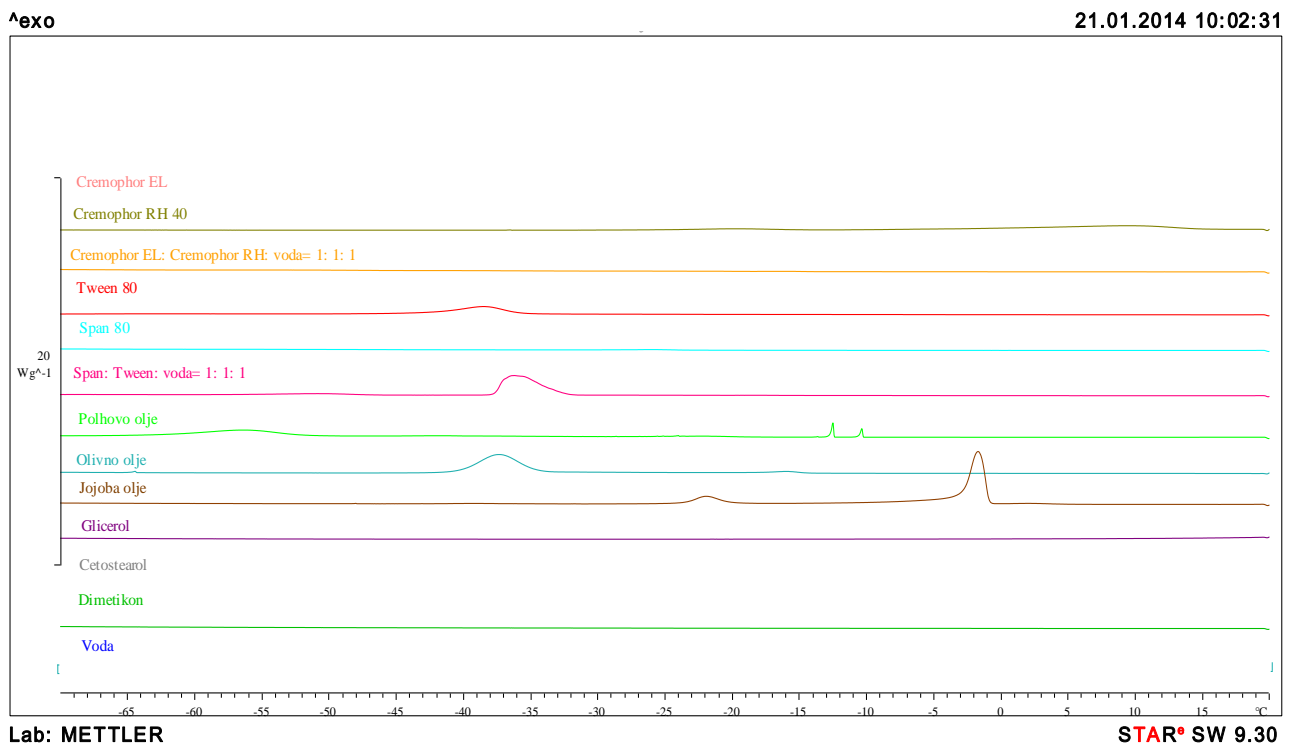
Na osnovi vseh izvedenih testov lahko predvidevamo, da VZOREC 1, ni zadostno fizikalno stabilen. Pri vzorcu, shranjenem pri 40 C smo izmerili nekoliko zmanjšano viskoznost, in organoleptično smo zaznali, da je prišlo do razpada kreme, kar je lahko tudi vzrok povišane električne prevodnosti. Pri VZORCU 2 smo organoleptično zaznali spremembe v strukturi

samo pri vzorcu, shranjenem v hladilniku. Vzroka ne znamo pojasniti. Znižanje pH obeh vzorcev pri povišani temperaturi pripisujemo mikrobiološki kontaminaciji, saj vzorcev nismo konzervirali..

Lahko pa potrdimo, da sta VZOREC 1 in VZOREC 2 prestala ciklične temperaturne obremenitve, ki po literaturnih podatkih in praktičnih izkušnjah strokovnjakov predstavljajo večjo obremenitev za sam vzorec. Razlog, da sta prestala te obremenitve je ta, da sta bila vzorca pri povišani ali znižani temperaturi shranjena le 10 krat po 24 ur, medtem ko sta bila pri izotermnem testiranju shranjena 90 dni.

4. 6. DSC ANALIZA

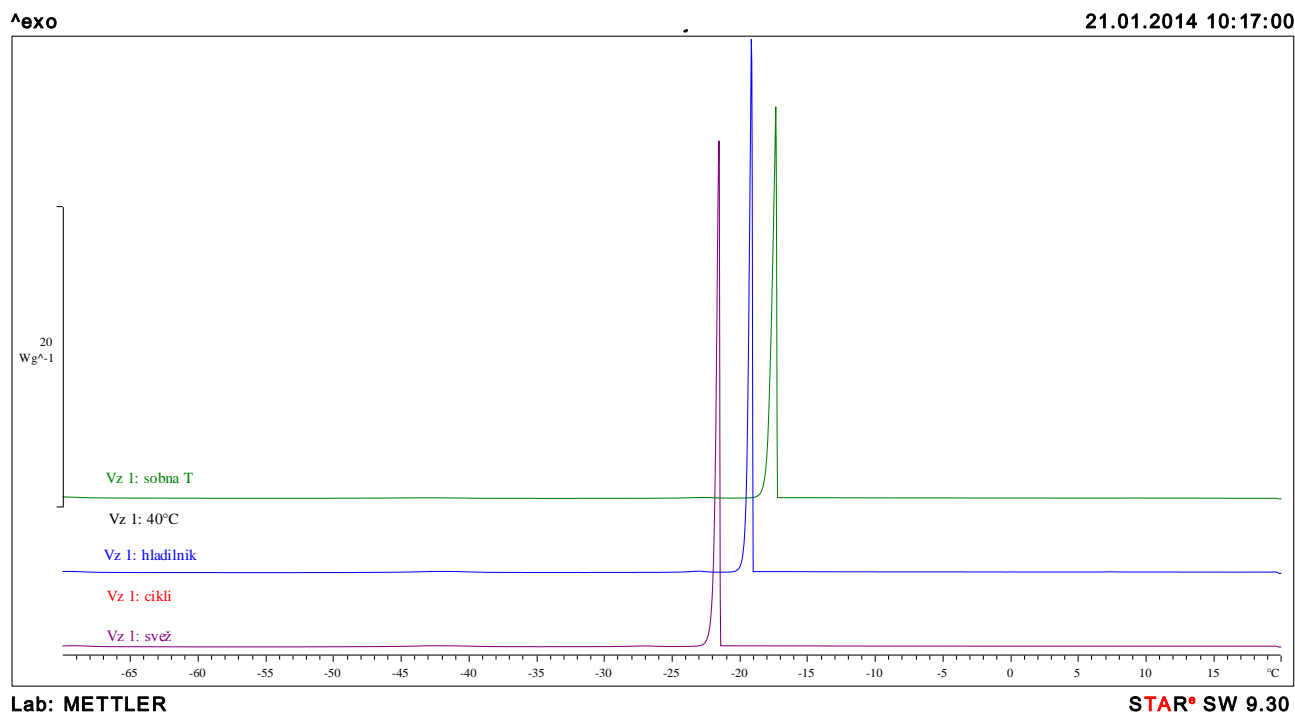
Ker nismo poznali vzroka za spremembe v strukturi VZORCA 1, shranjenega pri 40 °C in VZORCA 2, shranjenega pri 4 °C, smo se odločili za DSC analizo. Analizirali smo sveže pripravljene vzorce, vzorce starane pri različnih temperaturah in vzorce, izpostavljene cikličnim obremenitvam ter dodatno še posamezne sestavine krem in zmes emulgatorskih zmesi z vodo (Span 80:Tween 80:voda (1:1:1) in Cremophor EL:Cremophor RH 40:voda (1:1:1)). Vzorce smo ohlajali v intervalu med 20 °C do -70 °C, pri konstantni hitrosti -2 K/min. Rezultate opravljenih meritev prikazujejo Slika 9, Slika 10 in Slika 11.



Slika 9: Termogram posameznih sestavin izdelanih krem

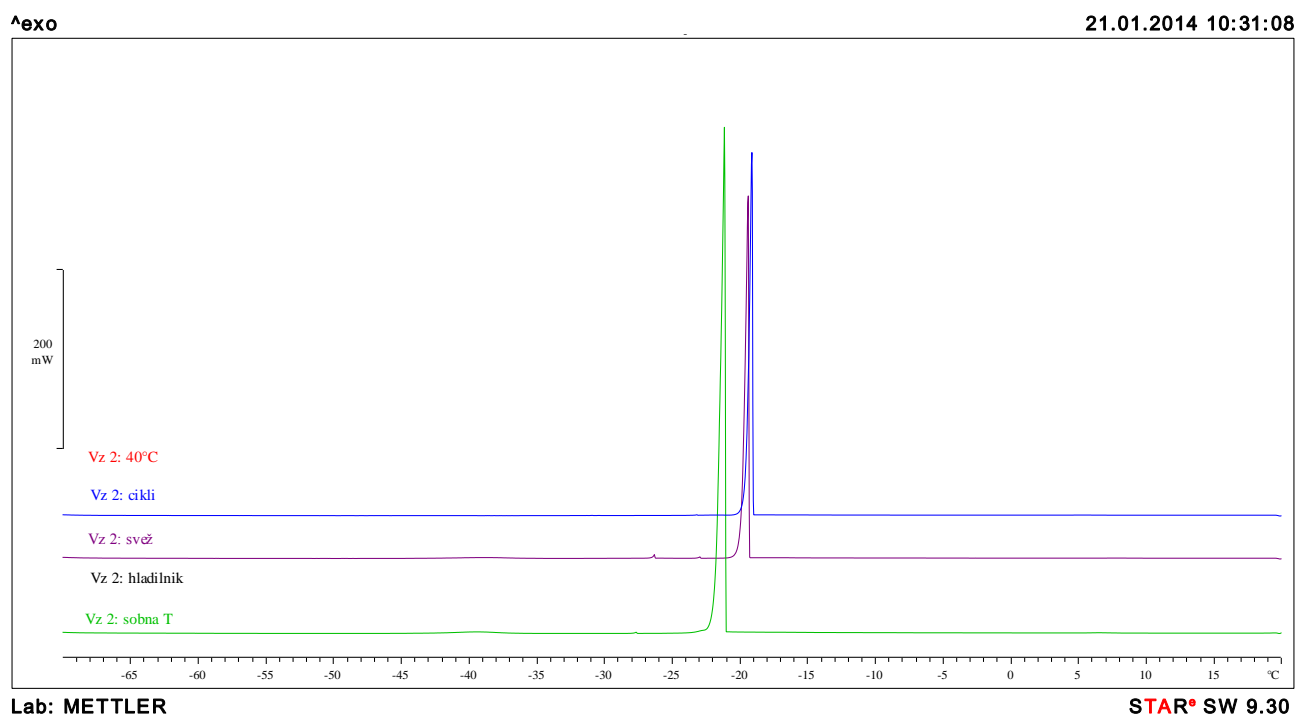
V zgoraj omenjenem temperaturnem intervalu nismo zaznali nobenih termičnih sprememb pri Cremophorju RH 40, Spanu 80, glicerolu, cetostearolu, dimetikonu in zmesi Cremophorja EL: Cremophorja RH 40: voda (1:1:1).

Iz termograma na Sliki 6 lahko opazimo majhne spremembe pri Cremophorju EL v intervalu temperatur med $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$, pri čemer se pojavi širok pik, ki je lahko posledica prisotnih nečistot. Širok eksotermni pik opazimo tudi pri Tweenu 80, ki se je pojavil v intervalu med $-43\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $-37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pri polhovem olju smo opazili dva majhna ozka pika, ki se pojavita pri $-13\text{ }^{\circ}\text{C}$ in pri $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ in sta lahko posledica prisotne nečistote. Termično spremembo pri oljvem olju smo opazili v intervalu med $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$, kjer se je pojavil širok pik, pri jojoba olju pa smo zaznali termični spremembi med intervaloma $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ in med $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pik, ki se je pojavil med $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ je širok, skoraj položen in je lahko posledica kakšne primesi. Nekoliko večje spremembe opazimo pri zmesi Spana 80:Tweena 80:voda (1:1:1). Ta zmes zmrzne v intervalu med $-37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $-33\text{ }^{\circ}\text{C}$. Širok pik, ki se je pojavil pri tej zmesi je verjetno rezultat zamrznitve Tweena 80. Najbolj izrazito termično obnašanje je prisotno pri vodi. Velik in ozek pik se je pojavil med temperaturama $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$, kjer zmrzne voda. Vse spremembe, ki smo jih zaznali v termogramu so eksotermne.



Slika 10: Termogram VZORCA 1 staranega pri različnih pogojih

Pri VZORCU 1 opazimo v termogramu, ki ga prikazuje Slika 10 ostre ozke pike ne glede na pogoje shranjevanja med intervali med $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $-17\text{ }^{\circ}\text{C}$. Enak pik se je pojavil tudi pri sveže pripravljenem vzorcu in sicer v intervalu od $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$. Te termične spremembe so se pojavile v območju, kjer zmrzne voda. Iz termograma ni razvidno, da bi se pojavile termične spremembe posameznih sestavin, ki bi lahko vplivale na fizikalno stabilnost kreme.



Slika 11: Termogram VZORCA 2 staranega pri različnih pogojih

Termnično obnašanje VZORCA 2 prikazuje slika 11. Ugotovitve so enake, kot za vzorec 1. Opravljene DSC analize nam niso dale odgovora kaj bi lahko bil vzrok za razpad pripravljenih krem.

5. SKLEP

Polhovo olje se že od nekdaj uporablja v ljudski medicini proti različnim boleznim. Njegove znane ugodne učinke na kožo smo želeli izkoristiti tudi mi, zato smo načrtovali razvoj kreme s 5 % polhovega olja. Izdelani kremi smo vrednotili fizikalno stabilnost.

Polhovemu olju smo predhodno določili kislinsko, peroksidno in jodno število. Pred izdelavo kreme smo najprej določili HLB vrednost emulgatorske zmesi. Eksperimentalno določeno vrednost emulgatorske zmesi s HLB 10 smo pripravili tako, da smo zmešali 46 % Spana 80 in 54 % Tweena 80. Na osnovi literaturnih podatkov o sestavi kozmetičnih emulzij in določene vrednosti HLB smo na začetku izdelali osem podlag z različno sestavo, vendar tako, da je delež celokupne lipofilne (33 %), hidrofilne (61 %) faze in emulgatorske zmesi (6%) ostal vedno enak. Spreminjali pa smo deleže posameznih sestavin (olivno olje, mandljevo olje, cetostearol, dimetikon, idr.). Pripravljene kreme smo podvrgli preliminarnemu testiranju centrifugiranja. Tako smo izbrali najstabilnejšo kremo, katere recepturo smo nadalje optimizirali, in sicer tako, da smo zmanjšali delež oljne in povečali delež vodne faze. Izdelali smo pet krem, jih organoleptično ocenili in jih ponovno izpostavili centrifugiranju in kombinaciji segrevanja in centrifugiranja. V najstabilnejšo kremo smo nato vgradili 5 % polhovega olja. Ker smo želeli dodatno primerjavo izbrane emulgatorske zmesi s Spanom 80 in Tweenom 80 (HLB 10), smo pripravili še kremo z emulgatorsko zmesjo Cremophorja RH in Cremophorja EL v razmerju 1:1, ki sta ena izmed najpogosteje uporabljenih emulgatorjev v kozmetičnih kremah.

Izdelani kremi (VZOREC 1 – Span 80/Tween 80) in VZOREC 2 (Cremophor RH 40/Cremophor EL) smo podvrgli testiranju fizikalne stabilnosti z izotermnimi testi staranja in cikličnimi temperaturnimi obremenitvami. Po točno določenem časovnem razporedu smo staranim vzorcem merili pH, električno prevodnost in viskoznost.

Glede na rezultate izoternega staranja predvidevamo, da VZOREC 1, ni zadostno fizikalno stabilen. Pri vzorcu, ki je bil shranjen pri 40 °C smo organoleptično zaznali, da je prišlo do razpada kreme 45. dan, kar je lahko tudi vzrok povišane električne prevodnosti. Dodatno smo izmerili tudi nekoliko zmanjšano viskoznost. Pri VZORCU 2 smo organoleptično zaznali spremembe v strukturi samo pri vzorcu, shranjenem v hladilniku. Vzroka ne znamo pojasniti. Znižanje pH obeh vzorcev pri povišani temperaturi pripisujemo mikrobiološki kontaminaciji, saj vzorcev nismo konzervirali.

Pri izpostavitvi vzorcev cikličnim temperaturnim obremenitvam ni prišlo do bistvenih sprememb fizikalnih parametrov, ne glede na emulgatorsko zmes, ki smo jo uporabili.

Z DSC analizo sprememb v strukturi krem ki sta izkazovala fizikalno nestabilnost pri 40 °C in 4 °C nismo uspeli pojasniti.

Zaključimo lahko, da bo za dosego zadostne fizikalne stabilnosti izbrane kreme, potrebno še nadaljnje optimiziranje recepture.

6. LITERATURA

1. Kryštufek B., Flajšman B.: Polh in človek, Društvo Liberalna Akademija, Ljubljana, 2007: (25-27, 47, 149-150)
2. Skiera C, et al. Determination of free fatty acids in pharmaceutical lipids by ^1H NMR and comparison with the classical acid value, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2013
3. Rabasco Alvarez AM, Gonzales Rodriguez ML. Lipids in pharmaceutical and cosmetics preparation. *Grasas y Aceites* 2000; 51 Fasc. 1-2: 74-96
4. Abdellah AM, Ishag KENA, Omer HM. Assesing the Sudanese standards and guidelines of edible oils: A case Study of Sunflower oil. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.* 2012; 12 (5): 682-688
5. Neagu A-A, Nita I, Botez E, Geacai S. A physico-chemical study for some edible oils properties. *Versita* 2013; 24 Number 2: 121-126
6. European Pharmacopoeia 7th edition, 7.0 Volume 1, Council of Europe, 67075 Strasbourg Cedex France, 2010 (137-138,) 1347, 2613
7. Yang Y, Li Q, Yu X, Chen X, Wang Y. A novel method for determinig peroxide value of edible oils using electrical conductivity. *Food Control* 2014, 39: 198-203
8. <http://www.florin-ag.ch/index.php?sid=nypIN2voRiDob5JQ7iT5cOty8aJGbqrQRScsLAZK&c5p=484&c5l=en> (4. 8. 2014)
9. Pizarro C, Esteban-Díez I, Rodríguez-Tecedor S, González-Sáiz JM. Determination of the peroxide value in extra virgin olive oils through the application of the stepwise orthogonalisation of predictors to mid-infrared spectra. *Food Control* 2013; 34 158-167
10. <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/292677/iodine-value> (17. 3. 2014)
11. <http://amrita.vlab.co.in/?sub=3&brch=63&sim=688&cnt=1> (20. 6. 2014)
12. O. Barel A., Paye M., I. Maibach H.: *Handbook of cosmetic science and technology* 3rd edition, Informa Healthcare, cop., New York, 2009 (123-124, 221-222)
13. Fischer P, Eugster A, J. Windhab E, Schuleit M. Predictice stress test to study the influence of processing procedures on long term stability of supersaturated pharmaceutical o/w creams. *International Journal of Pharmaceutics* 2007; 339: 189–196
14. http://irep.iium.edu.my/14524/1/CHAPTER_10_Natural_surfactants_for_pharmaceutical_emulsions.pdf (4. 8. 2014)

15. Rolim Baby A, Monegatto Santoro D, Robles Velasco MV, dos Reis Serra C. H. Emulsified system based on glyceryl monostearate and potassium cetyl phosphate: Scale-up and characterization of physical properties. *International Journal of Pharmaceutics* 2008; 361: 99–103
16. Humar M., Šmid Korbar J., Obreza A.: *Farmacevtski terminološki slovar*, Založba ZRC, 2011 (190)
17. Gašperlin M, Tušar L, Tušar M, Šmid-Korbar J, Zupan J, Krist J. Viscosity prediction of lipophilic semisolid emulsion systems by neural network modelling. *International Journal of Pharmaceutics* 2000; 196: 37–50
18. von Bergen R, Rogel E. A lattice fluid approach to the concept of hydrophile lipophile balance: alkylethoxylated surfactants. *Fluid Phase Equilibria* 1998; 153: 63–72
19. Korhonen M, Hirvonen J, Peltonen L, Antikainen O, Yrjänäinen L, Yliruusi J. Formation and characterization of three-component-sorbitan monoester surfactant, oil and water-creams. *International Journal of Pharmaceutics* 2004; 269: 227–239
20. https://www.pharmpress.com/files/docs/FTphyspharm_sample.pdf (23. 6. 2014)
21. Aulton M. E.: *The Design and Manufacture of Medicines* 3rd edition, Churchill Livingstone Elsevier, 2007 (402-403)
22. https://www.pharmpress.com/files/docs/FTphyspharm_sample.pdf (7. 8. 2014)
23. http://books.google.si/books?id=_6ywZPX7DHwC&pg=PA192&lpg=PA192&dq=surfactant+in+pharmacy&source=bl&ots=yMJWvU9fJi&sig=Ij105usowGnDpAm8McXsIc8kFIA&hl=sl&sa=X&ei=xyXmU_KCBsnNygPo3oK4Bg&sqi=2&ved=0CFAQ6AEwBA#v=onepage&q=surfactant%20in%20pharmacy&f=false (7. 8. 2014)
24. Korhonen M, Lehtonen J, Hellen L, Hirvonen J., Yliruusi J. Rheological properties of three component creams containing sorbitan monoesters as surfactants. *International Journal of Pharmaceutics* 2002; 247: 103-114
25. von Bergen R, Rogel E. A lattice fluid approach to the concept of hydrophile lipophile balance: alkylethoxylated surfactants. *Fluid Phase Equilibria* 1998; 153: 63–72
26. Tadros TH. *Emulsion science and technology*, Wiley-VCH, Weinheim, 2009 (25, 26)
27. Gilbert L, Savary G, Grisel M, Picard C. Predicting sensory texture properties of cosmetic emulsions by physical measurements. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 2013; 124: 21–31
28. Brummer R, Godersky S. Rheological studies to objectify sensations occurring when cosmetic emulsions are applied to the skin. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 1999; 152: 89–94

29. Savary G, Grisel M, Picard C: Impact of emollients on the spreading properties of cosmetic products: A combined sensory and instrumental characterization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2013; 102: 371– 378
30. Realdon N, Perin F, Morpurgo M, Ragazzi E. Influence of processing conditions in the manufacture of O/W creams. I. Effect on dispersion grade and rheological characteristics. *Il Farmaco* 2002; 57: 341–347
31. Masmoudi H, Le Dr'eau Y, Piccerelle P, Kister J: The evaluation of cosmetic and pharmaceutical emulsions aging process using classical techniques and a new method: FTIR. *International Journal of Pharmaceutics* 2005; 289: 117–131
32. Gašperlin M., Teskač K.: Emulzije, stabilizirane s trdnimi delci - Pickering emulzije. *Farmacevtski vestnik* 2009, letnik 60, številka 1, str. 14-20
33. Padilha Vianna-Filho R, Oliveira Petkowicz CL, Meira Silveira J L. Rheological characterization of O/W emulsions incorporated with neutral and charged polysaccharides. *Carbohydrate Polymers* 2013; 93: 266– 272
34. http://media.johnwiley.com.au/product_data/excerpt/55/35273252/3527325255.pdf (20. 6. 2014)
35. Robins M M.: Emulsions – creaming phenomena. *Curr. Opin. Colloid. Interface Sci.* 2000: 5 (265)
36. http://www.particlesciences.com/docs/technical_briefs/TB_2011_2.pdf (7. 8. 2014)
37. Juliano P, Kutter A, Cheng L +J, Swiergon P, Mawson R, Augustin M A. Enhanced creaming of milk fat globules in milk emulsions by the application of ultrasound and detection by means of optical methods. *Ultrasonics Sonochemistry* 2011; 18: 963–973
38. Miller D, Wiener E-M, Turowski A, Thunig C, Hoffmann H. O/W emulsions for cosmetics products stabilized by alkyl phosphates- rheology and storage tests. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 1999; 152: 155–160
39. Udomrati S, Ikeda S, Gohtani S. Rheological properties and stability of oil-in-water emulsions containing tapioca maltodextrin in the aqueous phase. *Journal of Food Engineering* 2013; 116: 170–175
40. Fredrick E, Walstra P, Dewettinck K. Factors governing partial coalescence in oil-in-water emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science* 2010; 153: 30-42
41. Er'ó's I, Kónya M, Csóka I. Study of the structure of coherent emulsions. *International Journal of Pharmaceutics* 2003; 256: 75–84

42. Guaratini T, Gianeti MD, MBGM Campos P. Stability of cosmetic formulations containing esters of Vitamins E and A: Chemical and physical aspects. *International Journal of Pharmaceutics* 2006; 327: 12–16
43. Korhonen M, Hellen L, Hirvonen J, Yliruusi J. Rheological properties of creams with four different surfactant combination- effect of storage time and conditions. *International Journal of Pharmaceutics* 2001; 221: 187–196
44. Denkova PS, Tcholakova S, Denkov ND, Danov KD, Campbell B, Shawl C, Kim D. Evaluation of the precision of drop-size determination in oil/water emulsions by low-resolution NMR spectroscopy. *Langmuir* 2004; 20, 11402-11413
45. Gundersen S A, Sæther Ø, Sjöblom J. Salt effects on lignosulfonate and Kraft lignin stabilized O/W-emulsions studied by means of electrical conductivity and video-enhanced microscopy. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2001; 186: 141–153
46. <http://books.google.si/books?id=huCSbPwyvBoC&pg=PA315&lpg=PA315&dq=electrical+conductivity+of+emulsions&source=bl&ots=TzyeILbMLd&sig=3VxwpgLRUdNqhtYKGVYoZDahAtg&hl=sl&sa=X&ei=2-f7Uq7EF4OQtQaOo4HgDw&ved=0CFIQ6AEwBDgK#v=onepage&q=electrical%20conductivity%20of%20emulsions&f=false> (30. 3. 2014)
47. Becher P.: *Emulsions: Theory and Practice*, Reinhold Publishing, New York, 1966 (89)
48. Rowe R. C., Sheskey P. J., Owen S. C.: *The Handbook of Pharmaceutical Excipients*, Pharmaceutical Press, Fifth Edition, London, 2005: 29-30, 150, 215, 233-234, 283-284, 348-349,
49. http://www.pharmaceuticals.basf.com/Statements/Technical%20Informations/EN/Pharma%20Solutions/EMP%20030711e_Cremophor%20EL.pdf (27. 4. 2014)
50. http://www.pharmaceuticals.basf.com/Statements/Technical%20Informations/EN/Pharma%20Solutions/03_111141e_Kolliphor%20RH%2040.pdf (27. 4. 2014)
51. Budavari S, O'Neil MJ, Smith A, Heckelmann PE, Kinneary JF. *The Merck Index*; Merck and CO, WC., Whitehouse Station, N, 1996: 897, 1173
52. http://www.google.si/imgres?imgurl=http%3A%2F%2Fstructuresearch.merck-chemicals.com%2FgetImage%2FMDA_CHEM_840123&imgrefurl=http%3A%2F%2Fwww.merckmillipore.com%2Findonesia%2Fspan-80%2FMDA_CHEM-

840123%2Fp_uid%3Fattachments%3DMSDS&h=300&w=500&tbnid=F5FfuYaEL8rgZM%3A&zoom=1&docid=sl8wFcS_r2HolM&ei=3LESVIWRAqn_ygPJ0ICoCQ&tbn=isch&ved=0CB4QMygDMAM&iact=rc&uact=3&dur=2243&page=1&start=0&ndsp=23 (12. 9. 2014)

53. <http://www.pharmaceutical-int.com/article/determination-of-detergents-in-therapeutic-protein-substance.html> (12. 9. 2014)

54. Lambers H, Piessens S, Bloem A, Pronk H, Finkel P. Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. *Int J Cosmet Sci.* 2006 28 (5): 359-70