

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TIMEJA PLANINŠEK PARFANT

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TIMEJA PLANINŠEK PARFANT

**VREDNOTENJE ANTOXIDATIVNE UČINKOVITOSTI  
ETERIČNEGA OLJA SUHOCVETNICE (*HELYCHRISUM ITALICUM*) S  
FERITIOCIANATNO IN DIFENILPIKRILHIDRAZILNO METODO**

**EVALUATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF IMMORTELLE  
ESSENTIAL OIL (*HELYCHRISUM ITALICUM*) WITH FERRIC  
THIOLYANATE AND DIPHENYLICRYLHYDRAZYL ASSAY**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2015

Diplomsko naložbo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, Katedri za farmacevtsko tehnologijo, pod mentorstvom doc. dr. Alenke Zvonar Pobirk, mag. farm.

### **Zahvala**

Iskreno se zahvaljujem mentorici doc. dr. Alenki Zvonar Pobirk, mag. farm. za pomoč, strokovne nasvete in usmerjanje pri izdelavi diplomske naloge. Zahvaljujem se tudi asist. dr. Mirjam Gosenca, mag. farm. za strokovno pomoč pri izvajanju DPPH metode. Hkrati pa se zahvaljujem strokovnim sodelavkam na Katedri za farmacevtsko tehnologijo Mojci Keržan, Tatjani Hrovatič in Maji Bjelošević za pomoč pri opravljanju eksperimentalnega dela diplomske naloge.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko naložbo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Alenke Zvonar Pobirk, mag. farm.

Timeja Planinšek Parfant

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Samo Kreft, mag. farm.

Mentorica: doc. dr. Alenka Zvonar Pobirk, mag. farm.

Članica diplomske komisije: asist. dr. Jasna Omersel, mag. farm.

# VSEBINA

<b>POVZETEK .....</b>	<b>III</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>V</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV .....</b>	<b>VI</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 LIPIDNA PEROXIDACIJA .....	1
1.1.1 Stopnje lipidne peroksidacije .....	1
1.1.1.1 Iniciacija lipidne peroksidacije .....	1
1.1.1.2 Propagacija lipidne peroksidacije .....	1
1.1.1.3 Terminacija lipidne peroksidacije .....	2
1.1.2 Lipidi podvrženi lipidni peroksidaciji.....	3
1.1.2.1 Celične membrane .....	3
1.1.2.2 Površinski lipidi kože .....	4
1.1.2.3 Lipidi v kozmetičnih izdelkih.....	5
1.1.3 Produkti in učinki lipidne peroksidacije .....	5
1.2 ANTIOKSIDANTI.....	5
1.2.1 Antioksidanti v kozmetičnih izdelkih .....	6
1.2.1.1 Vitamin E.....	6
1.2.1.2 Vitamin C .....	7
1.3 SUHOCVETNICA.....	8
1.3.1 Opis rastline .....	8
1.3.2 Lastnosti in uporaba.....	9
1.3.3 Eterično olje suhocvetnice .....	9
1.3.3.1 Uporaba eteričnega olja suhocvetnice .....	10
1.3.3.2 Lastnosti eteričnega olja suhocvetnice .....	10
1.4 IN VITRO METODE ZA DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI .....	10
1.4.1 Difenilpikrilhidrazilna (DPPH) metoda .....	11
1.4.2 Feritiocianatna (FTC) metoda .....	11
<b>2 NAMEN DELA .....</b>	<b>13</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>14</b>
3.1 MATERIALI .....	14
3.1.1 Sestavine za izdelavo nočne kreme .....	14

3.1.2 Materiali za FTC metodo .....	17
3.1.3 Materiali za DPPH metodo .....	18
3.1.4 Ostali materiali.....	18
<b>3.2 APARATURE.....</b>	<b>19</b>
<b>3.3 METODE .....</b>	<b>19</b>
3.3.1 Priprava nočne kreme .....	19
3.3.2 Feritiocianatna metoda.....	21
3.3.2.1 Priprava vzorcev .....	21
3.3.2.2 Obsevanje vzorcev z UVA svetlobo.....	22
3.3.2.3 Določanje antioksidativne učinkovitosti vzorcev.....	23
3.3.3 Difenilpikrilhidrazilna metoda.....	24
3.3.3.1 Priprava umeritvene premice za določanje koncentracije DPPH radikala .....	24
3.3.3.2 Priprava vzorcev .....	25
3.3.3.3. Določanje antioksidativne učinkovitosti vzorcev.....	26
<b>4 REZULTATI IN RAZPRAVA.....</b>	<b>28</b>
4.1 DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI S FTC METODO .....	28
4.1.1 Določanje antioksidativne učinkovitosti eteričnega olja suhovjetnice .....	28
4.1.1.1 Vpliv različnih koncentracij EO suhovjetnice na AOU.....	30
4.1.2 Določanje antioksidativne učinkovitosti hidrolata suhovjetnice.....	31
4.1.3 Določanje antioksidativne učinkovitosti kozmetičnega izdelka z eteričnim oljem in hidrolatom suhovjetnice.....	32
4.1.4 Vpliv Tween-a® 80 na prisotnost hidroperoksidov.....	33
4.1.5 Primerjava antioksidativne učinkovitosti eteričnega olja suhovjetnice z askoribil palmitatom in vitamin E acetatom .....	34
4.2 DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI Z DPPH METODO ...	36
4.2.1 Stabilnost DPPH radikala .....	36
4.2.2 Določanje antioksidativne učinkovitosti eteričnega olja suhovjetnice .....	37
4.2.3 Določanje antioksidativne učinkovitosti hidrolata suhovjetnice.....	38
4.2.4 Določanje antioksidativne učinkovitosti kozmetičnega izdelka z eteričnim oljem in hidrolatom suhovjetnice.....	39
4.2.5 Primerjava antioksidativne učinkovitosti eteričnega olja suhovjetnice z askoribil palmitatom in vitamin E acetatom .....	40
<b>5 SKLEP .....</b>	<b>43</b>
<b>6 LITERATURA .....</b>	<b>45</b>

## POVZETEK

Kozmetični izdelki se uporabljajo ne le za čiščenje, zaščito in navlažitev kože, ampak tudi z namenom vzpostavljanja ravnovesja, obnavljanja in poživitve kože. S tem namenom se v kozmetične izdelke vgrajevedno več aktivnih učinkovin, ki ugodno delujejo na stanje kože. Suhocvetnica (*Helychrisum italicum*) je rastlina, iz katere pridobivamo izvlečke in eterično olje, ki delujejo protivnetno, protimikrobnno, protivirusno, antioksidativno in antialergeno. Zaradi ugodnih lastnosti se uporablja pri celjenju ran in brazgotin, zdravljenju aken, alergijskega kontaktnega dermatitisa, ekcema, luskavice in opeklin. V kozmetiki se največ uporablja v izdelkih proti staranju kože.

V diplomski nalogi smo se osredotočili na antioksidativno delovanje suhocvetnice, in sicer smo ovrednotili antioksidativno učinkovitost eteričnega olja in hidrolata suhocvetnice z *in vitro* feritiocianatno (FTC) in difenilpikrilhidrazilno (DPPH) metodo. Z obema metodama smo potrdili antioksidativno aktivnost eteričnega olja suhocvetnice, ki pa je v primerjavi z askorbil palmitatom (znan antioksidant), šibka. Z DPPH metodo smo potrdili tudi šibko antioksidativno učinkovitost hidrolata suhocvetnice, ki pa je aktiven le v visokih koncentracijah. S FTC metodo njegovega anitoksidativnega delovanja nismo zaznali, saj zaradi svojega hidrofilnega značaja ne more zaščititi lipofilne linolne kisline pred lipidno peroksidacijo. Izdelali smo tudi nočno krema, ki je vsebovala eterično olje (0,3%) in hidrolat (5%) suhocvetnice ter določili antioksidativno učinkovitost kozmetičnega izdelka. Z izbranim *in vitro* metodama smo potrdili antioksidativno učinkovitost kreme, katera ni bila posledica vgrajenega eteričnega olja in hidrolata suhocvetnice, ampak so za to bile odgovorne druge sestavine krema (najverjetneje karitejevo maslo).

DPPH metoda se je pri diplomskem delu izkazala za hitro in robustno metodo, medtem ko so se rezultati FTC metode zelo razlikovali. Slednje je najverjetneje posledica neenakomerne obsevanja vzorcev z UV svetilko, ki je povzročilo različno hitrost lipidne peroksidacije. Za bolj ponovljive rezultate bi bilo potrebno eksperiment ponoviti z drugo UV svetilko ali pa uporabiti druge načine pospešitve lipidne peroksidacije (shranjevanje vzorcev pri povišani temperaturi).

Eterično olje in hidrolat suhocvetnice sta pogosti sestavini kozmetičnih izdelkov za nego zrele kože. Z *in vitro* metodama smo potrdili, da delujeta šibko antioksidativno, zato ju je v kozmetičnih izdelkih priporočljivo kombinirati z močnejšimi antioksidanti. Ker imata poleg antioksidativnega delovanja tudi druge za kožo ugodne učinke, je njuna vgradnja v kozmetične izdelke smiselna.

**Ključne besede:** eterično olje suhocvetnice, antioksidativna učinkovitost, difenilpikrilhidrazilna metoda, feritiocianatna metoda

## ABSTRACT

Cosmetic products are not only used for cleansing, protecting and hydrating the skin, but also for reestablishing balance, stimulation and skin regeneration. Due to this, cosmetic products contain an increasing amount of active ingredients that benefit the skin. Immortelle (*Helichrysum italicum*) is a plant species from which we obtain extracts and essential oil displaying anti-inflammatory, antimicrobial, antiviral, antioxidant, and anti-allergic properties. Due to these beneficial effects, they are used for treating a vast specter of conditions including wounds, scars, acne, allergic contact dermatitis, eczema, psoriasis, and sunburns. Immortelle is often used in anti-aging skin care products.

Diploma thesis was focused on the antioxidant properties of the Immortelle. Antioxidant activity of Immortelle essential oil and hydrosol was determined with the *in vitro* ferric thiocyanate (FTC) and diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) assays. Both assays confirmed the antioxidant activity of Immortelle essential oil that was weak in comparison to ascorbyl palmitate (commonly used antioxidant). Immortelle hydrosol was determined with DPPH assay also as weak antioxidant, but only when used in high concentration. With FTC assay, the Immortelle hydrosol was not determined as antioxidant. This can be explained by its hydrophilic nature, which does not allow it to prevent the lipid peroxidation of the lipophilic linoleic acid. Night cream was prepared using the Immortelle essential oil (0,3%) and hydrosol (5%) and was tested for its antioxidant activity, which was confirmed because of other incorporated antioxidant active ingredients in the night cream (most likely shea butter). The DPPH assay proved to be fast, robust and more accurate, whereas the FTC assay gave varied results. The limiting factor of the FTC assay can most likely be attributed to the uneven exposure of samples to UV radiation, resulting in an uneven acceleration of lipid peroxidation. To obtain more repeatable results, the experiment would have to be reproduced using a different UV lamp or a different means of accelerating the lipid peroxidation (e.g. storing the samples at increased temperature).

In cosmetics, Immortelle essential oil and hydrosol are common ingredients in anti-aging skin care products. Both *in vitro* assays confirmed their weak antioxidative activity, which is why in cosmetics it is advised to combine them with stronger antioxidants. Aside from their antioxidant nature, they also harbor other beneficial effects for the skin, making their incorporation in cosmetics reasonable.

**Key-words:** Immortelle essential oil, antioxidant activity, diphenylpicrylhydrazyl assay, ferric thiocyanate assay

# SEZNAM OKRAJŠAV

AO	antioksidant
AOU	antioksidativna učinkovitost
AP	askorbil palmitat
DPPH	difenilpikrilhidrazil
DPPH <sup>•</sup>	difenilpikrilhidrazilni radikal
EC <sub>50</sub>	koncentracija, potrebna za 50% učinek (angl.: efficient concentration)
EO	eterično olje
ET	prenos elektrona (angl.: electron transfer)
FTC	feritiocianatna metoda
HAT	prenos vodikovega atoma (angl.: hydrogen atom transfer)
HLB	hidro-lipofilno ravnotežje
IC <sub>50</sub>	koncentracija, potrebna za 50% inhibicijo (angl.: inhibitory concentration)
KAU	kozmetično aktivna učinkovina
KI	kozmetični izdelek
L <sup>•</sup>	lipidni radikal
LOOH	lipidni hidroperoksid
LP	lipidna peroksidacija
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	singletni kisik
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	superoksid
OH <sup>•</sup>	hidroksilni radikal
O/V	olje v vodi
PAS	površinsko aktivna snov
RO <sup>•</sup>	alkoksilni radikal
ROO <sup>•</sup>	peroksilni radikal
SCN <sup>-</sup>	tiocianat
UV	ultravijolično
X <sup>•</sup>	radikal
λ <sub>max</sub>	valovna dolžina absorbcjskega maksimuma

# 1 UVOD

## 1.1 LIPIDNA PEROKSIDACIJA

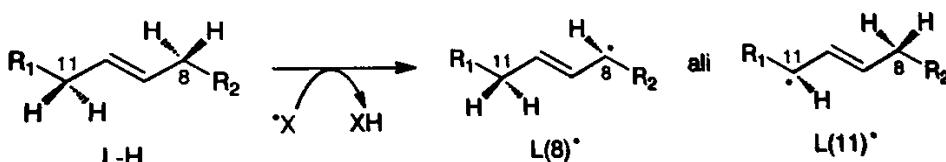
*Tappel A. L.* je definiral lipidno peroksidacijo (LP) kot oksidativni razpad večkrat nenasičenih maščobnih kislin. Večkrat nenasičene maščobne kisline so ene izmed glavnih gradnikov celičnih membran, površinskih lipidov kože in lipidov v kozmetičnih izdelkih (KI). (1)

LP povzroča oksidativni stres, ki predstavlja porušenje ravnovesja med tvorbo radikalov in njihovim odstranjevanjem, za katerega skrbi antioksidativna zaščita organizma. Pri oksidativnem stresu gre za prekomerno tvorbo radikalov, ki presegajo zmožnosti antioksidativne zaščite in povzročajo oksidativno poškodbo biomolekul. (2)

### 1.1.1 Stopnje lipidne peroksidacije

#### 1.1.1.1 Iniciacija lipidne peroksidacije

LP sprožijo dovolj reaktivni radikali, ki so sposobni odvzema vodikovega atoma, to sta najpogosteje hidroksilni radikal ( $\text{OH}^\bullet$ ) in singletni kisik ( ${}^1\text{O}_2$ ); temu procesu pravimo iniciacija ozziroma sprožitev LP. (1, 3) Slika 1 prikazuje začetek LP enkrat ali večkrat nenasičene maščobne kisline, kjer radikal ( $\text{X}^\bullet$ ) odvzame vodikov atom metilenski skupini na mestu 8 ali 11, pri tem pa nastane nov lipidni radikal ( $\text{L}(8)^\bullet$  ali  $\text{L}(11)^\bullet$ ), ki vstopa v nove radikalske reakcije. (4)



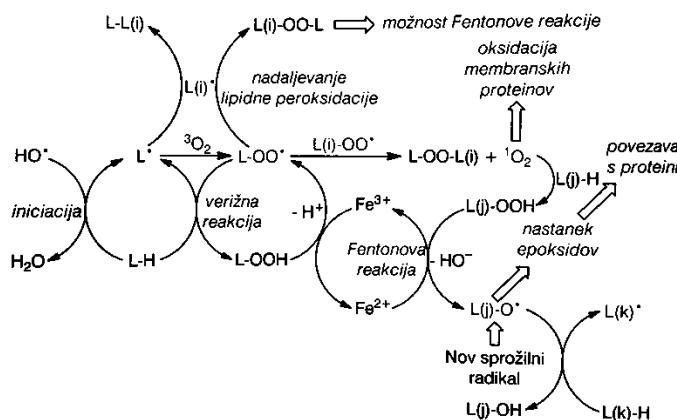
Slika 1: Iniciacija LP (4)

#### 1.1.1.2 Propagacija lipidne peroksidacije

Propagacijo ozziroma širitev LP povzroča predvsem kisik, ki vstopa v reakcijo z  $\text{L}^\bullet$  in tvori peroksilni radikal ( $\text{ROO}^\bullet$ ). Ker je novonastali radikal še vedno dovolj reaktiv, lahko reagira s sosednjo lipidno molekuljo v membrani, pri tem pa nastane nov  $\text{L}^\bullet$  in lipidni hidroperoksid ( $\text{LOOH}$ ). Ker je dostopnost kisika velika, ta ponovno vstopa v reakcijo z  $\text{L}^\bullet$  in tvori  $\text{ROO}^\bullet$ , kar privede do verižne reakcije LP, kjer nastaja velika količina  $\text{L}^\bullet$  in  $\text{ROO}^\bullet$ , lipidi pa se s kisikom pretvarjajo v  $\text{LOOH}$ . Takšne reakcije potekajo zelo hitro, še posebej pa v koži, ki je dodatno izpostavljena ultravijoličnim (UV) žarkom, saj ti pospešijo nastajanje

novih radikalov. (4) Tvorba hidroperoksidne skupine v lipidih, ki so gradniki celičnih membran, povzroči večjo polarnost tega dela molekule in posledično težnjo k približevanju polarnemu delu membrane, to pa nadalje povzroči razpad membranske strukture in spremembe membranskih funkcij, kar lahko vodi v celično smrt. (3, 4)

Na širitev LP pa ne vplivajo samo lipidni in sekundarno nastali radikali, ampak tudi železovi ( $\text{Fe}^{2+}$ ) in bakrovi ( $\text{Cu}^+$ ) ioni. Ti ioni vstopajo v Fentonovo reakcijo in katalizirajo razpad  $\text{LOOH}$ , ki nastajajo pri LP, kar privede do cepitve O-O vezi in tvorbe alkoksilnega radikala ( $\text{RO}^\bullet$ ) ali  $\text{ROO}^\bullet$ .  $\text{ROO}^\bullet$  lahko ponovno odvzame vodikov atom večkrat nenasičeni maščobni kislini ali  $\text{LOOH}$ , kar ponovno vodi v verižno reakcijo LP. (1, 3, 4)  $\text{RO}^\bullet$  lahko reagira tudi intramolekularno z adicijo na dvojno vez, kjer nastane epoksid in  $\text{L}^\bullet$ , ki lahko ponovno reagira naprej po že omenjenih reakcijah. Epoksid je reaktivni elektrofil, ki lahko reagira z membranskimi proteini, ki nosijo nukleofilne skupine in z njimi tvori kovalentno vez. S tem povzroči povezovanje membranskih lipidov s proteini, kar privede do funkcijskih sprememb membran, saj te postajajo vedno bolj toge. (4) Slika 2 prikazuje vse reakcije iniciacije in propagacije pri LP.



Slika 2: Iniciacijske in propagacijske reakcije pri LP (4)

### 1.1.1.3 Terminacija lipidne peroksidacije

Terminacija oziroma zaključek LP nastopi takrat, ko se verižne reakcije ustavijo, do česar lahko pride pod vplivom antioksidantov (AO) ali z reakcijami, ki povzročijo odstranitev reaktivnih radikalov. V te reakcije je po navadi vključenih več radikalov, in sicer:

- Reakcija dveh lipidnih radikalov, ki tvorita kovalentno vez in povzročata premreževanje celične membrane.



- Reakcija med peroksilnim in lipidnim radikalom ali med dvema alkoksilnima radikaloma, kjer nastane lipidni peroksid in povzroča premreževanje celične membrane.



- Reakcija med alkoksilnim in lipidnim radikalom, ki tvorita povezavo fosfolipidnih molekul z etrsko vezjo in povzročata premreževanje celične membrane.



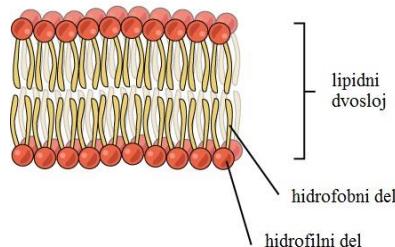
- Reakcija med lipidnim radikalom in drugimi radikali, npr. tiolnimi radikali, ki so na membranskih proteinih. (4)



## 1.1.2 Lipidi podvrženi lipidni peroksidaciji

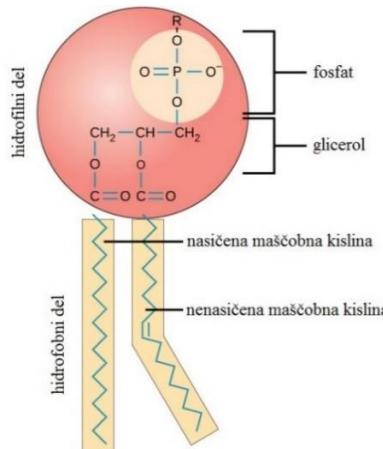
### 1.1.2.1 Celične membrane

Celične membrane so zgrajene iz lipidov in membranskih proteinov. Lipidi, ki sestavljajo celično membrano, so amfifilni, kar pomeni, da so zgrajeni iz hidrofilnega in hidrofobnega dela. Ker je okolica celic polarna, se molekule lipidov orientirajo tako, da se polarni deli obrnejo navzven, hidrofobni deli lipidov pa so obrnjeni v notranjost. Tako se tvorijo lipidni dvosloji, kar prikazuje tudi slika 3.



Slika 3: Zgradba lipidnega dvosloja, pripeljeno po (5)

Fosfolipidi so prevladujoči lipidi, ki sestavljajo celično membrano. So estri glicerola z večkrat nenasičenimi maščobnimi kislinami in fosforo kislino na katero je vezan alkohol. Slika 4 predstavlja njihovo strukturo.



Slika 4: Struktura fosfolipida, pritejeno po (5)

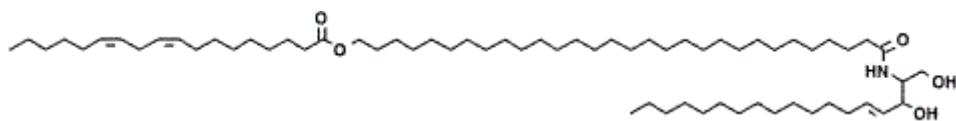
Poleg fosfolipidov, celično membrano sestavljajo tudi sfingolipidi in holesterol. (1)

### 1.1.2.2 Površinski lipidi kože

Površinski lipidi so del kislega hidro-lipofilnega zaščitnega plašča kože in med njem uvrščamo epidermalne lipide in sebum. (6)

#### Epidermalni lipidi

Epidermalni lipidi nastajajo v keratinocitih in služijo kot "malta" celicam v roženi plasti, saj zapolnjujejo prostore med epidermalnimi celicami. Epidermalni lipidi ščitijo kožo pred izhlapevanjem vode in izgubo elektrolitov, poleg tega pa jo ščitijo tudi pred vdorom mikroorganizmov. Epidermalne lipide prednostno sestavljajo ceramidi, proste maščobne kisline in holesterol. (6) Ceramidi so sfingolipidi, ki so zgrajeni iz aminokisline sfingozin, kjer je na aminski skupini acilirana maščobna kislina. Slika 5 prikazuje kemijsko strukturo ceramida 1. (7)



Slika 5: Kemijska struktura ceramida 1, pritejeno po (8)

Zaradi vsebovanih nenasasičenih vezi so epidermalni lipidi podvrženi LP. (6)

#### Sebum

Sebum je holokrini produkt žlez lojnic, ki se izloča vanje in tako prekriva površino dlak ali las in kože na mestih, kjer so žleze lojnice. Lipidi, ki najpogosteje sestavljajo sebum, so triglyceridi, voski, skvalen in maščobne kisline, medtem ko jih v manjših količinah sestavljajo holesterol in njegovi estri ter diglyceridi. Prevladujoča maščobna kislina, ki sestavlja sebum, je sapojska kislina (angl.: Sapienic acid), ki ima eno nenasasičeno vez in je

lahko podvržena LP. LP so lahko prav tako podvrženi voski, trigliceridi in skvalen, ki imajo v svoji strukturi nenasičene vezi. (6)

### 1.1.2.3 Lipidi v kozmetičnih izdelkih

KI vsebujejo triglyceride (olja in masla), voske, površinsko aktivne snovi (PAS) in dišave, ki vsebujejo nenasičene vezi in so prav tako kot celične membrane ter drugi lipidi v koži podvrženi LP. Produkti LP povzročajo neprijeten vonj KI in ostale neželene učinke. (9)

### 1.1.3 Proizvodi in učinki lipidne peroksidacije

Do oksidacije lipidov lažje pride pri večkrat nenasičenih vezeh, kjer nastanejo naslednji proizvodi: epoksidi, ketoni, aldehidi, krajsi ogljikovodiki in nižje maščobne kisline. (3, 9)

Najpogostejši učinki teh produktov v celičnih membranah so zmanjšana fluidnost celičnih membran, večja permeabilnost membrane (še posebej za  $\text{Ca}^{2+}$ ) in poškodba membranskih proteinov, s katerimi po navadi reagirajo aldehidi in jih inaktivirajo. Posredno zaradi nastanka radikalov pri LP pride tudi do poškodbe DNK v celičnem jedru. Vsi ti učinki po navadi vodijo v celično smrt, lahko pa tudi v spremembo iz normalne v rakavo celico. (1, 3) Pri KI nastali proizvodi povzročajo neprijeten vonj izdelka, nekatere sestavine lahko izgubijo svojo funkcijo (PAS npr. niso več sposobne v takšni meri znižati medfazne napetosti), poleg tega pa lahko tudi povzročajo stranske učinke pri uporabniku, kot je npr. iritacija kože. (9) Ker prihaja do LP tudi pri površinskih lipidih kože, lahko sebum povzroča iritacijo kože in deluje komedogeno, epidermalni lipidi pa izgubijo svojo barierno funkcijo, torej je koža bolj prepustna za izhlapevanje vode in izgubo elektrolitov ter vdor mikroorganizmov. (6)

## 1.2 ANTIOKSIDANTI

Antioksidant je vsaka snov, ki je že v nizki koncentraciji sposobna upočasnititi, preprečiti ali odstraniti oksidativne poškodbe tarčne molekule. (1, 3) AO delujejo tako, da prekinejo verižne reakcije, kot je na primer LP in reagirajo z radikali ter jih spremenijo v stabilnejše proizvode. LP zavirajo na več načinov:

- zmanjšajo lokalno koncentracijo kisika;
- lovijo radikale, kateri bi lahko sprožili LP;
- kelirajo kovinske ione, ti posledično ne morejo sprožiti ozioroma širiti LP;
- perokside razgradijo v proizvode, ki niso radikali;
- prekinjajo verižne reakcije in s tem preprečijo nadaljnji odcep vodikovega atoma. (3)

## 1.2.1 Antioksidanti v kozmetičnih izdelkih

KI so izdelki, ki se ne uporablajo samo za dober izgled kože, ampak spodbujajo tudi zdravje kože. Danes KI vsebujejo sestavine, ki kožo ne le očistijo, zaščitijo in navlažijo, ampak jo tudi obnavljajo, vzpostavljajo ravnovesje in jo poživijo. Te dobre učinke KI pripisujemo vgrajevanju vitaminov in AO v KI. (10)

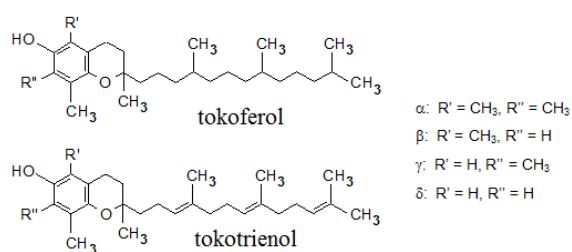
AO se v KI vgrajujejo z namenom da lovijo radikale, ki so delno odgovorni za procese staranja v koži in popravljajo nastalo škodo, ki nastane zaradi UV sevanja in okoljskih onesnaževalcev. Tako z AO zaščitimo kožo pred oksidacijskimi procesi, obenem pa tudi sestavine KI, ki so občutljive na oksidacijo. (11, 12)

Za doseganje dobre antioksidativne zaščite KI moramo izbrati zelo učinkovite AO, ki pa jih je zaradi njihove nestabilnosti malo. Kateri AO bomo vgradili v KI je odvisno od vrste izdelka (tip in vrsta disperznega sistema), spojine, ki jo želimo zaščititi, stabilnosti AO v izdelku, sprejemljivosti AO na koži in prisotnosti drugih AO v KI. (12)

Najpogosteje se v KI vgrajujejo vitamin E, vitamin C, tioli in flavonoidi. (13)

### 1.2.1.1 Vitamin E

Vitamin E je eden izmed glavnih lipofilnih vitaminov v koži in tudi eden izmed najpogosteje uporabljenih AO v KI. Nahaja se v vseh plasteh kože, tudi v roženi plasti in ima pomembno vlogo pri zaščiti biomolekul pred oksidativnim stresom. Ločimo 8 različnih oblik vitamina E, in sicer 4 oblike tokoferolov ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -) in 4 oblike tokotrienolov ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -), ki se razlikujejo po razporeditvi in številu metilnih skupin na kromanskem obroču. Vsi so zgrajeni iz kromanskega obroča (ki je odgovoren za antioksidativno delovanje, saj je donor vodika in elektrona) ter lipofilnega repa, ki je pri tokoferolih nasičen, pri tokotrienolih pa nenasičen. Z njim se vitamin E po navadi vsidra v celične membrane. (4, 12, 13) Slika 6 prikazuje kemijsko strukturo tokoferolov in tokotrienolov.



Slika 6: Kemijska struktura tokoferolov in tokotrienolov, priznjeno po (14)

Najpogosteje uporabljena oblika vitamin E, ki se uporablja v KI, je  $\alpha$ -tokoferol, ki tudi najbolj učinkovito inhibira LP. (3, 13)

Prosta oblika vitamina E je dokaj nestabilna in občutljiva na svetlobo, zato se najpogosteje nahaja v obliki estra - vitamin E acetata, kjer je aktivna hidroksilna skupina zaščitena z acetatno skupino. To poveča stabilnost AO, vendar pa zmanjša njegovo učinkovitost. (13)

Vitamin E deluje antioksidativno zaradi sposobnosti oksidacije, torej reagira z radikali. Njegova najpomembnejša reakcija je z  $\text{ROO}^\bullet$  in  $\text{RO}^\bullet$ , ki nastajajo pri LP in tako preprečuje oksidacijo drugih biomolekul ter posledično zavira procese staranja kože. (10, 12) Vitamin E reagira tudi s  ${}^1\text{O}_2$ , superoksidom ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) in  $\text{OH}^\bullet$ . Vitamin E z radikali reagira tako, da pritegne elektron in zaradi delokalizacije elektrona v aromatskem obroču tvori stabilnejši tokoferilni radikal. (3) Tokoferilni radikal je obnovljiv, kar pomeni, da ga lahko drugi AO (npr. vitamin C) reducirajo. (4)

Kot aktivna sestavina se vgraje v KI, ki se uporablja za nego suhe, aknaste in zrele kože, v KI pa se vgrajejo tudi z namenom zagotavljanja kemijske stabilnosti izdelka. (12)

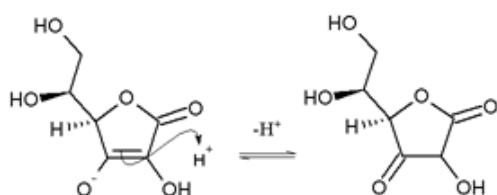
### 1.2.1.2 Vitamin C

Vitamin C oziroma askorbinska kislina je vodotopen vitamin, ki ga najpogosteje najdemo v citrusih in zelenjavi. Njegova antioksidativna učinkovitost (AOU) je povezana z njegovo kemijsko strukturo. Pri fiziološkem pH se nahaja v obliki monoaniona, ki lahko reagira z radikalom in tvori askorbilni radikal. Slednji je stabiliziran z delokaliziranim elektronom in se kasneje oksidira do dehidroaskorbinske kisline, ki je relativno nestabilna in razpade, če ni vključena v regeneracijo vitamina E. Vitamin C *in vitro* reducira različne radikale, kot so  $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$  in  $\text{ROO}^\bullet$ , ter tako preprečuje LP. (10, 13)

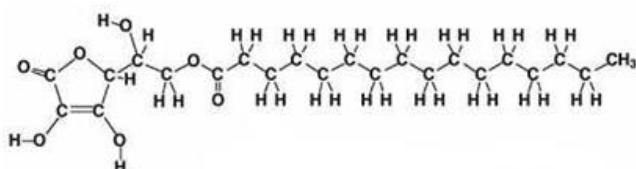
Zaradi močnega antioksidativnega učinka, je njegova uporaba v KI zelo zaželena. Deluje tudi kot aktivna sestavina proti staranju (sodeluje pri sintezi kolagena), poleg tega pa tudi regenerira vitamin E, saj ga pretvori nazaj v osnovno obliko po tem, ko ta reagira z radikalom. (10)

Sam vitamin C se kljub dobrim lastnostim v KI uporablja večinoma le za zaščito pred oksidacijo kozmetičnih sestavin. Pogostejsa oblika vitamina C, ki se uporablja v KI, je njegov lipofilni derivat askorbil palmitat (AP), ki je ester askorbinske kisline s palmitinsko kislino. AP je topen v lipidih, posledično penetrira globje v kožo, je bolj stabilen in lahko zaradi lipofilnosti reducira lipofilne  $\text{ROO}^\bullet$ . (4, 12)

Slika 7 prikazuje kemijsko strukturo vitamina C in pretvorbo v obliko monoaniona, slika 8 pa kemijsko strukturo AP.



Slika 7: Kemijska struktura vitamina C in pretvorba v monoanion, pritejeno po (15)



Slika 8: Kemijska struktura AP, pritejeno po (16)

AP po nanosu na opečeno kožo zmanjša rdečico za 50% hitreje v primerjavi s področjem kože, na katerega nismo nanesli nič. To potrjuje, da AP deluje tako antioksidativno kot tudi protivnetno. (10)

## 1.3 SUHOCVETNICA

Suhocvetnica je rastlina, ki je po svetu znana pod različnimi imeni, kot so: *laški smilj*, *Immortelle* in *everlasting*. Imeni *Immortelle* in *everlasting* je dobila zaradi njenih cvetov, ki ohranijo močno rumeno barvo tudi, ko se posušijo. (17) Njeno latinsko ime je *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don fil. in izvira iz grščine, kjer "helios" pomeni sonce in "chrysos" zlato. Ime je dobila zaradi zlatorumenih cvetov. (18-21) Slika 9 prikazuje cvetove suhocvetnice.



Slika 9: Suhocvetnica (22)

### 1.3.1 Opis rastline

Suhocvetnico uvrščamo v rod *Helichrysum*, ki spada v družino nebinovk – *Asteraceae*. Za ta rod je značilna visoka stopnja anatomskega in morfološkega polimorfizma, ki se odraža v raznolikosti vrst, poleg tega pa tudi v genetski raznolikosti in kemijski sestavi. (21, 23)

Suhocvetnica je aromatičen grm, visok 30-70 cm, ki raste na sušnih območijih Sredozemlja. Je rastlina trajnica z ozkimi srebrnimi listi in rumenimi cvetovi. Cvetovi so zlatorumene barve, listi cvetov pa so podolgovati in drobni. Če liste cvetov zdrobimo, se razvije značilen

vonj, ki je močan in obstojen ter podoben vonju karija (angl.: curry). Uvrščamo jo med kserofite, saj se lahko prilagodi in uspeva tudi na območjih, kjer primanjkuje vode. (17, 19)

### 1.3.2 Lastnosti in uporaba

Suhocvetnica vsebuje veliko učinkovin, zato se že od časa Stare Grčije uporablja v tradicionalni medicini, saj deluje protivnetno, protimikrobnno, protivirusno, antioksidativno, antialergeno in tudi repellentno. (17-19, 23) Zaradi ugodnih lastnosti se uporablja pri celjenju ran in brazgotin, poleg tega zmanjšuje tudi otekline. Blagodejno deluje na kožo, uporablja se pri zdravljenju aken, alergijskega kontaktnega dermatitisa, ekcema, luskavice in opeklin. Zaradi protivnetnega in antioksidativnega delovanja se največ uporablja v KI proti staranju. (17)

KI, ki vsebujejo suhocvetnico, se glede na oglaševanje lahko uporablajo za vse tipe kož. Blagodejno negujejo problematično in mastno kožo, odpravljajo in gladijo posledice aken ter blažijo rdečico. Zaradi protivnetnega delovanja so primerni za nego poškodovane ter vnete kože, saj jo pomirjajo, delujejo regenerativno, odpravljajo rdečico ter blažijo vnetja. Najpogostejsa pa je ravno uporaba v KI proti staranju kože, torej izdelkih, ki so namenjeni zreli, suhi in utrujeni koži, saj kožo obnavljajo, ter jo ohranjajo napeto in prožno. (24, 25)

### 1.3.3 Eterično olje suhocvetnice

Eterično olje (EO) je hlapna snov, ki je topna v olju in se lahko pridobiva iz rastlin z mehanskim stiskanjem ter vodno ali parno destilacijo. (26)

EO suhocvetnice pridobivamo s parno destilacijo cvetov suhocvetnice, pri čemer so cvetovi izpostavljeni vodni pari. Ker je EO netopno v vodi, pride v zbiralniku do ločitve faz na EO in vodno fazo. Slednja predstavlja stranski produkt parne destilacije in se imenuje hidrolat oz. rožna voda in vsebuje vodotopne sestavine EO, ki se prav tako uporablja v KI. (26, 27)

Suhocvetnica v povprečju vsebujejo 0,08-0,3% EO, zato je za pridobitev 1 kg EO suhocvetnice potrebno približno 2 toni svežih cvetov, posledično je tudi cena EO temu primerna. EO ima vonj po senu, vonj je zelo intenziven ter svež. (17, 28)

Lastnosti in kemijska sestava EO suhocvetnice so odvisne od genotipa in okolja v katerem se suhocvetnica nahaja. (21) EO najpogosteje vsebuje 30-50% monoterpenoidov (nerol, neril acetat,  $\alpha$ -pinen in  $\beta$ -pinen, geraniol, geranil acetat, limonen), seskviterpene, linalol, evgenol, itd. (23, 29)

### 1.3.3.1 Uporaba eteričnega olja suhocvetnice

EO suhocvetnice se uporablja kot dišava v parfumih, KI in detergentih. Poleg tega se uporablja tudi v aromaterapiji za lajšanje respiratornih težav, vpliva pa tudi pomirjevalno na živčni sistem. (29)

### 1.3.3.2 Lastnosti eteričnega olja suhocvetnice

EO suhocvetnice izkazuje protimikrobnو delovanje, saj je učinkovito *in vitro* proti *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, vrsti *Mycobacterium* in *Candida albicans*. Protimikrobnо delovanje je najbolj učinkovito z EO, ki vsebujejo visoke koncentracije nerola, geraniola, evgenola in  $\beta$ -pinena. (30) EO suhocvetnice izkazuje tudi protivnetne in repelentne lastnosti (19).

## 1.4 IN VITRO METODE ZA DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI

Antioksidativna učinkovitost se v literaturi pojavlja pod različnimi izrazi, kot so "antioxidant activity, capacity, efficacy, parameter, potencial, power, reactivity" itd., ki lahko pomenijo več stvari. AOU je lahko definirana kot sposobnost antioksidativne spojine, da inhibira oziroma zmanjša število radikalov ali reaktivnih zvrsti ali pa je definirana kot sposobnost antioksidativne spojine za inhibicijo oksidacije (čas in obseg). (31, 32)

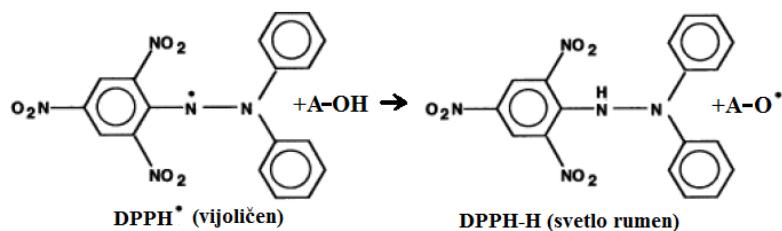
Obstaja veliko *in vitro* metod za določanje AOU, ki se med seboj razlikujejo po mehanizmu reakcije AO z oksidantom, uporabljenih oksidantih in substratih, reakcijskih pogojih in predstavljivosti rezultatov. AO lahko delujejo po različnih mehanizmih in reagirajo z različnimi radikali in oksidanti, zato je pomembno, da za ponazoritev AOU v bioloških sistemih ne izberemo samo ene metode, ampak več metod, ki nam posledično dajejo bolj realno sliko, poleg tega pa je tudi nesmiselno med sabo primerjati rezultate različnih metod. (33, 34)

*In vitro* metode za določanje AOU se delijo na 2 tipa:

- HAT oziroma "hydrogen atom transfer" metoda, ki temelji na sposobnosti odstranjevanja radikalov s prenosom vodikovega atoma
- ET oziroma "electron transfer" metoda, ki temelji na sposobnosti redukcije oksidanta s prenosom elektrona (32)

### 1.4.1 Difenilpikrilhidrazilna (DPPH) metoda

Difenilpikrilhidrazilna (DPPH) metoda je ena izmed najpogosteje uporabljenih metod za določanje AOU, saj je zelo enostavna, učinkovita, hitra in robustna. (35) Temelji na uporabi radikala 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil ( $\text{DPPH}^{\bullet}$ ), ki je stabilen zaradi delokalizacije nesparjenega elektrona po celotni molekuli. Delokalizacija elektrona omogoča molekuli, da ne dimerizira, kot se po navadi zgodi pri ostalih radikalih. Zaradi delokalizacije elektrona se raztopina DPPH radikala v metanolu ali etanolu obarva intenzivno vijolično; absorpcijski maksimum ima pri valovni dolžini ( $\lambda_{\max}$ ) 515-520 nm. Ob dodatku AO v raztopino DPPH radikala se radikal DPPH pretvori v reducirano obliko, barva raztopine pa se spremeni v svetlo rumeno barvo. (36, 37) Slika 10 prikazuje DPPH radikal, ki reagira z molekulom AO in se pri tem pretvori v reducirano obliko 2,2-difenil-1-pikrilhidrazin, molekula AO pa v stabilen radikal, ki lahko v naslednji reakciji ponovno reagira z DPPH radikalom.



Slika 10: Reakcija DPPH radikala z antioksidantom, prizadeno po (37)

Ker ob dodatku AO k DPPH radikalu pride do spremembe barve in padca absorbance, lahko AOU določimo s spektrofotometrijo. Višja kot je učinkovitost AO, večja je pretvorba DPPH radikala v reducirano obliko in manj vijolično je obarvana raztopina. (36)

V literaturi so rezultati DPPH metode po navadi predstavljeni s parametrom  $\text{EC}_{50}$  (angl.: efficient concentration) ali  $\text{IC}_{50}$  (ang.: inhibitory concentration), ki sta definirana kot koncentracija dodanega AO, ki je potrebna za zmanjšanje začetne koncentracije DPPH za 50%. Torej močnejši kot je AO, nižja je vrednost  $\text{EC}_{50}$ . (37) Rezultati AOU z DPPH metodo so lahko prikazani tudi z deležem preostalega DPPH radikala, glede na njegovo začetno vrednost. (35)

### 1.4.2 Feritiocianatna (FTC) metoda

Feritiocianatna (FTC) metoda določa sposobnost AO, da inhibira LP, bolj natančno LOOH, ki pri njej nastajajo kot primarni produkti. Za določanje AOU s FTC metodo se uporablja emulzija z linolno kislino, ki vsebuje nenasicene maščobne kisline, ki so podvržene LP. Za

pospešitev LP se po navadi emulzijo z linolno kislino obseva z UV svetlobo ali pa se jo segreva pri določeni temperaturi. FTC metoda določa količino LOOH, ki nastajajo pri LP, ti pa nadaljnje reagirajo z  $\text{FeCl}_2$  in tvorijo  $\text{Fe}^{3+}$ , ki v naslednji reakciji reagirajo s tiocianatom ( $\text{SCN}^-$ ) in tvorijo kompleks rdeče barve, ki ima absorpcijski maksimum pri valovni dolžini približno 500 nm. Količina obarvanega kompleksa je sorazmerna s količino nastalih LOOH, kar nam omogoča spektrofotometrično določanje AOU. V prisotnosti AO so te reakcije namreč počasnejše, posledično pa je manjša tudi intenzivnost barve raztopine in nižji absorpcijski maksimum ( $\lambda_{\text{max}} \sim 500 \text{ nm}$ ). V literaturi so rezultati FTC metode prikazani kot delež inhibicije LP, kot prikazuje enačba 1;  $A_{\text{AO}}$  predstavlja izmerjeno absorbanco vzorca z AO,  $A_0$  pa predstavlja izmerjeno absorbanco kontrolnega vzorca (emulzija z linolno kislino).

$$\% \text{ inhibicije lipidne peroksidacije} = 100 - \frac{A_{\text{AO}}}{A_0} \times 100 \quad \text{enačba 1}$$

Rezultati FTC metode pa so lahko tudi prikazani kot parameter  $\text{EC}_{50}$ , ki je definiran enako kot pri DPPH metodi.

Prednosti te metode so, da je metoda hitra, enostavna, za njeno izvajanje pa ne potrebujemo zahtevnih pogojev. Slabosti metode pa so, da je metoda slabo selektivna in ni dovolj občutljiva, zaradi možne reaktivnosti različnih peroksidov s  $\text{FeCl}_2$  in avtooksidacije  $\text{Fe}^{2+}$  z atmosferskim kisikom do  $\text{Fe}^{3+}$ . (35, 38, 39)

## 2 NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je ovrednotiti antioksidativno učinkovitost eteričnega olja suhocvetnice, ki se uporablja kot kozmetično aktivna učinkovina (KAU) v kozmetičnih izdelkih proti staranju kože. Antioksidativno učinkovitost eteričnega olja suhocvetnice bomo določali *in vitro* s feritiocianatno (FTC) in difenilpikrilhidrazilno (DPPH) metodo.

Za določanje antioksidativne učinkovitosti s FTC metodo bomo pripravili emulzijo z linolno kislino in dodali različne koncentracije eteričnega olja suhocvetnice glede na maso linolne kisline in nato vzorce izpostavili UVA svetlobi za pospešitev lipidne peroksidacije. Nato bomo v različnih časovnih točkah spremljali sposobnost eteričnega olja, da prepreči lipidno peroksidacijo (z UV/VIS spektrofotometrom pri valovni dolžini 485 nm).

Za določanje antioksidativne učinkovitosti z DPPH metodo bomo uporabili stabilen DPPH radikal in eterično olje suhocvetnice v različnih koncentracijah. V izbranih časovnih točkah bomo z UV/VIS spektrofotometrom pri valovni dolžini 516 nm spremljali padec koncentracije DPPH radikala v kiveti in posledično določili antioksidativno učinkovitost eteričnega olja suhocvetnice.

Z obema metodama bomo prav tako ovrednotili antioksidativno učinkovitost hidrolata suhocvetnice, ki predstavlja vodotopne komponente eteričnega olja. Za primerjavo antioksidativne učinkovitosti eteričnega olja suhocvetnice pa bomo z obema metodama tudi ovrednotili antioksidativno učinkovitost vitamin E acetata in askorbil palmitata, ki ju vsebuje veliko kozmetičnih izdelkov.

Za vrednotenje antioksidativne učinkovitosti kozmetičnih izdelkov, ki vsebujejo eterično olje suhocvetnice, bomo uporabili nočno krema za nego obraza, ki vsebuje eterično olje in hidrolat suhocvetnice in je bila predhodno razvita na Katedri za farmacevtsko tehnologijo. Njeno antioksidativno učinkovitost bomo določili tako s FTC metodo kot tudi z DPPH metodo.

## 3 MATERIALI IN METODE

### 3.1 MATERIALI

#### 3.1.1 Sestavine za izdelavo nočne kreme

##### Učinkovine

- **Eterično olje suhovetnice (Bioeterica Ltd., Hrvaška)**

EO suhovetnice se pridobiva s parno destilacijo iz cvetov rastline suhovetnice z območja Dalmacije na Hrvaškem. Je svetlo rumene do zlatorumene barve in ima sladek vonj, podoben medu. Glavne sestavine EO suhovetnice so neril acetat (do 30%),  $\gamma$ -kurkumen (do 30%) in italidion (do 30%). V KI se uporablja kot KAU in se uporablja za odpravljanje posledic aken, lajšanje alergijskih reakcij, opeklina, urezničnega vnetja, rdečice in dermatitisa, saj deluje antialergeno, protivnetno, protimikrobeno, antiseptično in adstringentno, (40, 41)

- **Hidrolat suhovetnice (Bioeterica Ltd., Hrvaška)**

Hidrolat suhovetnice je stranski produkt pri pridobivanju EO suhovetnice s parno destilacijo in vsebuje vodotopne komponente EO suhovetnice. Uporablja se za vse tipe kože, deluje blagodejno na kožo, odpravlja posledice aken in deluje protivnetno, zato je primeren za nego poškodovane kože (npr. opeklina), deluje tudi regenerativno, zato je primeren za zrelo kožo. (27, 42)

##### Hidrofilna faza

- **Ksantan (Sigma-Aldrich Co., Nemčija)**

Ksantan je anionski heteropolisaharid, ki se pridobiva s postopkom fermentacije z bakterijo *Xanthomonas* sp. *X. campestris* in je sestavljen iz glukozne verige, ki je povezana z  $\beta$ -1,4-glikozidno vezjo, na stranskih verigah pa so pripeti trisaharidi, ki so zgrajeni iz glukoronske kisline, ki je vezana med dve manzozi. Ksantan je bel ali svetlo rumen prah, ki je vodotopen in z vodo tvori visoko viskozno raztopino. Vrednost pH vodnih raztopin je 6,0-8,0. V KI se uporablja kot zgoščevalo, stabilizator in tvorilec gela. (43, 44)

- **Glicerol (Caesar&Loretz GmbH, Nemčija)**

Glicerol ali propan-1,2,3-triol uvrščamo med poliole in je visokoviskozna, brezbarvna in hidroskopna tekočina brez vonja. Glicerol je topen v vodi in alkoholu. Pridobiva se s hidrolizo trigliceridov in s fermentacijo sladkorjev. V KI se uporablja kot topilo za vodotopne sestavine in kot vlažilec, saj nase veže vodo in tako preprečuje izhlapevanje vode iz KI, poleg tega pa tudi vlaži kožo. (43,45)

- **Prečiščena voda (Fakulteta za farmacijo, Slovenija)**

Prečiščena voda je pridobljena na Fakulteti za farmacijo in predstavlja v KI hidrofilno fazo in je topilo natrijevemu metilparahidroksibenzoatu.

Lipofilna faza

- **CreamMaker® Blend (MakingCosmetics.com, ZDA)**

CreamMaker® Blend je emulgatorska zmes gliceril monostearata (48-52%) in polioksietilen stearata (PEG-100 stearat) (48-52%); to so beli kosmiči brez vonja, ki se dispergirajo v vodi in olju. Vrednost hidro-lipofilnega ravnotežja (HLB) je 11,2, kar pomeni, da omogoča nastajanje emulzij tipa olje v vodi (O/V). Po priporočilih proizvajalca se v KI uporablja kot emulgator za stabilizacijo emulzij tipa O/V, poleg tega pa se lahko uporablja tudi kot zgoščevalo in solubilizator, npr. za povečanje topnosti EO. (46)

- **Stearinska kislina (Lex d.o.o., Slovenija)**

Stearinska kislina je prosta maščobna kislina z empirično formulo C<sub>18</sub>H<sub>36</sub>O<sub>2</sub>, ki se nahaja v rastlinskih oljih. Je v obliki belega ali rumenkastega prahu ali trdnih belih ali rumenkastih kosmičev in ima rahel vonj po olju in okus po loju. Topna je v benzenu, ogljikovem tetrakloridu, kloroformu, etru, heksanu, propilen glikolu, 95% etanolu in olju, ni pa topna v vodi. V KI se uporablja kot anionski emulgator za pripravo emulzij tipa O/V, zgoščevalo in solubilizator pri izdelavi krem, mil in losjonov. (47,48)

- **Jojobino olje (Favn, Slovenija)**

Jojobino olje uvrščamo med tekoče maščobne voske. Pridobiva se s stiskanjem iz semen rastline jojoba oziroma *Simmondsia chinensis*. Sestavljen je iz različnih estrov maščobnih kislin in alkoholov, ki so podobni sebumu. Jojobino olje je netopno v vodi, brez vonja in je zlato-rjave barve. V KI se uporablja kot emolient, saj preprečuje transepidermalno izgubo vode, kot sredstvo proti gubam, saj kožo naredi bolj mehko in gladko in kot dobro mazivo, ki na koži ne pušča filma, saj dobro penetrira vanjo. (49)

- **Rafinirano olivno olje (Gram-Mol d.o.o., Hrvaška)**

Rafinirano olivno olje je prečiščeno deviško olivno olje, kateremu so odvzete primesi. Olivno olje se pridobiva s hladnim stiskanjem zrelih plodov rastline oljke oziroma *Olea europaea L.* Je bistro, po navadi zeleno-rumene barve in je netopno v alkoholu in vodi. Olivno olje je zmes trigliceridov v katerih prevladujejo nenasičene maščobne kisline. Olivno olje vsebuje naslednje maščobne kisline: palmitinsko kislino (7,5-20%), oleinsko kislino (56-85%), linolno kislino (3,5-20%) in ostale maščobne kisline, ki so v manjšem deležu, to so: linolenska kislina, stearinska kislina, palmitooleinska kislina, arahidonska kislina, itd.

Olivno olje se shranjuje v hladnem, temnem in suhem prostoru. V KI se uporablja kot topilo za lipofilne sestavine in emolient, saj deluje negovalno in kožo naredi bolj gladko in mehko. (43, 47, 50)

- **Karitejevo maslo (Caesar&Loretz GmbH, Nemčija)**

Karitejevo maslo uvrščamo med rastlinske maščobe in se pridobiva iz oreščkov drevesa karite oziroma *Vitellaria paradoxa*. Sestavljen je iz trigliceridov, kjer prevladujejo nasičene maščobne kisline, kot je stearinska kislina (20-50%). Karitejevo maslo vsebuje velike količine neumiljivih komponent, kot so terpenski alkoholi, antioksidanti in steroli, ki dajejo karitejevemu maslu zelo dobre negovalne lastnosti. Karitejevo maslo je bele ali sive barve in je topno v alkoholu ali olju in netopno v vodi. V KI se uporablja kot emolient, saj kožo dobro vlaži, naredi jo mehko in gladko ter jo ščiti pred zunanjimi vplivi. Zaradi visoke vsebnosti neumiljivih komponent deluje antiiritantno, ker aktivira celično rast pa se uporablja tudi v izdelkih proti staranju kože. (13, 51)

- **Dimetikon (Lex d.o.o., Slovenija)**

Dimetikon je linearen silikonski polimer, zgrajen iz polidimetilsilosana, ki se pridobiva s hidrolizo in polikondenzacijo iz diklorodimetilsilana in klorotrimetilsilana. Dimetikon je bistra, brezbarvna tekočina, ki je netopna v vodi, delno topna v etanolu in se meša z etil acetatom, metil etil ketonom in toluenom, dispergira pa se v olju in maslu. V KI se uporablja kot sredstvo proti penjenju, kjer se dodaja k lipofilni fazi v emulzijah O/V, poleg tega deluje tudi emolientno. Ob nanašanju KI na kožo preprečuje, da bi izdelek na koži povzročal bele sledi, poleg tega pa tudi preprečuje masten občutek na koži. Dimetikon se uporablja tudi v KI za lase, kjer izboljša razčesavanje ter lase naredi mehkejše in sijoče. (43, 47, 52)

### Druge sestavine

- **Natrijev metilparahidroksibenzoat (Lex d.o.o., Slovenija)**

Natrijev metilparahidroksibenzoat oziroma metilparaben je bel kristalinični prah brez vonja in ima rahlo pekoč okus. Je topen v vodi, delno topen v alkoholu in netopen v metilen kloridu. V KI se uporablja kot samostojen konzervans ali v kombinaciji z drugimi konzervansi. Če se uporablja v kombinaciji z ostalimi parabeni, je njihova najvišja dovoljena koncentracija v KI 0,8%, drugače pa je njegova najvišja dovoljena koncentracija 0,4%. Metilparaben je najpogosteje uporabljen konzervans v KI in je učinkovit v širokem pH območju. (43, 47, 53)

### 3.1.2 Materiali za FTC metodo

#### Sestavine emulzije z linolno kislino

- **Linolna kislina (Sigma-Aldrich Co., Nemčija)**

Linolna kislina je večkrat nenasičena maščobna kislina z dvema dvojnima vezema in z empirično formulo  $C_{18}H_{32}O_2$ . Je bistra, brezbarvna ali svetlo rumeno obarvana oljna tekočina, topna v 95% etanolu, etru in se meša z masli in olji. Linolna kislina je občutljiva na zrak, vlago, topoto in svetlobo, zato jo moramo shranjevati v tesno zaprtem vsebniku v hladnem prostoru. Pri izdelavi emulzije z linolno kislino smo uporabili linolno kislino, ki pri temperaturi shranjevanja 0-4°C delno kristalizira in vsebuje 60-74% linolne kisline in 18-32% oleinske kisline, ki je definirana kot nečistota. (47, 54)

- **Tween® 80 (Sigma-Aldrich Co., Nemčija)**

Tween® 80 ali polisorbat 80 je neionska PAS in predstavlja ester sorbitana z oleinsko kislino in eter sorbitana s polioksietilenglikoli. Omogoča nastanek emulzij tipa O/V. Je viskozna, rumena oljnata tekočina s HLB vrednostjo 15 in je topna v etanolu in vodi ter netopna v olju. Zaradi vsebnosti oleinske kisline ( $\geq 58\%$ ) je lahko Tween® 80 podvržen oksidaciji, zato je priporočeno shranjevanje v dobro zaprtem vsebniku, zaščiteno pred svetlobo v suhem in hladnem prostoru. Pri izdelavi emulzije z linolno kislino smo uporabili Tween® 80, ki je primeren za celične kulture in insektne celične kulture. (47, 55)

- **0,2 M fosfatni pufer (pH=7)**

1000 ml 0,2 M fosfatnega pufra smo pripravili tako, da smo najprej pripravili 250 ml raztopine kalijevega dihidrogenfosfata ( $KH_2PO_4$ ; Merck KGaA, Nemčija) s  $C = 27,22 \text{ g/l}$  in 145 ml raztopine natrijevega hidroksida ( $NaOH$ ; Sigma-Aldrich Co., Nemčija) s  $C = 8 \text{ g/l}$ . Nato smo raztopini zmešali in dopolnili s prečiščeno vodo do 1000 ml.

#### Reagenti FTC metode

- **1,14 M HCl**

200 ml 1,14 M HCl smo pripravili tako, da smo 114 ml 2 M HCl, ki smo jo pripravili s Titrisolom® (Merck KGaA, Nemčija), prenesli v 200 ml bučko in dopolnili s prečiščeno vodo do oznake.

- **20 mM raztopina  $FeCl_2$  v 1,14 M HCl**

100 ml 20 mM raztopine  $FeCl_2$  v 1,14 M HCl smo pripravili tako, da smo natehtali 397,1 mg železovega (II) klorida tetrahidrata ( $FeCl_2 \times 4H_2O$ ; Merck KGaA, Nemčija) in ga raztoplili v 100 ml 1,14 M HCl.

- **3,95 M NH<sub>4</sub>SCN**

Za 3,95 M NH<sub>4</sub>SCN smo natehtali 9 g amonijevega tiocianata (NH<sub>4</sub>SCN; Sigma-Aldrich Co., Nemčija) in ga raztopili v 30 ml prečiščene vode.

- **75% (V/V) etanol**

1 kg 75% (V/V) etanola smo pripravili tako, da smo 722,72 g 96% (V/V) etanola (Pharmachem Sušnik Jožef s.p., Slovenija) razredčili s 277,28 g prečiščene vode.

### 3.1.3 Materiali za DPPH metodo

- **2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH; Sigma-Aldrich Co., Nemčija)**

DPPH radikal je prah zelene ali črne barve z empirično formulo C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub> in molekulsko maso 394,32 g/mol in daje vijolično obarvano raztopino. DPPH je potrebno shranjevati na temperaturi 2-8°C v tesno zaprtem vsebniku, v suhem in zračnem prostoru. Topen je v organskih topilih, ni pa topen v vodi. Zaželeno je, da se za DPPH metodo kot topilo za DPPH radikal uporablja metanol ali etanol. (37, 56, 57)

### 3.1.4 Ostali materiali

- **Metanol za analizo (CH<sub>3</sub>OH; Merck KGaA, Nemčija)**

Metanol za analizo smo uporabili kot topilo pri DPPH metodi za DPPH radikal, EO suhovcvetnice, hidrolat suhovcvetnice, nočno kremo, vitamin E acetat in AP.

- **Vitamin E acetat (Caesar&Loretz GmbH, Nemčija)**

Vitamin E acetat je ester vitamina E in ocetne kisline in je bistra in rumeno ali rumeno-zeleno viskozna oljnata tekočina brez vonja z empirično formulo C<sub>31</sub>H<sub>52</sub>O<sub>3</sub> in molekulsko maso 472,73 g/mol. Vitamin E acetat je topen v 95% etanolu in se meša z acetonom, kloroformom, etrom in rastlinskimi olji, netopen pa je v vodi. Zaželeno je shranjevanje v tesno zaprtem vsebniku, zaščiteno pred svetlobo, v suhem prostoru pri sobni temperaturi 15-25°C. (47, 58)

- **L-askorbil palmitat (6-O-palmitoil-L-askorbinska kislina; Sigma-Aldrich Co., Nemčija)**

L-askorbil palmitat je ester palmitinske kisline z askorbinsko kislino oziroma vitaminom C in je bel ali rumenkast prah brez vonja z empirično formulo C<sub>22</sub>H<sub>38</sub>O<sub>7</sub> in molekulsko maso 414,54 g/mol. Topen je v organskih topilih in lipofilnih spojinah, netopen pa je v vodi. AP se shranjuje pri temperaturi 8-15°C, v suhem in temnem prostoru, saj je občutljiv na svetlobo

in vlogo, ki povzročata oksidacijo AP. Uporabili smo BioXtra askorbil palmitat ( $\geq 99,0\%$ ), ki se uporablja za zaščito celic in celičnih membran pred oksidativnimi poškodbami (47, 59)

## 3.2 APARATURE

- UV-svetilka 6W model UVLS – 26, 230 V, 50 Hz, 0,16 AMPS; UVP, Kalifornija, ZDA
- Stresalnik Vibromix 403 EVT; Tehnica, Slovenija
- Analitska tehnica Mettler Toledo, AG 245; Mettler Toledo International Inc., Švica
- Tehnica ViBRA AJ – 2200CE model; Shinko Denshi Co., Ltd., Japonska
- Magnetno mešalo Rotamix 560 MMH; Tehnica, Slovenija
- Ultrazvočna kadička, Sonis 2GT; Iskra pio d.o.o., Slovenija
- UV spektrofotometer Hewlett Packard 8453; Nemčija

## 3.3 METODE

### 3.3.1 Priprava nočne kreme

Za vrednotenje AOU KI, ki vsebuje EO in hidrolat suhovetnice, smo najprej izdelali nočno kremo, ki vsebuje EO in hidrolat suhovetnice (receptura je bila predhodno razvita na Katedri za farmacevtsko tehnologijo Fakultete za farmacijo v Ljubljani). Nočna krema je emulzija tipa O/V z recepturo, ki je prikazana v preglednici I. Izdelali smo 20 g nočne kreme.

*preglednica I: Receptura nočne kreme*

	<i>Sestavine</i>	<i>Delež (%)</i>	<i>Sestavine</i>	<i>Delež (%)</i>	
<i>faza A</i>	ksantan	0,3	<i>faza B</i>	CreamMaker Blend	4
	glicerol	4		stearinska kislina	5
	prečiščena voda	59		jojobino olje	7
	hidrolat suhovetnice	5		rafinirano olivno olje	10
	natrijev metilparahidroksibenzoat	0,4		karitejevo maslo	3
<i>faza C</i>	EO suhovetnice	0,3			
	dimetikon	2			

Priprava nočne kreme je potekala v treh fazah; faza A, faza B in faza C. Najprej smo pripravili fazo A, kjer smo na analitski tehnični natehtali ustrezeno količino ksantana in glicerola ter ju v pateni dobro premešali. Nato smo v čašo natehtali ustrezeno količino prečiščene vode, hidrolata suhovetnice in natrijevega metilparahidroksibenzoata ter vsebino dobro premešali, da se je natrijev metilparahidroksibenzoat raztopil. S plastično kapalko smo raztopino postopoma (po kapljicah) dodajali v pateno h glicerolu in ksantanu, da smo dobili rahlo gelsko strukturo. Pateno smo nato pokrili in jo postavili v vodno kopel s temperaturo 75°C. Potem smo pripravili še fazo B, kjer smo na analitski tehnični natehtali ustrezene količine sestavin faze B in jih pomešali v pateni ter pokrito postavili v vodno kopel s temperaturo 75°C, da so se vse sestavine faze B stalile. Pateni s fazama A in B smo na vodni kopeli pustili toliko časa, da so se vse sestavine stalile in segrele na enako temperaturo. Nato smo obe fazi združili ter ju pomešali s pestilom, da smo dobili homogeno zmes. Medtem, ko se je zmes v pateni ohlajala (med občasnim mešanjem), smo pripravili še fazo C, kjer smo na analitski tehnični natehtali ustrezeno količino EO suhovetnice in dimetikona. Ko se je zmes faze A in B ohladila, smo dodali še fazo C ter vse dobro premešali. Ker nočna krema vsebuje lipofilne sestavine, ki vsebujejo neumiljive komponente in lahko delujejo antioksidativno, smo izdelali tudi nočno kremo, ki ne vsebuje EO in hidrolata suhovetnice in je služila kot kontrola in pripomogla k pravilni interpretaciji rezultatov. Njena receptura je predstavljena v preglednici II.

*preglednica II: Receptura nočne kreme brez eteričnega olja in hidrolata suhovetnice*

	<i>Sestavine</i>	<i>Delež (%)</i>
<i>faza A</i>	Ksantan	0,3
	glicerol	4
	prečiščena voda	64
	natrijev parahidroksibenzoat	0,4
<i>faza B</i>	CreamMaker Blend	4
	stearinska kislina	5
	jojobino olje	7
	rafinirano olivno olje	10
<i>faza C</i>	karitejevo maslo	3
	dimetikon	2,3

Nočno kremo brez EO in hidrolata suhovetnice smo pripravili po enakem postopku in v isti količini (20 g) kot nočno kremo, ki vsebuje EO in hidrolat suhovetnice.

### 3.3.2 Feritiocianatna metoda

#### 3.3.2.1 Priprava vzorcev

##### Priprava emulzije z linolno kislino

Za pripravo 100 ml emulzije z linolno kislino smo najprej v erlenmajerico z obrusom točno natehtali približno 750 mg linolne kisline, 200 mg Tween-a® 80 in do 100 ml dopolnili s 0,2 M fosfatnim puferom s pH 7. Nato smo dobljeno emulzijo, zaščiteno pred svetlobo, stresali 30 minut na stresalniku pri hitrosti 200 obratov/minuto.

##### Vgrajevanje eteričnega olja suhovetnice v emulzijo z linolno kislino

EO suhovetnice smo v emulzijo z linolno kislino dodali v različnih količinah, tako da smo dobili želene koncentracije EO suhovetnice glede na maso linolne kisline, in sicer: 1%, 3% in 5%. Recepture za pripravo emulzije z linolno kislino brez/z EO suhovetnice so prikazane v preglednici III. Emulzije z EO smo pripravili po enakem postopku kot emulzijo z linolno kislino.

*preglednica III: Recepture emulzije z linolno kislino in 1%, 3% in 5% EO suhovetnice glede na maso linolne kisline*

<i>sestavina</i>	<i>emulzija z</i>	<i>1% EO</i>	<i>3% EO</i>	<i>5% EO</i>
	<i>linolno kislino</i>	<i>suhovetnice</i>	<i>suhovetnice</i>	<i>suhovetnice</i>
<i>linolna kislina</i>	750 mg	750 mg	750 mg	750 mg
<i>tween® 80</i>	200 mg	200 mg	200 mg	200 mg
<i>eterično olje suhovetnice</i>	/	7,5 mg	22,5 mg	37,5 mg
<i>0,2 M fosfatni pufer (pH=7)</i>	do 100 ml	do 100 ml	do 100 ml	do 100 ml

##### Vgrajevanje hidrolata suhovetnice v emulzijo z linolno kislino

Hidrolat suhovetnice smo v emulzijo z linolno kislino dodali v različnih količinah, tako da smo dobili želene koncentracije hidrolata suhovetnice glede na maso linolne kisline, in sicer 3% (22,5 mg hidrolata) in 20% (150 mg hidrolata). Emulzije smo pripravili po enakem postopku kot emulzije z linolno kislino.

### Vgrajevanje kozmetičnega izdelka z/brez eteričnega olja in hidrolata suhovetnice v emulzijo z linolno kislino

Nočno kremo z EO in hidrolatom suhovetnice smo v emulzijo z linolno kislino vgradili tako, da smo v erlenmajerico z obrusom natehtali 750 mg linolne kisline, 200 mg Tween-a® 80 in 2 g nočne kreme z EO in hidrolatom suhovetnice ter do 100 ml dopolnili z 0,2 M fosfatnim pufrom (pH=7). Nato smo dobljeno emulzijo, zaščiteno pred svetlobo, na stresalniku stresali 30 minut s hitrostjo 200 obratov/minuto. Koncentracija EO suhovetnice je bila v pripravljeni emulziji 0,8% glede na maso linolne kisline in koncentracija hidrolata 13,3% glede na maso linolne kisline. Nočno kremo brez EO in hidrolata suhovetnice smo v emulzijo z linolno kislino vgradili po enakem postopku kot nočno kremo z EO in hidrolatom suhovetnice.

### Vgrajevanje vitamin E acetata in askorbil palmitata v emulzijo z linolno kislino

Za primerjavo rezultatov AOU EO suhovetnice smo v linolno kislino ločeno vgradili tudi vitamin E acetat ali AP v takšni količini, da smo dobili 3% (22,5 mg) koncentracijo vitamina E acetata glede na maso linolne kisline oziroma 3% (22,5 mg) koncentracijo AP glede na maso linolne kisline. Emulzije smo pripravili po enakem postopku kot emulzijo z linolno kislino.

### Priprava raztopine Tween-a® 80 v 0,2 M fosfatnem pufru (pH=7)

Ker Tween® 80 vsebuje oleinsko kislino, ki je maščobna kislina z eno nenasičeno vezjo in je lahko podvržena LP, lahko z nastankom LOOH vpliva na rezultate pri določanju AOU EO suhovetnice. Da bi ugotovili morebiten vpliv dodanega emulgatorja na rezultate metode smo pripravili raztopino Tween-a® 80 v 0,2 M fosfatnem pufru (pH=7). V erlenmajerico z obrusom smo natehtali 200 mg Tween-a® 80 in do 100 ml dopolnili z 0,2 M fosfatnim pufrom (pH=7). Nato smo raztopino zaščiteno pred svetlobo na stresalniku stresali 30 minut s hitrostjo 200 obratov/minuto.

#### **3.3.2.2 Obsevanje vzorcev z UVA svetlobo**

LP linolne kisline smo pospešili z obsevanjem vzorcev z UVA svetlobo, ki pospeši tvorbo LOOH. Uporabili smo čaše s premerom 3,3 cm in z volumnom 25 ml in vanje odmerili 15 ml vzorca ter jih obsevali z UV svetilko z valovno dolžino 365 nm (slika 11). UV svetilka je bila od podlage oddaljena 8,2 cm. Sočasno smo obsevali 6, 8 ali 9 vzorcev. Pri obsevanju 6 ali 8 vzorcev je bila polovica kontrolnih vzorcev - emulzija z linolno kislino brez dodanih AO, polovica pa testnih vzorcev - emulzija z linolno kislino, kateri so bili dodani AO (EO suhovetnice, AP, vitamin E acetat). Pri obsevanju 9 vzorcev so bili 3-je kontrolni vzorci

(emulzija z linolno kislino), 3-je vzorci so vsebovali 3% hidrolata suhovetnice ali nočno kremo z EO in hidrolatom suhovetnice, 3-je vzorci pa so vsebovali 20% hidrolata suhovetnice ali nočno kremo brez EO in hidrolata suhovetnice. Pri vsakem obsevanju smo uporabili kontrolne vzorce, saj so se pogoji (T, RV, p) v delovnem okolju dnevno spremenjali, poleg tega je dnevno naraščala tudi vsebnost LOOH v linolni kislini, ki smo jo uporabljali. Vzorce smo z UVA svetlobo obsevali največ 8 ur, pri tem pa ob določenih časovnih točkah (preglednica IV) odvzeli 0,5 ml posameznega vzorca, kateremu smo s FTC metodo posredno določili vsebnost LOOH.

*preglednica IV: Časovne točke pri katerih smo odvzeli vzorce za posamezne meritve*

vzorci	časovne točke
EO suhovetnice	1h, 2h, 4h, 6h in 8h
hidrolat suhovetnice	1h, 2h, 4h in 6h
nočna krema z/brez EO in hidrolata suhovetnice	4h in 6h
Tween® 80	1h, 2h, 4h, 6h in 8h
askorbil palmitat	1h, 2h, 4h, 6h in 8h
vitamin E acetat	1h, 2h in 4h

Medtem, ko smo vzorce obsevali z UVA svetlobo, smo v istem prostoru shranjevali tudi vzorce v čašah z enakim volumnom (25 ml) in premerom (3,3 cm), ki niso bili obsevani z UVA svetlobo. V teh vzorcih je LP potekala počasneje, tako so nam vzorci služili kot kontrola postopka, v primeru, da UVA svetilka ne bi delovala pravilno (npr., da ne bi enakomerno obsevala vzorcev). Vzorce smo odvzeli v istih časovnih točkah kot vzorce, ki so bili obsevani z UVA svetilko.



Slika 11: Obsevanje vzorcev z UV svetilko

### 3.3.2.3 Določanje antioksidativne učinkovitosti vzorcev

AOU vzorcev smo določali s FTC metodo, katere princip delovanja je opisan v uvodu diplomske naloge. AOU vzorcev smo določali tako, da smo 0,5 ml odvzetega

obsevanega/neobsevanega vzorca raztopili v 15 ml 75% (V/V) etanola. Nato smo v pripravljene raztopine dodali 0,5 ml 3,95 M NH<sub>4</sub>SCN in 0,5 ml FeCl<sub>2</sub> v 1,14 M HCl. Po dodatku reagentov je zaradi prisotnosti LOOH prišlo do oksidacije Fe<sup>2+</sup> v Fe<sup>3+</sup>, ki reagira s SCN<sup>-</sup> in tvori rdeče obarvan kompleks, kar je raztopino obarvalo rdeče in s tem omogočilo določanje absorbance vzorcev z UV/VIS spektrofotometrom pri valovni dolžini 485 nm. Absorbanco vzorcev smo izmerili točno 3 minute po dodatku vseh reagentov, saj je reakcija pretvorbe Fe<sup>2+</sup> v Fe<sup>3+</sup> in posledično obarvanost kompleksa časovno odvisna. Slep raztopino smo pripravili po enakem postopku, le da smo namesto 0,5 ml obsevanega vzorca uporabili 0,5 ml 75% (V/V) etanola.

AOU smo prikazali kot delež inhibicije LP linolne kisline, ki smo jo izračunali z naslednjo enačbo:

$$\% \text{ inhibicije lipidne peroksidacije} = 100 - \frac{A_{AO}}{A_0} \times 100 \quad \text{enačba 2}$$

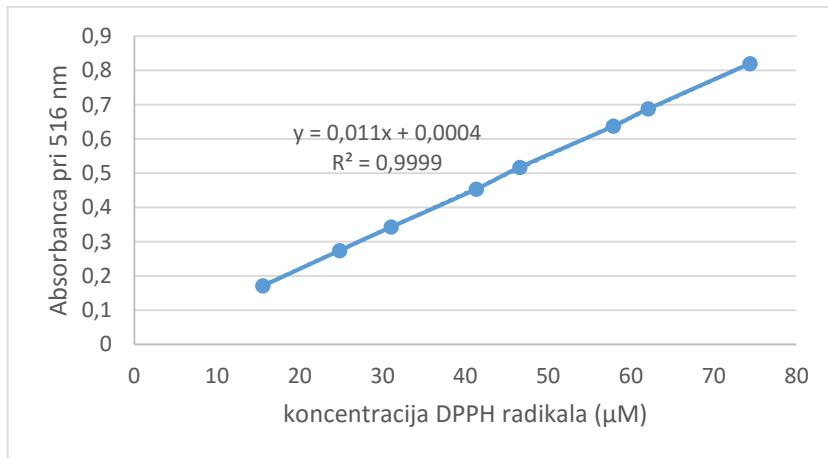
pri čemer A<sub>AO</sub> predstavlja absorbanco vzorca z AO, A<sub>0</sub> pa absorbanco vzorca brez dodanega AO.

### 3.3.3 Difenilpikrilhidrazilna metoda

#### 3.3.3.1 Priprava umeritvene premice za določanje koncentracije DPPH radikala

Umeritvena premica nam omogoča določanje neznane koncentracije DPPH radikala ob dodatku AO in posledično določitev AOU dodanega AO. Umeritveno premico za določanje koncentracije DPPH radikala smo pripravili tako, da smo pripravili različne koncentracije DPPH radikala raztopljenega v metanolu in mu pomerili absorbanco z UV/VIS spektrofotometrom pri valovni dolžini 516 nm, kjer ima absorpcijski maksimum. Raztopine s koncentracijami DPPH radikala od ~ 15 µM do ~ 75 µM smo pripravili tako, da smo najprej točno natehtali približno 13 mg DPPH radikala in ga raztopili v 25 ml metanola. 3 ml tako pripravljene raztopine smo nato z metanolom razredčili do 50 ml, da smo dobili osnovno raztopino s koncentracijo ~ 79,1 µM. Slednjo smo nato nadalje razredčili z metanolom, da smo dobili raztopine želenih koncentracij. Tem raztopinam DPPH radikala smo pomerili absorbanco pri valovni dolžini 516 nm. Nato smo po enakem postopku pripravili še drugo osnovno raztopino DPPH radikala, da smo upoštevali napake do katerih lahko pride pri tehtanju. Slednjo smo pripravili tako, da smo točno natehtali približno 10 mg DPPH radikala in ga raztopili v 20 ml metanola. 3 ml tako pripravljene raztopine smo nato z metanolom razredčili do 50 ml, da smo dobili osnovno raztopino s koncentracijo ~ 76,1 µM. Ponovno

smo z redčenjem osnovne raztopine pripravili raztopine z različnimi koncentracijami DPPH radikala v metanolu in jim pomerili absorbanco pri valovni dolžini 516 nm. Umeritveno premico za določanje koncentracije DPPH radikala prikazuje slika 12.



Slika 12: Umeritvena premica za določanje koncentracije DPPH radikala

### 3.3.3.2 Priprava vzorcev

#### Priprava reakcijske zmesi

Reakcijsko zmes smo pripravili iz metanolne raztopine DPPH radikala in metanolne raztopine AO. Metanolno raztopino DPPH radikala smo pripravili tako, da je bila koncentracija DPPH radikala v reakcijski zmesi ~ 63 μM. Točno smo natehtali približno 10 mg DPPH radikala in ga raztopili v 20 ml metanola s pomočjo ultrazvočne kadičke. 1 ml tako pripravljene raztopine smo razredčili z metanolom do 20 ml. 2400 μl te raztopine smo odpipetirali v kiveto in ji dodali 100 μl raztopine AO (EO suhocvetnice, hidrolat suhocvetnice, AP, vitamin E acetat) v metanolu (razen v primeru, ko smo merili AOU hidrolata suhocvetnice oziroma nočne kreme, kjer smo uporabili 1500 μl raztopine DPPH in 1500 μl hidrolata suhocvetnice oziroma raztopine nočne kreme).

Raztopine AO, ki smo jih dodali k reakcijski zmesi:

- **Priprava raztopin eteričnega olja suhocvetnice**

Za določanje AOU EO suhocvetnice smo pripravili dnevno sveže metanolne raztopine EO suhocvetnice različnih koncentracij (1,25-75% (m/V)), ki so ustrezale želenim koncentracijam EO suhocvetnice v reakcijski zmesi z DPPH radikalom (0,05-3% (m/V)).

- **Priprava raztopine nočne kreme**

Za določanje AOU KI, ki vsebuje EO in hidrolat suhocvetnice, smo pripravili metanolno raztopino nočne kreme. Raztopino smo pripravili tako, da smo 1g kreme redčili z metanolom do 10 ml in zaradi slabe topnosti mešali z magnetnim mešalom. Ker so v raztopini ostali

neraztopljeni delci kreme, ki bi lahko motili meritev z UV/VIS spektrofotometrom, smo raztopino filtrirali skozi filter papir. Po istem postopku smo pripravili tudi raztopino nočne kreme, ki ni vsebovala EO in hidrolata suhovetnice. Koncentracija EO suhovetnice naj bi bila v reakcijski zmesi ~ 0,012% (m/V) in koncentracija hidrolata suhovetnice naj bi bila v reakcijski zmesi ~ 0,2% (m/V), vendar zaradi filtriranja raztopine skozi filter papir tega ne moremo zagotoviti.

- **Priprava raztopin vitamin E acetata**

Metanolne raztopine vitamin E acetata smo pripravili tako, da smo pripravili različne koncentracije vitamin E acetata v metanolu (0,005-3,75% (m/V)), ki so ustrezale želenim koncentracijam vitamin E acetata v reakcijski zmesi v območju 0,0002-0,15% (m/V) oziroma 4,23 µM-3,17 mM.

- **Priprava raztopin askorabil palmitata**

Metanolne raztopine AP smo pripravili tako, da smo pripravili različne koncentracije AP v metanolu (0,009375-3,75% (m/V)), ki so ustrezale želenim koncentracijam AP v reakcijski zmesi v območju 0,000375-0,15% (m/V) oziroma 9,046 µM-3,62 mM.

### 3.3.3.3. Določanje antioksidativne učinkovitosti vzorcev

AOU vzorcev smo določali z DPPH metodo, katere princip delovanja je opisan v uvodu diplomske naloge. AOU vzorcev smo spremljali v različnih časovnih točkah (največ 1 uro) preko padca absorbance in posledično koncentracije DPPH radikala v reakcijski zmesi z UV/VIS spektrofotometrom pri valovni dolžini 516 nm. V prisotnosti AO v reakcijski zmesi in redukciji DPPH radikala se vijolična raztopina DPPH razbarva v rumeno raztopino. Slika 13 prikazuje vijolično raztopino DPPH, slika 14 pa rumeno raztopino, kjer je prišlo do redukcije DPPH radikala.



Slika 13: Vijočno obarvana raztopina DPPH radikala



Slika 14: Rumeno obarvana raztopina DPPH radikala

Časovne točke analize smo si izbrali glede na hitrost redukcije DPPH radikala z AO in končno časovno točko določili, ko je prišlo do ravnotežnega stranja. Meritve smo izvajali v zatemnjjenem prostoru, saj je DPPH radikal občutljiv na svetlobo. Poleg tega smo tudi kiveto pokrili s pokrovčkom, da smo preprečili izhlapevanje metanola, kar bi lahko vplivalo na višjo koncentracijo DPPH radikala v kiveti.

Najprej smo izvedli meritev za vzorec, pri katerem smo k 2400 µl DPPH raztopine dodali 100 µl metanola in spremljali absorbanco in posledično tudi koncentracijo DPPH radikala pri valovni dolžini 516 nm. S tem smo zagotovili, da v določenem časovnem intervalu (1 ura) ne pride do spremembe koncentracije oziroma do razgradnje DPPH radikala zaradi obsevanja z UV svetlobo.

Pri merjenju absorbance DPPH radikala z AO pa smo najprej v kiveto dodali raztopino DPPH radikala in ji pomerili absorbanco ter posledično določili koncentracijo ( $C_0$ ), nato smo dodali določen volumen raztopine vzorca in v različnih časovnih točkah pomerili absorbanco in posledično določili koncentracijo ( $C_t$ ) pri valovni dolžini 516 nm.

AOU vzorcev smo prikazali kot delež (%) preostalega DPPH radikala, kar prikazuje enačba 3.

$$\% DPPH = \frac{C_t}{C_0} \times 100 \quad \text{enačba 3}$$

Ker so v literaturi najpogosteje rezultati DPPH metode prikazani s parametrom EC<sub>50</sub>, smo za EO suhovcvetnice in AP rezultate predstavili tudi s tem parametrom.

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

V okviru diplomskega dela smo želeli določiti AOU EO suhovetnice in rezultate primerjati z AO, ki se sicer pogosto uporablajo v KI. Tako smo za primerjavo določili tudi AOU vitamin E acetata in AP. Ker pri pridobivanju EO nastaja tudi hidrolat, v katerem so raztopljeni vodotopni komponenti EO suhovetnice, nas je zanimalo ali tudi hidrolat suhovetnice deluje antioksidativno. Izdelali smo tudi nočno krema, ki vsebuje tako EO kot hidrolat suhovetnice in določili njeno antioksidativno delovanje, saj mora antioksidativno delovati ne le sestavina, ampak tudi končni produkt, ki ga nenazadnje uporabljamo. AOU teh komponent smo spremljali s FTC metodo in DPPH metodo.

### 4.1 DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI S FTC METODO

AOU s FTC metodo smo določali EO suhovetnice, hidrolatu suhovetnice, vitamin E acetatu, AP in nočni kremini, ki je vsebovala EO in hidrolat suhovetnice. Pripravili smo emulzije z linolno kislino, kateri smo dodali različne količine omenjenih komponent, da smo dobili želene koncentracije.

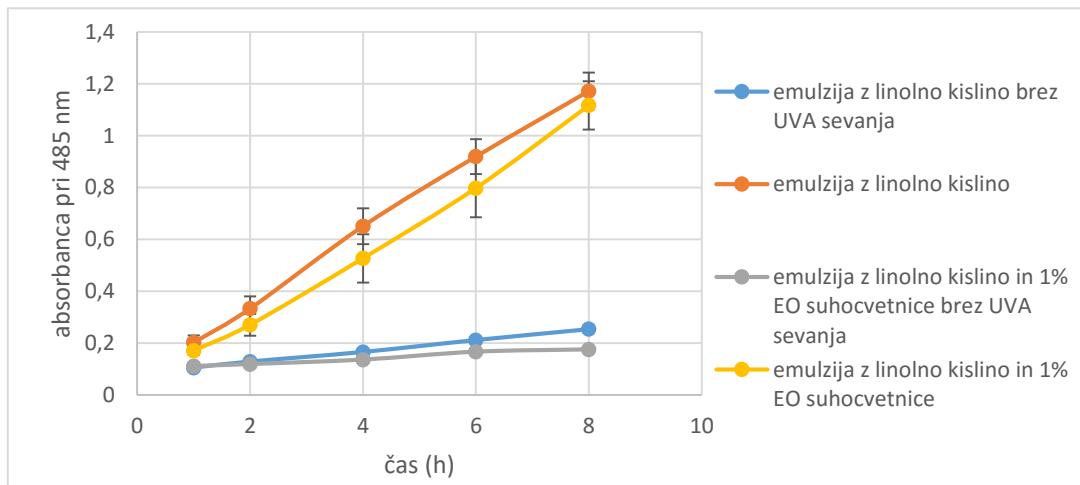
#### 4.1.1 Določanje antioksidativne učinkovitosti eteričnega olja suhovetnice

Pri določanju AOU EO suhovetnice smo pripravili emulzije z linolno kislino, ki so vsebovale 1%, 3% in 5% EO suhovetnice glede na maso linolne kisline. Z UV svetilko smo naenkrat obsevali 8 vzorcev, pri čemer so bili 4-je vzorci kontrola (emulzija z linolno kislino), 4-je vzorci pa so vsebovali določeno količino EO suhovetnice. Vzorce smo obsevali 8 ur in medtem v časovnih intervalih (1h, 2h, 4h, 6h in 8h) odvzeli 0,5 ml vzorca ter s FTC metodo določili AOU. V istih časovnih intervalih smo odvzeli tudi 4 vzorce, ki niso bili izpostavljeni UV svetilki, 2 vzorca sta predstavljala emulzijo z linolno kislino, 2 vzorca pa sta vsebovala emulzijo z linolno kislino in EO suhovetnice.

AOU smo posredno spremljali z merjenjem absorbance nastalega rdeče barvanega kompleksa med  $\text{Fe}^{3+}$  in  $\text{SCN}^-$ . Višja kot je bila absorbanca omenjenega kompleksa, več je bilo prisotnih LOOH, ki so nastali pri LP linolne kisline. Slike 15, 16 in 17 prikazujejo potek LP linolne kisline v odvisnosti od časa obsevanja vzorcev z UV svetilko. Iz slik 15, 16 in 17, ki prikazujejo povprečne vrednosti absorbanci pri 485 nm z upoštevanjem standardnega odklona ( $n=4$ ) je razvidno, da je standardni odklon večji pri vzorcih, ki so bili obsevani z

UV svetilko kot pri neobsevanih vzorcih. Vrednosti absorbanc so se pri obsevanih vzorcih zelo razlikovale glede na mesto nahajanja vzorca pod UV svetilko, kar pomeni, da UV svetilka ni enakomerno obsevala naših vzorcev in s tem povzročila različno hitrost LP. Problem smo delno rešili tako, da smo vzorce tekom dela vedno postavili na isto mesto obsevanja, tako da je bila polovica kontrolnih vzorcev in polovica vzorcev z AO na mestu, kjer je bilo obsevanje manjše in polovica obeh vzorcev na mestu, kjer je bilo obsevanje večje. Za določanje AOU smo upoštevali povprečne vrednosti absorbanc teh vzorcev. Ker UV svetilka ni enakomerno obsevala naših vzorcev, bi morali za bolj ponovljive rezultate metodo ponoviti z drugo UV svetilko ali pa uporabiti drug pristop za pospešitev LP (npr. shranjevanje vzorcev pri povišani temperaturi).

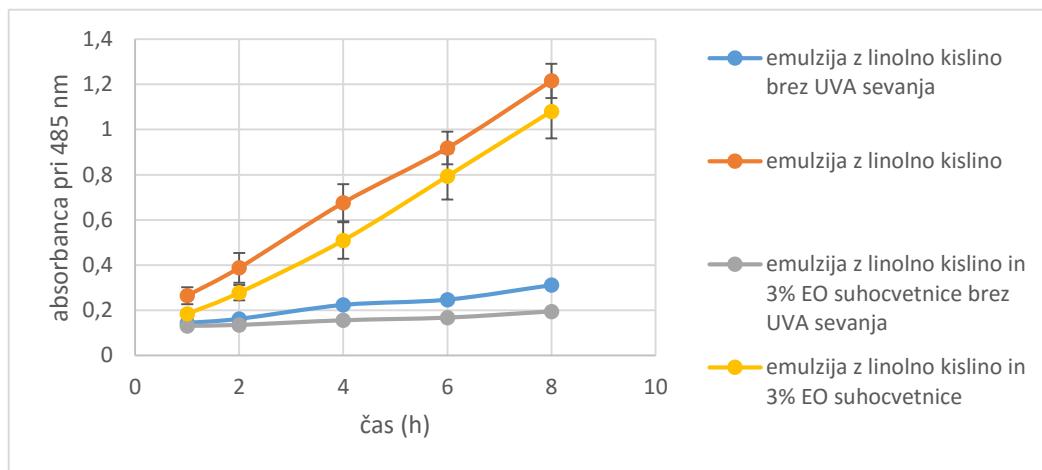
Slika 15 prikazuje časovni potek LP vzorcev, ki so vsebovali 1% EO suhovetnice glede na maso linolne kisline. Iz slike 15 je razvidno, da že 1% dodanega EO suhovetnice vpliva na inhibicijo LP. AOU EO je najbolj vidna po 4-ih in 6-ih urah obsevanja, ko je razlika v absorbancah med kontrolnim vzorcem in vzorcem z AO največja, ni pa statistično zanesljiva. Pri neobsevanih vzorcih je izmerjena absorbanca zelo nizka, saj LP poteka počasneje. Posledično je prisotnih manj LOOH, ki bi oksidirali  $\text{Fe}^{2+}$  v  $\text{Fe}^{3+}$ , ki bi nadalje reagirali s  $\text{SCN}^-$  in tvorili rdečeobarvan kompleks, kateremu merimo absorbanco pri 485 nm. Tudi pri neobsevanih vzorcih je med kontrolnim vzorcem in vzorcem z 1% EO suhovetnice opazna razlika pri nastajanju LOOH.



Slika 15: Časovni potek lipidne peroksidacije linolne kisline z/brez UVA obsevanja v prisotnosti 1% EO suhovetnice.  
Rezultati so podani kot povprečje  $\pm$  SD (n=4)

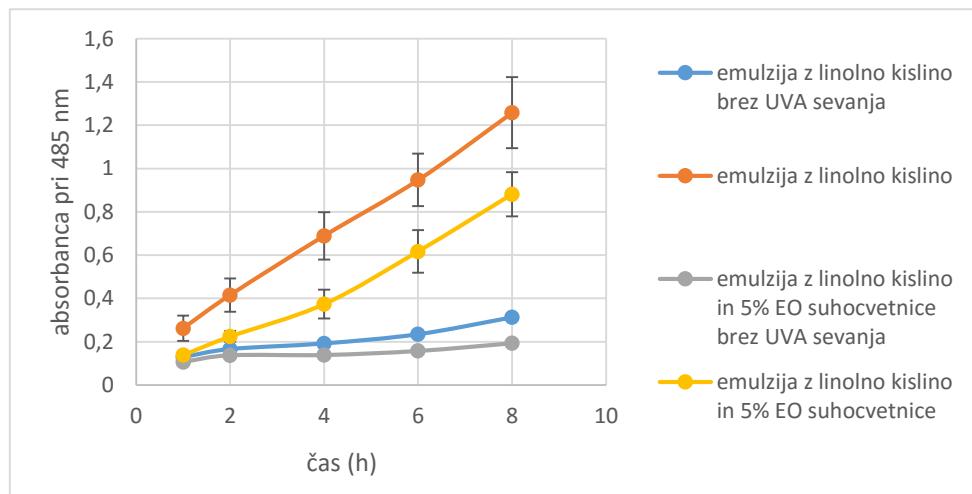
Slika 16 prikazuje časovni potek LP vzorcev, ki so vsebovali 3% EO suhovetnice glede na maso linolne kisline. Iz slike 16 je razvidno, da je v prisotnosti 3% EO inhibicija LP višja kot v prisotnosti 1% EO suhovetnice. AOU EO je najvišja po 4-ih urah obsevanja, nato pa

začne padati, ker je AO premalo, da bi nevtraliziral vse radikale. Tudi pri neobsevanih vzorcih je razvidno, da manj LOOH nastaja pri vzorcih s 3% EO suhovetnice kot pri kontrolnem vzorcu.



Slika 16: Časovni potek lipidne peroksidacije linolne kisline z/brez UVA obsevanja v prisotnosti 3% EO suhovetnice. Rezultati so podani kot povprečje  $\pm$  SD ( $n=4$ )

Slika 17 prikazuje časovni potek LP vzorcev, ki so vsebovali 5% EO suhovetnice glede na maso linolne kisline. Iz slike 17 je razvidno, da je inhibicija LP v prisotnosti 5% EO suhovetnice višja kot pri vzorcih z nižjo vsebnostjo EO suhovetnice. Poleg tega AOU EO suhovetnice po 8-ih urah obsevanja ne upade (kot v prisotnosti 1% in 3% EO suhovetnice), kar nakazuje, da je AO še dovolj, da reducira nastale radikale.



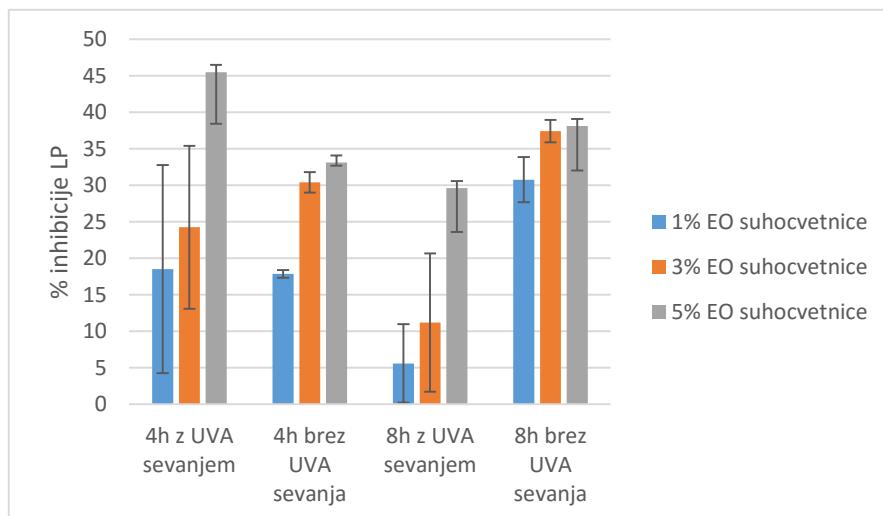
Slika 17: Časovni potek lipidne peroksidacije linolne kisline z/brez UVA obsevanja v prisotnosti 5% EO suhovetnice. Rezultati so podani kot povprečje  $\pm$  SD ( $n=4$ )

#### 4.1.1.1 Vpliv različnih koncentracij EO suhovetnice na AOU

AOU EO suhovetnice smo prikazali kot delež (%) inhibicije LP. Ker je iz slik 15, 16 in 17 razvidno, da je razlika absorbanc med kontrolnimi in testnimi vzorci, ki so bili obsevani z

UVA svetlobo, največja po 4-ih urah obsevanja, smo se odločili, da bomo delež (%) inhibicije LP določili pri tem času obsevanja. Delež inhibicije LP smo določili tudi po 8-ih urah obsevanja vzorcev in primerjali z rezultati neobsevanih vzorcev ob istih časovnih točkah (4h in 8h). Slika 18 prikazuje vpliv koncentracije EO suhovetnice v emulziji z linolno kislino na AOU, ki je prikazana kot delež (%) inhibicije LP. Kot je razvidno iz slike 18, je AOU EO suhovetnice v vseh časovnih točkah najboljša pri najvišji koncentraciji EO (5%) tako pri vzorcih, ki so bili obsevani z UVA svetlobo, kot pri neobsevanih vzorcih. Delež inhibicije LP je višji pri neobsevanih vzorcih v primerjavi z obsevanimi vzorci tako po 4 urah kot po 8 urah (z izjemo vzorca s 5% EO suhovetnice, kjer je po 4-ih urah delež inhibicije LP nižji). Sklepamo, da LP pri neobsevanih vzorcih poteka počasneje; posledično nastane manj LOOH, ki jih EO reducira. Manj kot je prisotnih LOOH, boljša je torej inhibicija LP, saj je za nevtralizacijo LOOH na razpolago več AO.

V skladu s tem smo pričakovali, da bo tudi pri neobsevanih vzorcih s 5% EO suhovetnice delež inhibicije LP višji kot pri obsevanih vzorcih, vendar so rezultati nasprotni. Možna razloga je, da med mešanjem s stresalnikom pri pripravi emulzije z linolno kislino ni prišlo do homogene razporeditve EO suhovetnice v emulziji, kar je vplivalo na manjšo vsebnost EO suhovetnice v vzorcu in posledično nižji delež inhibicije LP.



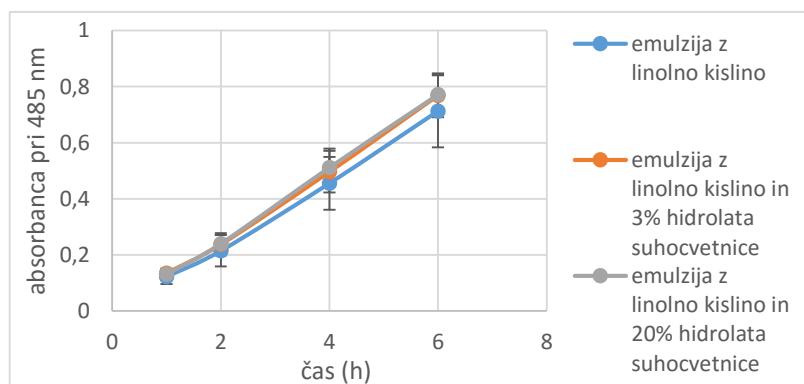
Slika 18: Prikaz AOU EO suhovetnice v različnih koncentracijah z % inhibicije LP. Rezultati so podani kot povprečje  $\pm$  SD ( $n=4$ )

#### 4.1.2 Določanje antioksidativne učinkovitosti hidrolata suhovetnice

Pri določanju AOU hidrolata suhovetnice smo pripravili emulzije z linolno kislino kot oljno fazo, ki so vsebovale 3% oziroma 20% hidrolata suhovetnice glede na maso linolne kisline. Z UV svetilko smo naenkrat obsevali 9 vzorcev, pri čemer so bili 3-je kontrolni vzorci

(emulzija z linolno kislino), 3-je vzorci so vsebovali 3% hidrolata in 3-je vzorci 20% hidrolata suhovetnice. Vzorce smo obsevali 6 ur in v časovnih intervalih (1h, 2h, 4h in 6h) odvzeli 0,5 ml vsakega vzorca ter s FTC metodo določili AOU.

Slika 19 prikazuje časovni potek LP linolne kisline v prisotnosti 3% in 20% hidrolata suhovetnice. Iz slike 19 je razvidno, da je vrednost absorbanc emulzij z linolno kislino, ki vsebujejo 3% ali 20% hidrolata suhovetnice, višja kot pri kontrolnem vzorcu. To pomeni, da je prisotnost LOOH višja in hidrolat suhovetnice ne izkazuje antioksidativnega delovanja. Ker hidrolat vsebuje vodotopne komponente EO suhovetnice, LOOH, ki nastajajo pri LP pa so lipofilni, ne more inhibirati LP, poleg tega so tudi vodotopne komponente EO v hidrolatu v zelo nizkih koncentracijah. Razlike med absorbancami kontrolnega vzorca in testnih vzorcev pripisujemo eksperimentalni napaki, kar lahko sklepamo iz rezultatov meritev AOU EO suhovetnice, kjer smo ugotovili, da UV svetilka vzorcev ne obseva enakomerno.



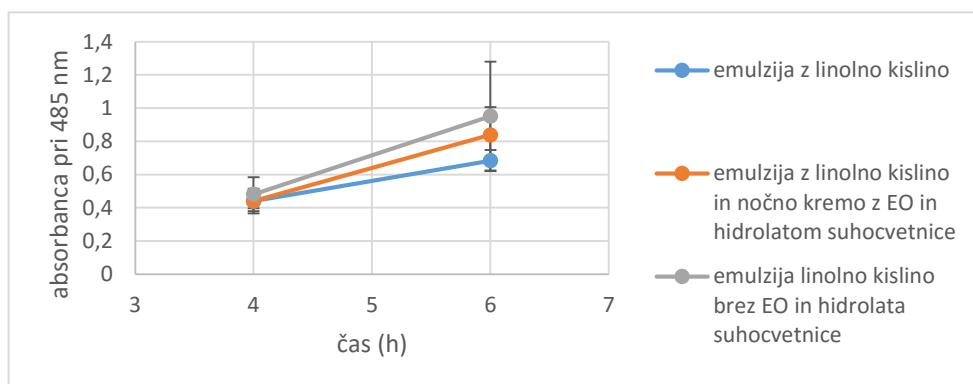
*Slika 19: Časovni potek lipidne peroksidacije linolne kisline v prisotnosti 3% in 20% hidrolata suhovetnice. Rezultati so podani kot povprečje  $\pm$  SD ( $n=3$ )*

#### 4.1.3 Določanje antioksidativne učinkovitosti kozmetičnega izdelka z eteričnim oljem in hidrolatom suhovetnice

Pri določanju AOU KI z EO in hidrolatom suhovetnice smo pripravili nočno kremo, ki je vsebovala EO in hidrolat suhovetnice ter jo dodali v emulzijo z linolno kislino. Koncentracija EO suhovetnice v tako pripravljeni emulziji je bila 0,8%, koncentracija hidrolata suhovetnice pa 13,3% glede na maso linolne kisline. Z UV svetilko smo naenkrat obsevali 9 vzorcev, pri čemer so bili 3-je kontrolni vzorci (emulzija z linolno kislino), 3-je vzorci so vsebovali nočno kremo z EO in hidrolatom suhovetnice, 3-je vzorci pa so vsebovali nočno kremo brez dodanega EO in hidrolata suhovetnice. Slednji so prav tako služili kot kontrola, saj lahko lipofilne sestavine nočne kreme zaradi vsebnosti neumiljivih

komponent delujejo antioksidativno, po drugi strani pa lahko zaradi prisotnih nenasičenih vezi na njih poteka tudi LP, ki poveča količino LOOH in s tem vpliva na rezultate metode. Vzorce, ki so vsebovali nočno kremo, smo obsevali 6 ur z UVA, nato smo jim s FTC metodo določili AOU.

Slika 20 prikazuje časovni potek LP linolne kisline v prisotnosti nočne kreme z/brez EO in hidrolata suhocvetnice. Iz slike 20 je razvidno, da je absorbanca kontrolnih vzorcev (emulzija z linolno kislino) nižja kot pri vzorcih, ki vsebujejo nočno kremo z/brez EO in hidrolata suhocvetnice. Pričakovali smo, da bo absorbanca vzorcev nočne kreme z EO in hidrolatom suhocvetnice nižja ali vsaj približno enaka kontrolnemu vzorcu. Rezultat kaže, da je LP potekla tudi na lipofilnih sestavinah (rafinirano olivno olje, jojobino olje itd.) nočne kreme, ki vsebujejo nenasičene vezi. Posledično je količina LOOH v teh vzorcih višja kot pri emulziji z linolno kislino. Če primerjamo ta rezultat z absorbancama vzorcev, ki so vsebovali nočno kremo brez EO in hidrolata suhocvetnice, vidimo da sta EO in hidrolat suhocvetnice v nočni kremi nekoliko vplivala na manjši obseg LP, vendar razlike niso statistično zanesljive.

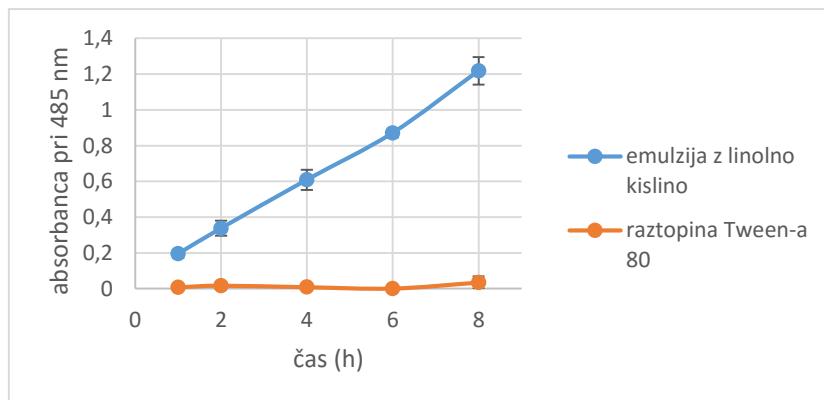


*Slika 20: Potek lipidne peroksidacije linolne kisline v prisotnosti nočne kreme z/brez EO in hidrolata suhocvetnice.  
Rezultati so podani kot povprečje ± SD (n=3)*

#### 4.1.4 Vpliv Tween-a® 80 na prisotnost hidroperoksidov

Zanimalo nas je, kako prisotnost Tween-a® 80 vpliva na nastanek LOOH, saj vsebuje tudi oleinsko kislino, ki vsebuje nenasičeno vez in je lahko podvržena LP. Pripravili smo raztopino Tween-a® 80 v fosfatnem pufru in ga obsevali z UV svetilko. Z UV svetilko smo naenkrat obsevali 8 vzorcev, pri tem so bili 4-je vzorci raztopine Tween-a® 80 in 4-je kontrolni vzorci (emulzija z linolno kislino). Vnaprej določenih časovnih točkah smo vsebnost LOOH v vzorcih določili s FTC metodo.

Slika 21 prikazuje časovni potek LP Tween-a® 80 v primerjavi z linolno kislino. Kot je iz slike razvidno, je absorbanca kompleksa med  $\text{Fe}^{3+}$  in  $\text{SCN}^-$ , ki posredno prikazuje vsebnost LOOH, pri raztopini Tween-a® 80 konstantna in ima vrednost  $\sim 0$ . S tem smo dokazali, da Tween® 80 ne vpliva na prisotnost LOOH v vzorcu, torej je ustrezen za izvedbo metode.



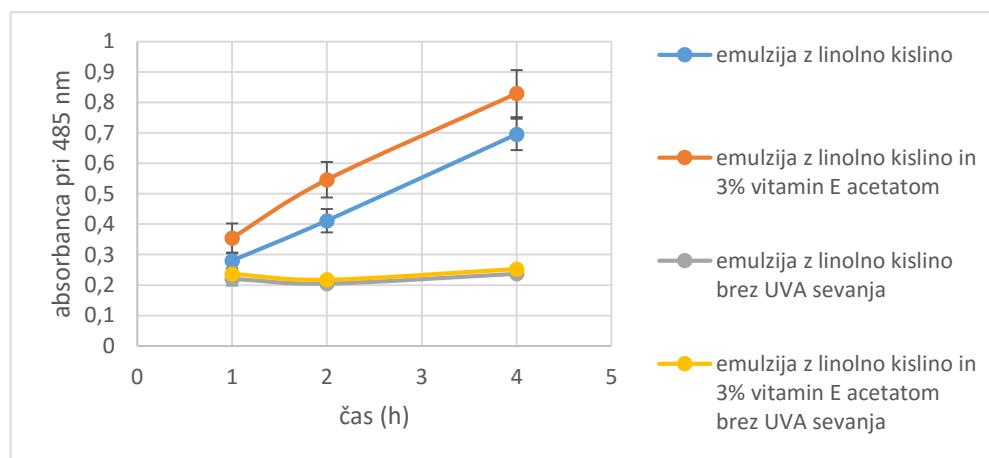
Slika 21: Potek lipidne peroksidacije Tween-a 80. Rezultati so podani kot povprečje  $\pm \text{SD}$  ( $n=4$ )

#### 4.1.5 Primerjava antioksidativne učinkovitosti eteričnega olja suhocvetnice z askoribil palmitatom in vitamin E acetatom

Ker smo s FTC metodo dokazali, da EO suhocvetnice deluje antioksidativno, nas je zanimalo, kakšna je AOU EO suhocvetnice v primerjavi z najpogosteje uporabljenimi AO v KI. Tako smo pripravili različne vzorce emulzij z linolno kislino, ki so vsebovali vitamin E acetat ali AP v koncentraciji 3% glede na maso linolne kisline. Z UV svetilko smo naenkrat obsevali 8 vzorcev, pri čemer so 4-je vzorci vsebovali vitamin E acetat ali AP, 4-je vzorci pa so bili kontrolni. Poleg tega smo 4 vzorce shranjevali pri istih pogojih kot vzorce, ki so bili obsevani z UV svetilko, le da ti niso bili izpostavljeni UVA sevanju. Pri tem je bila polovica vzorcev kontrolnih, polovica vzorcev pa je vsebovala 3% vitamin E acetata ali 3% AP glede na maso linolne kisline.

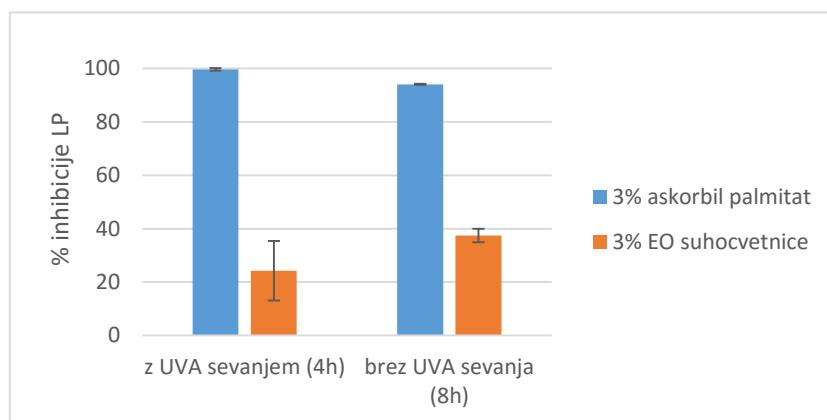
Vzorce, ki so vsebovali vitamin E acetat smo obsevali največ 4 ure in ob časovnih intervalih (1h, 2h in 4h) odvzeli 0,5 ml vzorca ter mu s FTC metodo določili AOU. Slika 22 prikazuje časovni potek LP linolne kisline v prisotnosti vitamin E acetata. Iz slike 22 je razvidno, da je izmerjena absorbanca vzorcev, ki so vsebovali vitamin E acetat, višja kot absorbanca kontrolnega vzorca. Uporabljen vitamin E acetat torej ne deluje antioksidativno, temveč je celo pospešil LP linolne kisline, saj je količina prisotnih LOOH višja kot v kontrolnem vzorcu. V literaturi je navedeno, da naj bi vitamin E acetat deloval antioksidativno, vendar pa je za njegovo antioksidativno delovanje potrebna pretvorba v vitamin E. Ker vitamin E

acetat predstavlja ester vitamina E in ocetne kisline, se esterska vez cepi le z reakcijo hidrolize z encimi – esterazami, ki se nahajajo tudi v koži. (60) Torej s FTC metodo ne moremo določiti AOU vitamin E acetata, saj ni prišlo do pretvorbe do vitamina E. Za določanje AOU vitamin E acetata bi morali uporabiti drugo metodo, kjer bi prišlo do hidrolize in posledično do cepitve vezi (*ex vivo* študija na človeški koži).



Slika 22: Potek lipidne peroksidacije linolne kisline v prisotnosti 3% vitamin E acetata. Rezultati so podani kot povprečje ± SD (n=4)

Vzorce, ki so vsebovali 3% AP glede na maso linolne kisline, smo obsevali 8 ur in v ustreznih časovnih točkah določili AOU s FTC metodo. AOU EO suhovetnice smo opredelili kot delež inhibicije LP po 4-ih urah obsevanja vzorcev z UVA. Odločili smo se, da bomo AOU AP in EO suhovetnice primerjali v istih časovni točki in pri isti vsebnosti AO (tj. 3% vsebnost AO, 4h obsevanja). Zaradi bolj izražene razlike med vzorci, smo delež inhibicije LP neobsevanih vzorcev primerjali po 8-ih urah shranjevanja vzorcev. Slika 23 prikazuje delež inhibicije LP linolne kisline v prisotnosti AP ali EO suhovetnice.



Slika 23: Primerjava AOU askorbil palmitata in EO suhovetnice z deležem inhibicije LP linolne kisline. Rezultati so podani kot povprečje ± SD (n=4)

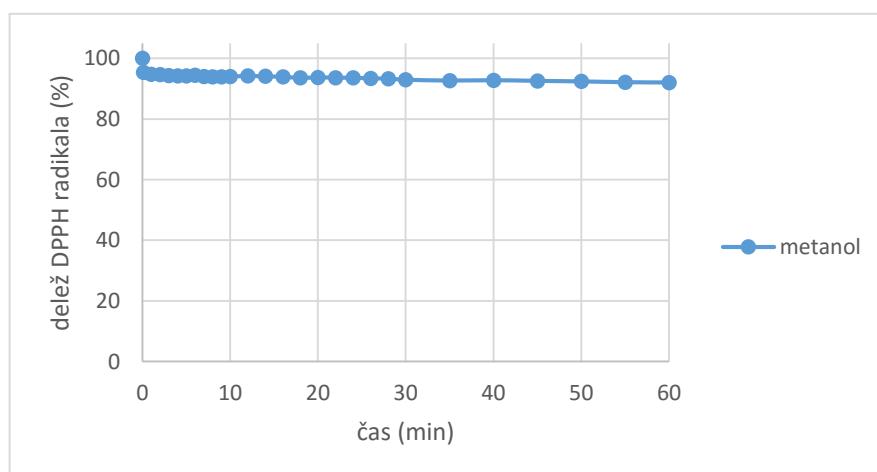
Po 4-ih urah je bila pri obsevanih vzorcih s 3% vsebnostjo AP inhibicija LP ~ 99,7%, pri neobsevanih vzorcih pa ~ 94,1%. Inhibicija LP linolne kisline pri vzorcih z EO suhovetnice, ki smo jih obsevali z UVA svetlobo, je bila ~ 24,24%, pri neobsevanih vzorcih pa ~ 37,4%. To pomeni, da je AP pri omenjeni koncentraciji ~ 4-krat (pri obsevanih vzorcih) oziroma ~ 2,5-krat (pri neobsevanih vzorcih) bolj učinkovit kot EO suhovetnice.

## 4.2 DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI Z DPPH METODO

AOU z DPPH metodo smo določali EO suhovetnice, hidrolatu suhovetnice, nočni kremlji, ki je vsebovala EO in hidrolat suhovetnice, vitamin E acetatu in AP. Pripravili smo raztopine ustreznih koncentracij teh sestavin, ter jih dodali v reakcijsko zmes in AOU določili z DPPH metodo.

### 4.2.1 Stabilnost DPPH radikala

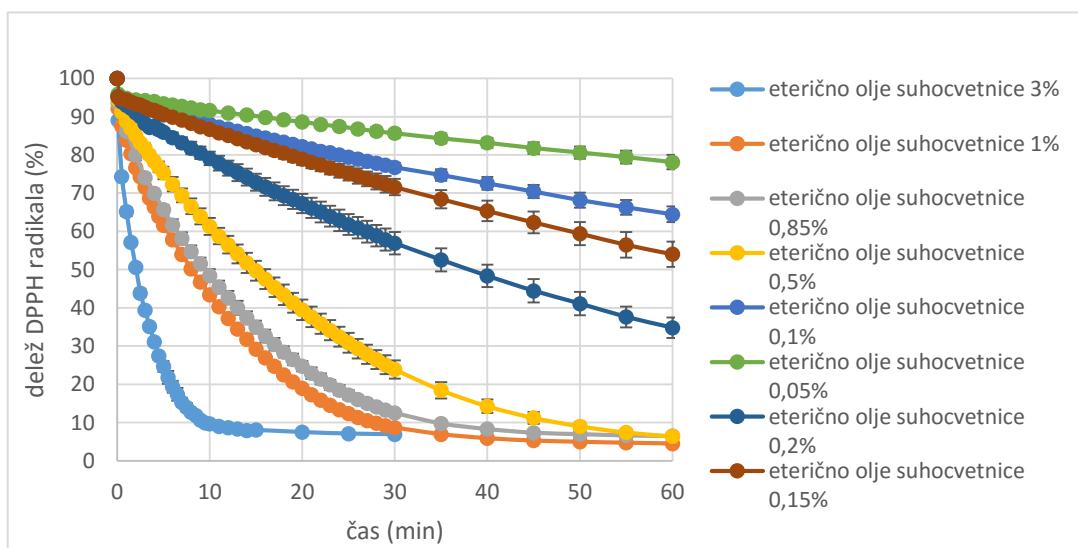
Pred začetkom meritev smo želeli potrditi, da UV svetloba pri merjenju absorbance ne vpliva na razpad DPPH radikala. Tako smo v reakcijsko zmes namesto 100 µl raztopine AO odpipetirali 100 µl metanola. Slika 24 prikazuje delež (%) preostalega DPPH radikala v prisotnosti 100 µl metanola izmerjenega v določenih časovnih intervalih. Koncentracija DPPH radikala je takoj po dodatku 100 µl metanola padla za ~ 4,6% (zaradi razredčitve reakcijske zmesi s 100 µl metanola), končni delež preostalega DPPH radikala pa je bil ob času 60 min ~ 92,02%. To pomeni, da je DPPH radikal stabilen pri obsevanju z UV svetlobo in ne bo vplival na rezultate meritev pri določanju AOU EO in hidrolata suhovetnice.



Slika 24: Časovni potek razpada DPPH radikala v prisotnosti 100 µl metanola

#### 4.2.2 Določanje antioksidativne učinkovitosti eteričnega olja suhocvetnice

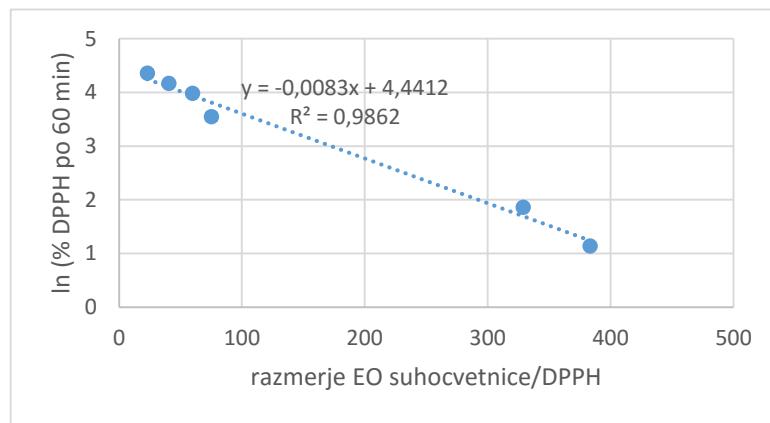
Pri določanju AOU EO suhocvetnice smo pripravili metanolne raztopine z ustrezno koncentracijo EO suhocvetnice (1,25-75% (m/V)). Pripravljene raztopine smo dodali k reakcijski zmesi, da smo v le-tej dobili želeno koncentracijo AO (0,05-3% (m/V)) in spremljali absorbanco in koncentracijo DPPH radikala 1 uro (z izjemo vzorca s 3% (m/V) EO suhocvetnice, ki smo ga spremljali 30 minut). Pri tem smo ob določenih časovnih intervalih pomerili absorbanco pri valovni dolžini 516 nm z UV/VIS spektrofotometrom. Slika 25 prikazuje spremjanje deleža DPPH radikala v odvisnosti od časa v prisotnosti različnih koncentracij EO suhocvetnice. Iz slike 25 je razvidno, da z naraščanjem koncentracije EO suhocvetnice pada delež preostalega DPPH radikala v reakcijski zmesi po 1 uri meritve. S 3% (m/V) EO suhocvetnice v reakcijski zmesi smo ravnotežno stanje dosegli že po ~ 10 minutah, z 1% in 0,85% pa po ~ 40 minutah inkubacije. Reakcijske zmesi, ki so vsebovale EO suhocvetnice v koncentraciji 0,05-0,2% ravnotežnega stanja v 60 minutah še niso dosegle; če bi želeli določiti ravnotežno stanje tudi za te raztopine, bi morali delež DPPH radikala spremljati dlje časa.



Slika 25: Časovni potek spremjanja deleža DPPH radikala v odvisnosti od različnih koncentracij EO suhocvetnice v reakcijski zmesi. Rezultati so podani kot povprečje  $\pm$  SD ( $n=2$ )

AOU EO suhocvetnice smo prikazali s parametrom EC<sub>50</sub>, ki predstavlja koncentracijo AO, ki je potrebna, da začetno koncentracijo DPPH zmanjša za 50%. Za izračun EC<sub>50</sub> smo uporabili rezultate vrednosti koncentracij DPPH radikala po 60 minutah inkubacije v prisotnosti določenih koncentracij EO suhocvetnice (0,05%, 0,1%, 0,15%, 0,2%, 0,85% in 1%). Slika 26 prikazuje odvisnost ln (% preostalega DPPH radikala po 60 minutah) od masnega razmerja EO suhocvetnice/DPPH v reakcijski zmesi. Parameter EC<sub>50</sub> smo

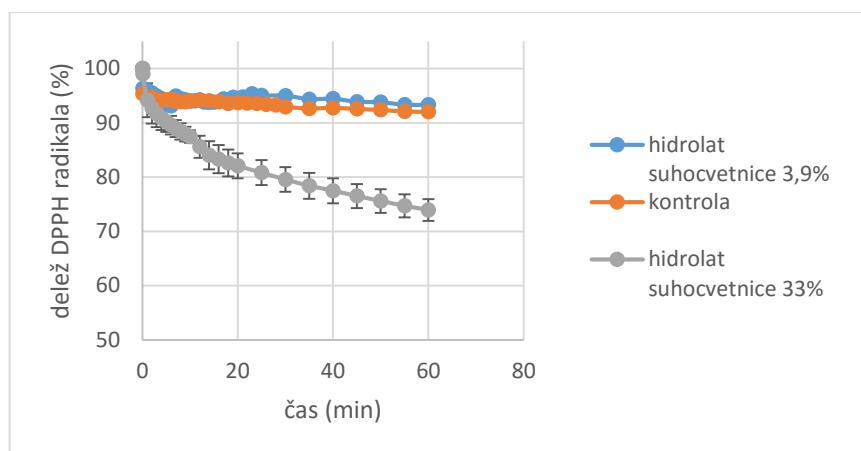
izračunali iz enačbe premice, ki jo prikazuje slika 26. Pri tem smo namesto koncentracij EO suhovetnice uporabili masno razmerje EO suhovetnice/DPPH radikala v reakcijski zmesi. Začetna koncentracija DPPH radikala namreč ni bila vedno iste vrednosti, kar bi potencialno lahko vplivalo na rezultate meritev. Parameter EC<sub>50</sub> znaša ~ 0,152% (m/V) EO suhovetnice v reakcijski zmesi pri 63 µM začetni koncentraciji DPPH radikala (pri masnem razmerju EO suhovetnice/DPPH ~ 63,76).



Slika 26: Prikaz  $\ln (\% \text{ preostalega DPPH po } 60 \text{ min})$  v odvisnosti od masnega razmerja EO suhovetnice/DPPH. Rezultati so podani kot povprečje ± SD ( $n=2$ )

#### 4.2.3 Določanje antioksidativne učinkovitosti hidrolata suhovetnice

Za določanje AOU hidrolata suhovetnice smo v kiveto odmerli 2400 µl raztopine DPPH in dodali 100 µl hidrolata suhovetnice. Tako smo dobili koncentracijo hidrolata suhovetnice v reakcijski zmesi 3,9% (m/V). Absorbanco in koncentracijo DPPH radikala smo spremljali 1 uro in ob določenih časovnih intervalih merili absorbanco pri valovni dolžini 516 nm. Ker se delež DPPH radikala ni znižal oziroma je bil enak kontroli (2400 µl DPPH raztopine + 100 µl metanola), kar prikazuje slika 27, smo povečali koncentracijo hidrolata suhovetnice v reakcijski zmesi. Novo reakcijsko zmes smo pripravili tako, da smo v kiveto odmerli 1500 µl DPPH raztopine in dodali 1500 µl hidrolata suhovetnice ter dobili reakcijsko zmes s 33% (m/V) hidrolatom suhovetnice. Spremembo absorbance in koncentracije DPPH radikala smo prav tako spremljali ob določenih časovnih intervalih do 1 ure. Iz slike 27 je razvidno, da 33% (m/V) hidrolat suhovetnice deluje antioksidativno, saj je po 1 uri merjenja zmanjšal koncentracijo DPPH radikala na 73,95%. Ta rezultat dokazuje, da hidrolat suhovetnice deluje antioksidativno, vendar pa je treba poudariti, da je bila koncentracija hidrolata suhovetnice zelo visoka. Če bi želeli, da hidrolat suhovetnice v KI deluje antioksidativno, bi ga morali vgraditi v zelo visoki koncentraciji, kar je skoraj neizvedljivo, razen če bi z njim nadomestili večji del vodne faze.

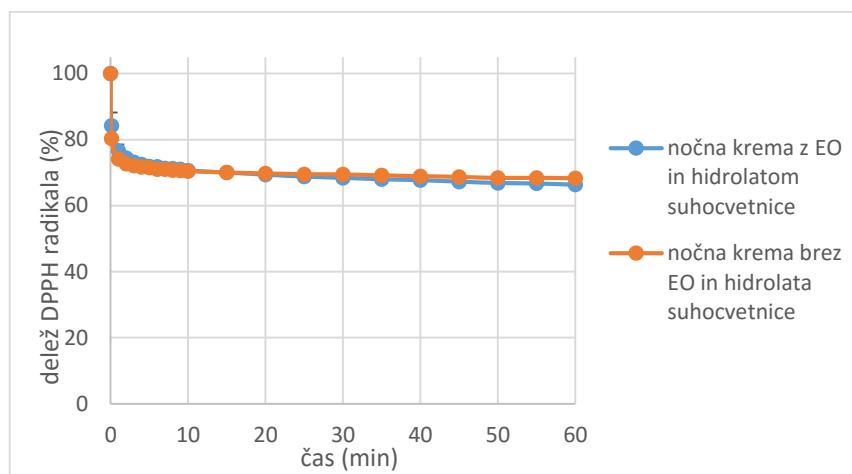


Slika 27: Časovni potek spremnjanja deleža DPPH radikala v prisotnosti različnih koncentracij hidrolata suhovetnice in primerjava s kontrolo. Rezultati so podani kot povprečje  $\pm SD$  ( $n=2$ )

#### 4.2.4 Določanje antioksidativne učinkovitosti kozmetičnega izdelka z eteričnim oljem in hidrolatom suhovetnice

Za določanje AOU nočne kreme z/brez EO in hidrolata suhovetnice smo izbrano količino kreme raztopili v metanolu in dodali v reakcijsko zmes, da smo dobili 0,012% (m/V) koncentracijo EO suhovetnice in 0,2% (m/V) koncentracijo hidrolata suhovetnice. Reakcijsko zmes smo pripravili tako, da smo k 1500  $\mu\text{l}$  metanolne raztopine DPPH dodali 1500  $\mu\text{l}$  metanolne raztopine nočne kreme in 1 uro ob določenih časovnih intervalih spremljali spremembo absorbance in posledično koncentracije DPPH radikala. Slika 28 prikazuje časovni potek spremnjanja deleža DPPH radikala v prisotnosti nočne kreme z/brez EO in hidrolata suhovetnice. Kot je iz slike 28 razvidno, obe nočni kremi izkazujeta AOU; delež preostalega DPPH radikala je bil pri nočni kremi z EO in hidrolatom suhovetnice ob času 60 min  $\sim 66\%$ , pri nočni kremi brez EO in hidrolata suhovetnice pa  $\sim 68\%$ , kar pomeni, da med njima ni razlik v AOU. Na osnovi določanja AOU nočne kreme brez EO in hidrolata suhovetnice lahko zaključimo, da njuna prisotnost v nočni kremi ne vplivata na AOU KI. Na osnovi predhodnih rezultatov smo to tudi pričakovali, saj je bila koncentracija EO in hidrolata suhovetnice v reakcijski zmesi prenizka, da bi lahko delovala antioksidativno. Na izmerjeno AOU nočne kreme po vsej verjetnosti vplivajo njene lipofilne sestavine, predvsem karitejevo maslo, ki vsebuje velike količine neumiljivih komponent, med katerimi je tudi vitamin E, ki se v karitejevem maslu nahaja v obliki  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - in  $\delta$ -tokoferola. *Allal in sodelavci* so s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) ugotovili, da karitejevo maslo vsebuje največ  $\alpha$ -tokoferola (112  $\mu\text{g/g}$  masla), v manjši količini sledi  $\gamma$ -tokoferol, najmanj pa je  $\beta$ - in  $\delta$ -tokoferola. (61) Zaradi vsebnosti vitamina E v karitejevem maslu, bi

lahko AOU nočne kreme pripisali ravno tej sestavini. Da bi slednje lahko potrdili, bi morali opraviti meritve z DPPH metodo za vsako posamezno sestavino, ki bi lahko vplivala na AOU nočne kreme.



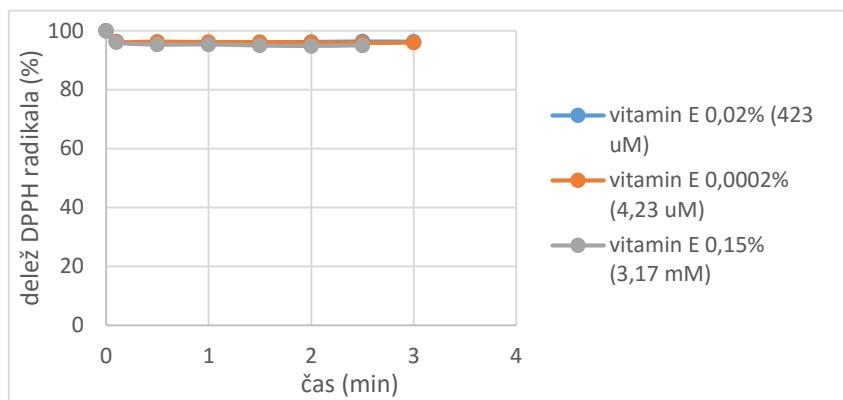
Slika 28: Časovni potek spreminjanja deleža DPPH radikala v prisotnosti nočne kreme z/brez EO in hidrolatom suhovcetnice. Rezultati so podani kot povprečje SD ( $n=2$ )

#### 4.2.5 Primerjava antioksidativne učinkovitosti eteričnega olja suhovcetnice z askorbil palmitatom in vitamin E acetatom

Ker smo z DPPH metodo dokazali AOU EO suhovcetnice, nas je zanimalo, kakšna je AOU v primerjavi z vitamin E acetatom in AP, ki se najpogosteje uporablja kot AO v KI. Pripravili smo metanolne raztopine različnih koncentracij vitamin E acetata, ki so ustrezale želenim koncentracijam vitamin E acetata v reakcijski zmesi (0,0002-0,15 % (m/V)) in metanolne raztopine različnih koncentracij AP, ki so ustrezale želenim koncentracijam AP v reakcijski zmesi (0,000375-0,15 % (m/V)).

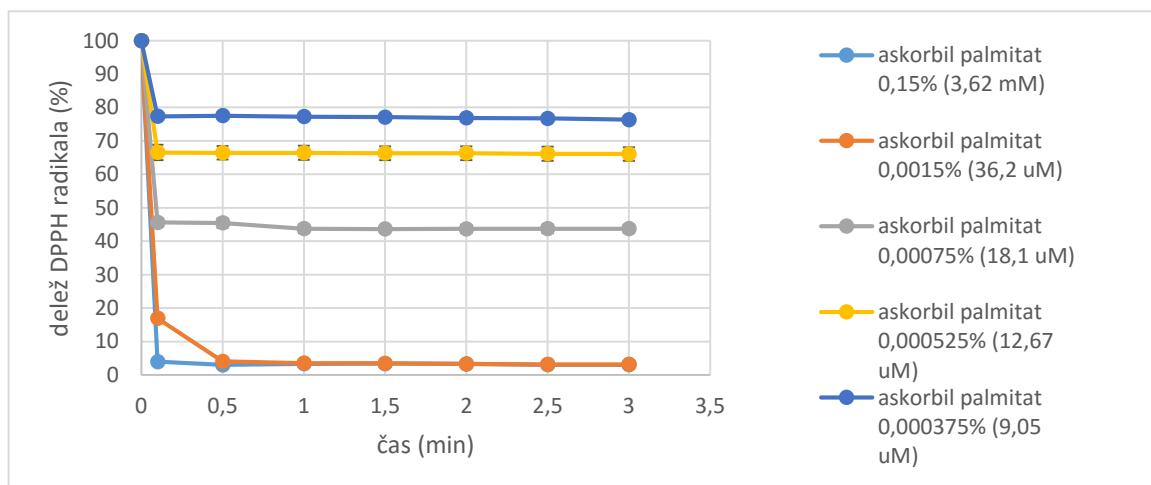
Iz slike 29, ki prikazuje časovni potek spreminjanja deleža DPPH radikala v prisotnosti vitamin E acetata, je razvidno, da vitamin E acetat ne deluje antioksidativno, saj se delež DPPH radikala ni zmanjšal. Delež DPPH radikala v prisotnosti vitamin E acetata se je znižal le za  $\sim 4\%$ , kar pripisujemo upadu koncentracije DPPH radikala zaradi razredčitve reakcijske zmesi ob dodatki 100  $\mu\text{l}$  metanolne raztopine AO. Isti vzorec vitamin E acetata smo uporabili pri FTC metodi, kjer prav tako ni izkazoval AOU. Z DPPH metodo smo potrdili, da uporabljen vitamin E acetat ne izkazuje antioksidativnega delovanja. Tudi *Mambro in sodelavci* so z DPPH metodo dobili podobne rezultate, kjer so ugotovili antioksidativno neučinkovitost vitamin E acetata. Neučinkovitost vitamin E acetatu pripisujejo acetilaciji hidroksilne skupine, ki je odgovorna za antioksidativno delovanje. Če želimo, da vitamin E

acetat deluje antioksidativno, se mora najprej pretvoriti v vitamin E s pomočjo esteraz, kar se pri DPPH in FTC metodi ni zgodilo.(62)



Slika 29: Časovni potek spremnjanja deleža DPPH radikala v prisotnosti vitamin E acetata v različnih koncentracijah. Rezultati so podani kot povprečje ± SD (n=2)

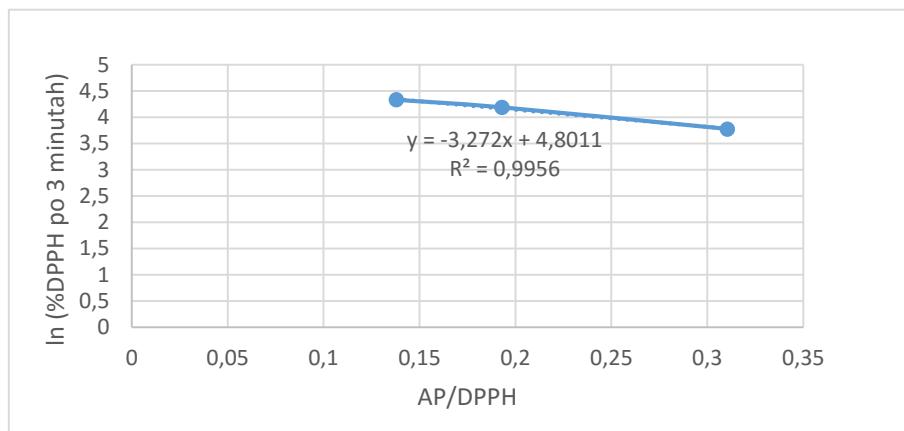
Slika 30 prikazuje časovni potek spremnjanja deleža DPPH radikala v prisotnosti AP. Razvidno je, da se ravnotežno stanje vzpostavi že ob samem dodatku AO k raztopini DPPH radikala.



Slika 30: Časovni potek spremnjanja deleža DPPH radikala v prisotnosti AP v različnih koncentracijah. Rezultati so podani kot povprečje ± SD (n=2)

Za določanje parametra EC<sub>50</sub> smo upoštevali rezultate meritev po 3 minutah inkubacije pri najnižjih koncentracijah AP (0,000375-0,00075% (m/V)). Parameter EC<sub>50</sub> smo izračunali iz enačbe premice (slika 31) po enakem postopku kot pri EO suhovetnice. EC<sub>50</sub> dosežemo pri masnem razmerju AP/DPPH ~ 0,272, kar ustreza 0,000648% (m/V) koncentraciji AP v reakcijski zmesi oziroma ~ 15,632 μM. Fujinami in sodelavci so AP z DPPH metodo določili vrednost parametra EC<sub>50</sub>, ki je znašal 29 μM pri začetni koncentraciji DPPH 100 μM v reakcijski zmesi. Absorbanco DPPH radikala so pomerili po 20 minutah pri valovni dolžini

516 nm.(63) Parameter EC<sub>50</sub> iz študije je v primerjavi z našim parametrom skoraj 2-krat višji. Te razlike so lahko posledica različne začetne koncentracije DPPH radikala v reakcijski zmesi, ki lahko vpliva na rezultate meritev.



Slika 31:Prikaz  $\ln (\% \text{ preostalega DPPH po 3 min})$  v odvisnosti od masnega razmerja AP/DPPH. Rezultati so podani kot povprečje  $\pm SD$  ( $n=2$ )

Parameter EC<sub>50</sub> je pri EO suhovetnice znašal 0,152% (m/V), kar je v primerjavi z EC<sub>50</sub> parametrom AP, ki je 0,000648% (m/V), za kar  $\sim 235$ -krat višji. Iz rezultatov lahko zaključimo, da EO suhovetnice deluje antioksidativno, vendar pa ga v primerjavi z najpogosteje uporabljenimi AO v KI, uvrščamo med šibke AO.

## 5 SKLEP

V okviru diplomskega dela smo določili AOU EO in hidrolata suhocvetnice z dvema *in vitro* metodama, in sicer FTC in DPPH metodo. Ovrednotili smo tudi AOU kreme, ki je v oljni fazi vsebovala EO, v vodni pa hidrolat suhocvetnice. Dobljene rezultate smo primerjali z AOU vitamin E acetata in AP, ki sta najpogosteje uporabljena AO v KI.

S FTC metodo smo potrdili, da že 1% vsebnost EO suhocvetnice v emulziji z linolno kislino vpliva na inhibicijo LP in z višanjem koncentracije EO suhocvetnice v emulziji narašča tudi AOU EO suhocvetnice. Pri hidrolatu suhocvetnice AOU s FTC metodo nismo dokazali, kar je v skladu s pričakovanji, saj je hidrolat suhocvetnice hidrofilen, LOOH, ki nastajajo pri LP, pa so lipofilni. Kremi z EO in hidrolatom suhocvetnice smo določili minimalno AOU; izdelek je sicer nekoliko inhibiral LP v primerjavi s KI brez EO in hidrolata suhocvetnice, a celokupno gledano je bil učinek minimalen. Nadalje smo potrdili, da uporabljen emulgator Tween® 80 v emulziji z linolno kislino ne vpliva na dodaten nastanek LOOH in je torej primerna izbira za izvedbo FTC metode.

Zaradi neenakomernega obsevanja UV svetilke je v vzorcih LP potekala z različno hitrostjo, kar je vplivalo na rezultate meritev. Za bolj ponovljive rezultate bi morali eksperiment ponoviti z uporabo druge UV svetilke, ki bi vzorce obsevala enakomerno ali pa uporabiti drug pristop za pospešitev LP.

Z DPPH metodo smo prav tako dokazali AOU EO suhocvetnice, ki smo mu določili vrednost parametra EC<sub>50</sub> ~ 0,152% (m/V) v reakcijski zmesi pri 63 µM začetni koncentraciji DPPH radikala. Tudi hidrolat suhocvetnice je izkazoval AOU pri 33% (m/V) koncentraciji v reakcijski zmesi. Pri določanju AOU kreme z EO in hidrolatom suhocvetnice, smo ugotovili, da izdelek deluje antioksidativno. Ker so rezultati AOU kreme z EO in hidrolatom suhocvetnice primerljivi placebo kremi (brez aktivnih sestavin), predvidevamo, da so za antioksidativno delovanje obeh krem odgovorne druge sestavine, npr. karitejevo maslo.

Na osnovi rezultatov DPPH metode lahko zaključimo, da je EO suhocvetnice v primerjavi z AP z upoštevanjem parametra EC<sub>50</sub> ~ 235-krat manj antioksidativno učinkovito, na osnovi rezultatov FTC metode pa je EO suhocvetnice v primerjavi z AP pri 3% koncentraciji AO 2,5-krat oziroma 4-krat manj učinkovito.

Z obema metodama smo vrednotili tudi AOU vitamin E acetatu. Vitamin E acetat v izvedenih poskusih ni izkazoval AOU zaradi acetilacije hidroksilne skupine, ki je odgovorna za antioksidativno delovanje. Za dosego AOU je potrebna pretvorba vitamin E acetata v vitamin E s pomočjo esteraz, ki pa se pri DPPH in FTC metodi ni zgodila.

V diplomskem delu smo ugotovili, da EO suhocvetnice izkazuje AOU, vendar je v primerjavi z AP ta veliko nižja. EO suhocvetnice tako ni smiselno vgraditi v KI, z namenom antioksidativne zaščite kože ali KI, saj je njegova učinkovitost prenizka. EO in hidrolat suhocvetnice sta sicer pomembni KAU izdelkov, ki so namenjeni negi zrele kože ali negi kože po sončenju. V tovrstnih izdelkih izkoriščamo ostale ugodne lastnosti EO, poleg tega pa k boljšemu stanju kože pripomoreta tudi z antioksidativnim delovanjem.

AOU smo testirali z *in vitro* metodama, zato je za bolj točne rezultate oziroma večjo moč interpretacije vpliva EO in hidrolata suhocvetnice na kožo, smiselno izvesti še testiranje AOU z *in vivo* metodami.

## 6 LITERATURA

1. Halliwell B, Gutteridge J. M. C: Free Radical in Biology and Medicine: 4 izdaja, Oxford University Press Inc., New York, 2007, 81, 236-249
2. Mravljak J: Radikali in oksidativni stres: Farmacevtski vestnik, 66, 2015, 127-132
3. Manček B, Pečar S: Radikali in zaščita pred poškodbami z radikali v bioloških sistemih, Farmacevtski vestnik, 52, 2001, 133-144
4. Pečar S, Mravljak J: Šumi življenja ali Radikali in druge reaktivne snovi v telesu, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2015, 77-96 in 171-178
5. <https://www.boundless.com/biology/textbooks/boundless-biology-textbook/biological-macromolecules-3/lipids-55/phospholipids-300-11433/> (dostop 5.7.2015)
6. Pappas A: Epidermal surface lipids: Dermato-Endocrinology, 1, 2009, 72-76
7. Jungersted J. M, Hellgren L. I, Jemec G. B. E, Agner T: Lipids and skin barrier function – a clinical perspective, Contact Dermatitis, 58, 2008, 255-262
8. [http://www.nature.com/jid/journal/v121/n2/fig\\_tab/5601872f2.html](http://www.nature.com/jid/journal/v121/n2/fig_tab/5601872f2.html) (dostop 5.7.2015)
9. Mitsui T: New Cosmetic Science: Elsevier Science B. V., Amsterdam, 1997, 142
10. Lupo M. P: Antioxidants and vitamin in cosmetics: Clinics in Dermatology, 19, 2001, 467-473
11. Juliano C, Cossu M, Alamanni M. C, Piu L: Antioxidant activity of gamma-oryzanol: Mechanism of action and its effect on oxidative stability of pharmaceutical oils: International journal of pharmaceutics, 299, 2005, 146-154
12. Trojak A, Kristl J: Antioksidanti: aktivne sestavine kozmetičnih izdelkov: Farmacevtski vestnik, 50, 1999, 443-453
13. Barel A. O, Paye M, Maibach H. I: Handbook of Cosmetic Science and Technology, 3 izdaja, Informa Healthcare USA Inc., New York, 2009, 301-303, 334
14. <http://lipidlibrary.acs.org/topics/tocopherols/index.htm> (dostop 5.7.2015)
15. <http://pharmacopedia.wikidot.com/ascorbic-acid> (dostop 5.7.2015)
16. <http://feleciaroselabs.com/is-my-expensive-vitamin-c-serum-killing-my-skin/> (dostop 5.7.2015)
17. <http://theida.com/essential-oils/helichrysum-helichrysum-italicum> (dostop 18.6.2015)
18. Perrini R, Morone-Fortunato I, Lorusso E, Avato P: Glands, essential oils and in vitro establishment of Helichrysum italicum (Roth) G. Don ssp. microphyllum (Willd.) Nyman: Industrial Crops and Products, 29, 2009, 395-403

19. Viegas A. D, Palmeira-de-Oliveira A, Salgueiro L, Martinez-de-Oliveira J, Palmeira-de-Oliveira R: *Helichrysum italicum*: From traditional use to scientific data: *Journal of Ethnopharmacology*, 151, 2014, 54-65
20. Rigano D, Formisano C, Senatore F, Piacente S, Pagano E, Capasso R, Borrelli F, Izzo A.A: Intestinal antispasmodic effects of *Helichrysum italicum* (Roth) Don ssp. italicum and chemical identification of the active ingredients: *Journal of Ethnopharmacology*, 150, 2013, 901-906
21. Bianchini A, Tomi P, Costa J, Bernardini A. F: Composition of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don fil. subsp. italicum essential oils from Corsica (France): Flavour and fragrance journal, 16, 2001, 30-34
22. <https://organicrituals.files.wordpress.com/2011/10/helichrysum-flowers.jpg> (dostop 24.6.2015)
23. Morone-Fortunato I, Montemurro C, Ruta C, Perrini R, Sabetta W, Blanco A, Lorusso E, Avato P: Essential oils, genetic relationships and in vitro establishment of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. italicum from wild Mediterranean germplasm: *Industrial Crops and Products*, 32, 2010, 639-649
24. <http://www.herbana.si/hidrolati-rozne-vode/264-smilj-suhocvetcna-hidrolat-helichrysum-italicum.html> (dostop, 18.6.2015)
25. <http://www.naravni-koticek.si/smilj-za-nego-koze/> (dostop 18.6.2015)
26. Hüsnü Can Baser K, Buchbauer G: Hanbook of essential oils: Science, Technology and Applications, Taylor and Francis Group, Boca Raton, 2010; 85, 99
27. Surburg H, Panten J: Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses: 5 izdaja, Wiley-VCH, Weinheim, 2006, 179
28. <http://www.favn.si/naravna-etericna-olja/immortelle-bio-korzika> (dostop 18.6.2015)
29. Harborne J. B, Baxter H: Chemical dictionary of economic plants: J. Wiley & Sons Ltd., Chichester, 2001, 79
30. Leung A. Y, Foster S: Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs and cosmetics:, second edition, J. Wiley & Sons Inc., Toronto, 1996, 315-316
31. Niki E: Assessment of Antioxidant Capacity *in vitro* and *in vivo*: *Free Radical Biology & Medicine*, 49, 2010, 503-515
32. Somogyi A, Rosta K, Pusztai P, Tulassay Z, Nagy G: Antioxidant measurments: *Physiological Measurement*, 28, 41-55

33. Prior R. L, Wu X, Schaich K: Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 2005, 4290-4302
34. Alam N, Bristi N. J, Rafiquzzaman: Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity: Saudi Pharmaceutical Journal, 21, 143-152
35. Nile S. H, Khobragade C. N, Park S. W: Optimized and Comparative Antioxidant Assays and Its Applications in Herbal and Synthetic Drug Analysis as an Antioxidants: Medicinal Chemistry, 12, 2012, 1007-1014
36. Carmona-Jiménez Y, García-Moreno M. V, Igartuburu J. M, Garcia Barroso C: Simplification of the DPPH assay for estimating the antioxidant activity of wine and wine by-products: Food Chemistry, 165, 2014, 198-204
37. Molyneux P: The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity: Journal of Science Technology, 26, 2004, 211-219
38. Gülcin I: Antioxidant activity of food constituents: an overview: Archives of Toxicology, 86, 2012, 345-391
39. Zahin M, Aqil F, Ahmad I: The in vitro antioxidant activity and total phenolic content of four indian medicinal plants: International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 1, 2009, 88-95
40. <http://bioeterica.hr/#helichrysum> (dostop 14.7.2015)
41. Lawless J: The illustrated encyclopedia of essential oils: The Complete Guide to the Use of Oils in Aromatherapy and Herbalism: Element Books Inc., Dorset, 1998, 148
42. <http://www.herbana.si/hidrolati-rozne-vode/264-smilj-suhocvetcnica-hidrolat-helichrysum-italicum.html> (dostop 14.7.2015)
43. European Pharmacopoeia 5th Edition, EDQM, Strasbourg, 2005; 1447, 1671, 2135-2136, 2441, 2715
44. Freitas F, Alves V. D, Reis M. A. M: Bacterial Polysaccharides: Production and Applications in Cosmetic Industry: Polysaccharides, 2014, 1-24
45. [http://www.makingcosmetics.com/Glycerin\\_p\\_160.html](http://www.makingcosmetics.com/Glycerin_p_160.html) (dostop 14.7.2015)
46. [http://www.makingcosmetics.com/CreamMaker-BLEND\\_p\\_116.html](http://www.makingcosmetics.com/CreamMaker-BLEND_p_116.html) (dostop 15.7.2015)
47. Rowe C R, Sheskey J P, Quinn M: Handbook of Pharmaceutical Excipients, 6th Edition, Pharmaceutical Press, London, 2009; 32, 46-47, 233, 389, 441-442, 470, 549-551, 697
48. [http://www.makingcosmetics.com/Stearic-Acid\\_p\\_315.html](http://www.makingcosmetics.com/Stearic-Acid_p_315.html) (dostop 16.7.2015)

49. [http://www.makingcosmetics.com/Jojoba-Oil-Organic\\_p\\_187.html](http://www.makingcosmetics.com/Jojoba-Oil-Organic_p_187.html) (dostop 16.7.2015)
50. [http://www.makingcosmetics.com/Olive-Oil\\_p\\_632.html](http://www.makingcosmetics.com/Olive-Oil_p_632.html) (dostop 16.7.2015)
51. [http://www.makingcosmetics.com/Shea-Butter-Organic\\_p\\_80.html](http://www.makingcosmetics.com/Shea-Butter-Organic_p_80.html) (dostop 16.7.2015)
52. [http://www.makingcosmetics.com/Dimethicone-500\\_p\\_94.html](http://www.makingcosmetics.com/Dimethicone-500_p_94.html) (dostop 16.7.2015)
53. Opinion on Parabens  
[http://ec.europa.eu/health/scientific\\_committees/consumer\\_safety/docs/sccs\\_o\\_041.pdf](http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_041.pdf)  
(dostop, 16.7.2015)
54. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/62240?lang=en&region=SI>  
(dostop 16.7.2015)
55. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p4780?lang=en&region=SI>  
(dostop 16.7.2015)
56. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/d9132?lang=en&region=SI#>  
(dostop 17.7.2015)
57. <http://www.scbt.com/datasheet-202591-dpph-free-radical.html>
58. [http://www.caelo.de/getfile.html?type=sdb\\_en&cntry=en&num=7698](http://www.caelo.de/getfile.html?type=sdb_en&cntry=en&num=7698) (dostop 17.7.2015)
59. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/76183?lang=en&region=SI>  
(dostop 17.7.2015)
60. Baschong W, Artmann C, Hueglin D, Roeding J: Direct evidence for bioconversion of vitamin E acetate into vitamin E: An *ex vivo* study in viable human skin: Journal of Cosmetic Science, 52, 2001, 155-161
61. Allal F, Piombo G, Kelly B. A, Okullo J. B. L, Thiam M, Diallo O. B, Nyarko G, Davrieux F, Lovett P. N, Bouvet J: Fatty acid and tocopherol patterns of variation within the natural range of the shea tree (*Vitellaria paradoxa*): Agroforestry Systems, 87, 2013, 1065-1082
62. Mambro V. M, Azzolini E. C. S. A, Valim M. L. Y, Fonseca J. V. M: Comparison of antioxidant activities of tocopherols alone and in pharmaceutical formulations: International Journal of Pharmaceutics, 262, 2003, 93-99
63. Fujinami Y, Tai A, Yamamoto I: Radical Scavenging Activity against 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl of Ascorbic Acid 2-Glucoside (AA-2G) and 6-Acyl-AA-2G: Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 49, 2001, 642-644