

---

# PROUČEVANJE ANTIOKSIDATIVNIH IN PROTIMIKROBNIH UČINKOV NEKATERIH RASTLINSKIH EKSTRAKTOV IN VITAMINA C V KOZMETIČNIH IZDELKIH

---

## RAZISKOVALNA NALOGA



Avtorici:

Zala Božanić, 2. a

Jana Ušen, 2. a

Mentorici:

prof. dr. Polona Jamnik  
Biotehniška fakulteta Univerze v  
Ljubljani

mag. Mojca Alif  
I. gimnazija v Celju

Področje: kemija

Mestna občina Celje, Mladi za Celje

Celje, 2018

Zahvala .....	3
Povzetek .....	4
Abstract .....	5
1. UVOD .....	6
Namen dela, cilji .....	6
Hipoteze.....	6
2. TEORETIČNI DEL.....	7
2.1 KOZMETIČNI IZDELKI.....	7
2.2 KONZERVANSI .....	8
2.3 ANTIOKSIDANTI.....	9
2.4 NARAVNA KOZMETIKA .....	11
2.5 IZBRANI KONZERVANSI .....	12
Vitamin C.....	12
Sok granatnega jabolka .....	13
Ekstrakt hmelja .....	14
2.6 DELOVANJE RANCIMATA .....	15
2.7 PROTIMIKROBNO DELOVANJE PROUČEVANIH SNOVI .....	16
3. EKSPERIMENTALNI DEL .....	17
3.1 PRIPRAVA KREM .....	17
Uporabljene kemikalije .....	17
Pripomočki .....	17
Postopek .....	17
3.2 PREVERJANJE ANTIOKSIDATIVNIH LASTNOSTI VZORCEV KREM NA NAPRAVI RANCIMAT .....	22
3.3 PREVERJANJE PROTIMIKROBNIH LASTNOSTI PROUČEVANIH SNOVI.....	23
Priprava inokuluma bakterije <i>E. coli</i> .....	23
Inokulacija vzorcev krem z bakterijo <i>E. coli</i> .....	27
Redčenje po Kochu.....	28
4. REZULTATI.....	30
4.1 Rezultati rancimata.....	30
4.2 Rezultati mikrobioloških testiranj.....	33
5. DISKUSIJA.....	34
6. PRILOGI – Rezultati meritev na napravi Rancimat .....	37
7. VIRI IN LITERATURA.....	39

## ***Kazalo tabel***

Tabela 1: Sestava posameznega vzorca kreme .....	18
Tabela 2: Masa krem, ki smo jim nato dodali 9 mL fiziološke raztopine .....	27
Tabela 3: Število kolonijskih enot bakterij <i>E. coli</i> na gram določene kreme.....	33

## ***Kazalo slik***

Slika 1: Struktura benzil alkohola .....	8
Slika 2: Struktura dehidroocetne kisline .....	8
Slika 3: Delovanje antioksidanta .....	9
Slika 4: Strukturna formula vitamina C .....	12
Slika 5: struktura punicalagina .....	13
Slika 6: struktura ksantohumola .....	14
Slika 7: Sestavni deli rancimata .....	16
Slika 8: Segrevanje vodne in oljne faze .....	18
Slika 9: Ekstrakt hmelja .....	19
Slika 10: Rotavapor.....	20
Slika 11: Falkonka s sokom granatnega jabolka .....	21
Slika 12: Delovanje naprave Rancimat .....	22
Slika 13: Laminarij.....	23
Slika 14: Pipeta in erlenmajerica z brozgo <i>E. coli</i> .....	24
Slika 15: Stresalnik.....	24
Slika 16: Centrifuga z dvema centrifugirkama .....	25
Slika 17: Mini centrifugirka, opazna je meja med sedimentom in supernatantom.....	25
Slika 18: Petrijevke z vzorci inokuliranih krem .....	28
Slika 19: Plošča s kolonijami <i>E. coli</i> – vzorec 8 .....	29

## ***Kazalo grafov***

Graf 1: Spreminjanje električne prevodnosti pri vseh kremah (prva meritev) .....	30
Graf 2: Spreminjanje električne prevodnosti pri vseh kremah (druga meritev).....	31

## Zahvala

Zahvalili bi se radi prof. dr. Poloni Jamnik in doc. dr. Iztoku Prislanu, ker sta nama omogočila eksperimentalno delo v mikrobioloških in kemijskih laboratorijih Biotehniške fakultete in sta nama bila v veliko pomoč s svojo prilagodljivostjo in podporo.

Zahvaljujema se najini mentorici mag. Mojci Alif za pomoč pri izdelavi naloge.

Zahvaljujema se dr. Rebeki Prislani (Alefi pametna kozmetika) za pomoč pri izdelavi krem.

Zahvala gre profesorici Juani Robida za lektoriranje naloge.

Seveda pa se zahvaljujema tudi vsem družinskim članom in prijateljem, da so nama med izdelavo naloge stali ob strani.

## Povzetek

Naravna kozmetika postaja na tržiščih izdelkov za nego kože vse bolj iskana. Želje potrošnikov po naravnih izdelkih spodbujajo raziskave rastlinskih učinkovin, ki bi nadomestile sintetične spojine v kozmetičnih izdelkih. Področje naravne kozmetike je trenutno precej neraziskano in neurejeno, v pravilnikih pa še ni specifično določeno, kaj naj bi naravna kozmetika sploh vsebovala. Zato smo se v nalogi odločili raziskati nekaj naravnih alternativ sintetičnim konzervansom.

Pomembna sestavina vsakega kozmetičnega izdelka je konzervans, ki zagotavlja stabilnost izdelka. Ker naj bi bili v naravni kozmetiki konzervansi naravnega izvora, smo v raziskovalni nalogi raziskali tri snovi, ki bi lahko delovale kot konzervansi – vitamin C in ekstrakta hmelja ter granatnega jabolka.

Izdelali smo 11 različnih krem in jim dodali te potencialne konzervanse. Z eksperimentalnim delom smo želeli preizkusiti, ali imajo vitamin C in ekstrakta hmelja ter granatnega jabolka antioksidativne in/ali protimikrobne lastnosti ter ali bi lahko tako v kozmetičnih izdelkih nadomestili sintetične konzervanse. V ta namen smo preverili antioksidativne lastnosti teh dodatkov na napravi Rancimat. Z inokulacijo krem z bakterijami vrste *Escherichia coli* pa smo ugotavljali, ali imajo ti dodatki protimikrobne lastnosti.

Rezultati so pokazali, da sta ekstrakta hmelja in granatnega jabolka v kremah zelo dobro zavirala oksidacijo maščob. Po antioksidativnih lastnostih sta bila celo učinkovitejša od sintetičnega konzervansa. Protimikrobno pa je od izbranih snovi najbolje deloval vitamin C.

## Abstract

Nowadays, natural cosmetics is getting increasingly popular on the market of skin-care products. The wishes of consumers for natural and safe products are condoning research of plant-based substances, that would be able to substitute synthetic compounds in cosmetics. The field of natural cosmetics hasn't been thoroughly researched yet, and the official standards and regulations don't specify exactly what natural cosmetics should contain. That is why we decided to research some of the natural alternatives.

A vital ingredient of every cosmetical product is a preservative, which maintains the product stable and safe. Because natural cosmetics should have natural preservatives, we chose to analyse three different substances, that could work as preservatives – vitamin C, hops extract and pommegranate extract.

We made 10 different creams, and added these potential preservatives in some of them. With experimental work, we wanted to test, whether these substances possess antioxidative or antimicrobial abilities, and if they could potentially substitute the synthetic preservatives. For this purpose, we have tested the antioxidative properties of these creams on The 892 Professional Rancimat. For the microbiological part of research, we inoculated the creams with *E. coli*, to find out if these substances possess antimicrobial ability

The results showed, that hops and pommegranate extracts have excellent antioxidative properties, surpassing even the synthetic preservative. The best antimicrobial agent proved to be vitamin C.

# 1. UVOD

## *Namen dela, cilji*

Sintetični konzervansi postajajo v kozmetičnih izdelkih vse manj zaželeni, pojavljajo se nove, naravne alternative. Z nalogo smo želeli preizkusiti delovanje treh snovi, ki bi v kremi lahko delovale kot naravni konzervansi. To so vitamin C in ekstrakta hmelja ter granatnega jabolka.

Zanimalo nas je, ali imata ta dva ekstrakta in vitamin C zmožnost upočasniti proces oksidacije in tako preprečiti oksidativni kvar kreme. Želeli smo tudi ugotoviti, ali imata ekstrakta protimikrobne lastnosti – preprečevanje rasti mikroorganizmov v kremi. Če bi se z eksperimentalnim delom potrdile antioksidativne in protimikrobne lastnosti vitamina C ter dveh ekstraktov, bi te snovi lahko postale potencialna sestavina izdelkov za nego kože.

## *Hipoteze*

Hipoteza številka 1: Vitamin C ima protimikrobne in antioksidativne lastnosti.

Hipoteza številka 2: Ekstrakt hmelja ima protimikrobne in antioksidativne lastnosti.

Hipoteza številka 3: Ekstrakt granatnega jabolka ima protimikrobne in antioksidativne lastnosti.

Hipoteza številka 4: Vitamin C in oba ekstrakta tvorijo z drugimi sestavinami kreme homogene zmesi.

## 2. TEORETIČNI DEL

Koža je človekov največji organ, njena primarna funkcija je zaščita telesa pred zunanjimi vplivi in vdorom škodljivih snovi. Kot okolici najbolj izpostavljen organ jo je treba zaščititi in negovati. V ta namen uporabljamo kozmetične izdelke.

### 2.1 KOZMETIČNI IZDELKI

Primarna naloga kozmetičnih izdelkov je ohranjanje in izboljševanje stanja naše kože. Sestava kozmetičnih izdelkov je odvisna od namena, za katerega so bili izdelani (izdelki za vzdrževanje higiene, varovalni izdelki, dekorativni izdelki in izdelki za nego), in od dela telesa, ki mu je izdelek namenjen (nega las, rok, obraza, telesa, stopal in ustne votline). (1)

V raziskovalni nalogi smo proučevali učinkovanje naravnih konzervansov v kremi, namenjeni negi kože.

Kreme so večfazne kozmetične oblike, ki so sestavljene iz lipofilne ali oljne in vodne faze, ki ju povezuje emulgator. Lipofilno fazo lahko predstavljajo različni ogljikovodiki ali naravni trigliceridi. V naši raziskovalni nalogi sta bila to oljčno olje in kakavovo maslo. Vodna faza je destilirana voda. Kremam se glede na potrebe dodajajo še kozmetično učinkovite spojine, kot so izdelki za nego in zaščito kože, vlažilci, dišave, barvila, belila. (1)

Ker kremo sestavlja sorazmerno velika količina vode in maščob, je tak izdelek zelo hitro pokvarljiv. Sestavine krem so že same po sebi gojišča mikroorganizmov, maščobe pa sploh ob izpostavljenosti vlagi, zraku, svetlobi postanejo žarke – oksidirajo.

Razrast patogenih mikroorganizmov in oksidacija maščob v kremi škodujeta tako varnosti kot kakovosti kreme in s tem uporabniku.

Za varnost uporabnika je ključna mikrobiološka stabilnost kreme. 7. člen *Uredbe o kozmetičnih izdelkih* (2) razdeli kozmetične izdelke v dve kategoriji:

1. običajni kozmetični izdelki,
2. izdelki, ki so namenjeni otrokom, mlajšim od treh let, ali uporabi na koži okoli oči in na sluznicah.

Omejeno je tudi število vseh aerobnih mezofilnih mikroorganizmov (bakterij, kvasovk, plesni), ki jih lahko vsebuje 1 g kozmetičnega izdelka. V 1 g izdelka 1. kategorije je lahko največ 1000 takih mikroorganizmov, 1 g izdelka 2. kategorije pa ne sme vsebovati več kot 100 mezofilnih aerobnih mikroorganizmov. (2)

Mikroorganizmi, ki pridejo s kozmetičnim izdelkom v stik med izdelovanjem, pakiranjem in predvsem samo uporabo, bi se lahko v kozmetičnih izdelkih tako nemoteno razmnoževali. Da bi proizvajalci preprečili ogrožitev kakovosti izdelkov in varnosti uporabnikov, v kozmetične izdelke dodajajo konzervanse.



## 2.2 KONZERVANSI

Konzervansi so snovi, ki jih dodajajo različnim izdelkom, da bi preprečili razvoj mikroorganizmov. Lahko delujejo na dva načina:

- mikrobicidno: povzročijo lizo celic mikroorganizmov; jih uničijo;
- mikrobistatično: inhibirajo rast in razmnoževanje mikroorganizmov.

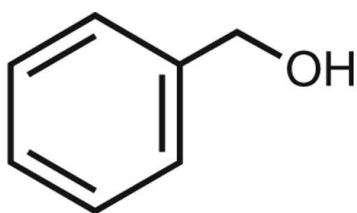
Dober konzervans mora imeti naslednje lastnosti:

- širok spekter delovanja;
- učinkovitost v nizkih koncentracijah;
- ni toksičen za človeka;
- ne reagira z drugimi sestavinami kozmetičnega izdelka ali z njegovo embalažo;
- je brez vonja, barve, okusa;
- je poceni;
- je v tekoči obliki, topen v vodi in tako enostaven za vgrajevanje. (1)

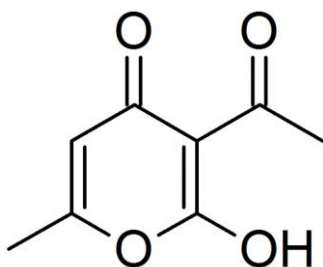
Konzervanse lahko delimo po izvoru na sintetične in naravne.

Dandanes v kozmetičnih izdelkih večinoma najdemo sintetične konzervanse, običajno parabene. To so estri in soli 4-hidroksibenzojske kisline. Delujejo na vse skupine patogenih organizmov, so kemijsko stabilni in delujejo v širokem območju pH. Kljub temu smo zadnje čase vedno bolj priča razpravam o njihovi alergenosti. Mnoge raziskave so namreč dokazale, da so parabeni alergeni in lahko v nekaterih primerih povzročijo celo alergijski dermatitis (3).

V raziskovalni nalogi smo kot sintetični konzervans uporabili konzervans Geogard 221, ki je sestavljen iz približno 10 % dehidroocetne kisline in 90 % benzil alkohola. (4)



Slika 1: Struktura benzil alkohola (5)



Slika 2: Struktura dehidroocetne kisline (6)

## 2.3 ANTIOKSIDANTI

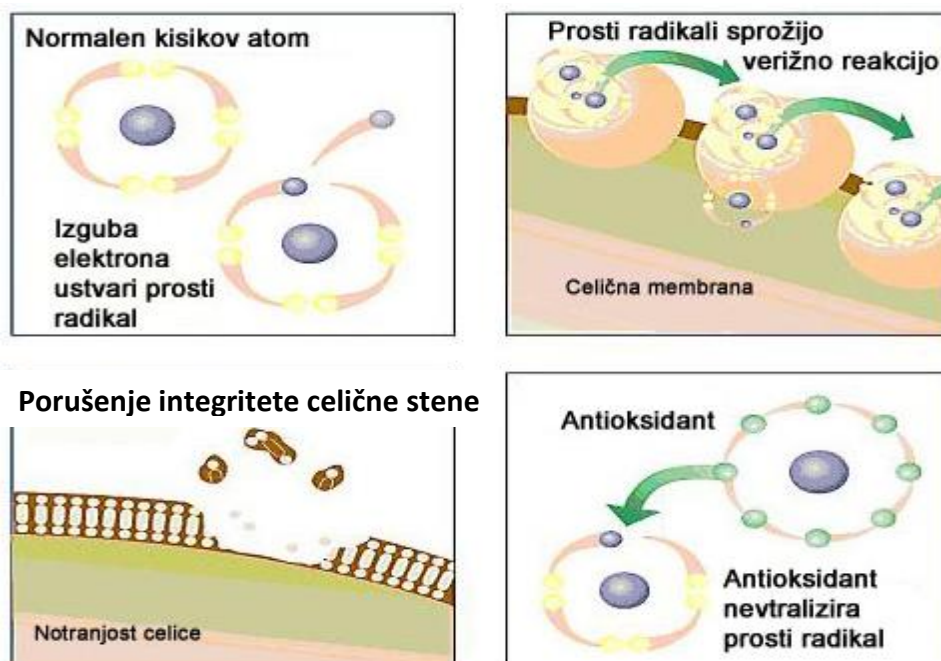
Oksidacijo lahko definiramo kot reakcijo spajanja s kisikom ali reakcijo oddajanja elektronov. V kozmetičnih izdelkih so reakcije oksidacije nezaželene, saj jim spremenijo vonj, okus in učinkovitost. Oksidirajo predvsem lipofilne sestavine, to so trigliceridi, eterična olja, vitamini. Produkti njihove oksidacije so aldehidi, ketoni, peroksidi, ki izdelku zmanjšajo kakovost. Če izdelke in njihove surovine pravilno shranjujemo (hladni, temni, suhi prostori), oksidacijo do neke mere zmanjšamo. Najboljši ukrep pa je dodajanje antioksidantov – snovi, ki jih dodajamo izdelkom, da preprečimo oksidacijo. (1)

Antioksidanti s preprečevanjem oksidacije maščob ohranjajo kakovost izdelkov. Ker se ob delovanju »izrabijo« in s tem izgubijo svojo učinkovitost, lahko žarkost maščob preprečujejo le določen čas. V proizvodnji jih pogosto uporabljajo več hkrati. Tako lahko delujejo v majhnih koncentracijah in so manj toksični.

Poznamo naravne in sintetične antioksidante. Najboljša primera naravnih antioksidantov sta vitamina C in E. Njun nastanek je povezan z evolucijsko potrebo po obrambi pred reaktivnimi oblikami kisika. Ker so rastline evolucijsko starejše, so razvile sintezno pot vitamina C in E. Teh živali zaradi relativne evolucijske mladosti in povezanosti (preko hrane) z rastlinami nimajo.

Obstajajo tudi sintetične oblike antioksidantov, ki lahko zaradi tujosti telesu povzročijo alergijske reakcije. Delujejo na več načinov:

- Zavrejo lahko sam proces oksidacije, torej verižne reakcije z radikali. Takšni antioksidanti delujejo kot lovci radikalov, kar pomeni, da se ob reakciji z nestabilnim radikalom pretvorijo v stabilnejše, manj škodljive radikale.



Slika 3: Delovanje antioksidanta (7)

- Lahko se vedejo kot boljši reducenti od učinkovin v kozmetičnih izdelkih in se tako oksidirajo sami namesto učinkovin.
- Delujejo lahko tudi v kombinaciji z antioksidanti iz prvih dveh skupin tako, da izboljšajo njihovo delovanje, saj nase vežejo prehodne kovine, ki sicer delujejo kot katalizatorji v procesu oksidacije.

Dober antioksidant naj bi imel takšne lastnosti kot dober konzervans.

## 2.4 NARAVNA KOZMETIKA

Zaradi negativnih posledic uporabe sintetične kozmetike, vse večje ekološke ozaveščenosti in želje po preprečitvi bakterijske rezistence se v kozmetiki pojavlja vse večja potreba po izdelkih naravnega izvora. Ti imajo namreč za razliko od sintetičnih različic večje koncentracije učinkovin in s tem vidnejše in bolj vsestranske učinke. Vsebujejo tudi več vitaminov, antioksidantov in drugih snovi, ki preprečujejo staranje kože. Poleg tega ne vsebujejo škodljivih snovi za zdravje uporabnika.

Seveda naravna kozmetika ni nujno boljša od sintetične različice. Največje probleme predstavljajo:

- pomanjkljiva zakonodaja Evropske unije, ki ne določa enotne opredelitve naravnih izdelkov in zato ti niso opredeljeni s tako strogimi predpisi;
- manjša stabilnost zaradi prisotnosti nekaterih mikroorganizmov že v surovinah in posledično večja dovzetnost za kvarjenje izdelka;
- večji stroški izdelave, predvsem izolacije učinkovin.

Trenutno lahko v izdelkih naravne kozmetike proizvajalci uporabljajo naslednje konzervanse: soli in estre benzojske, mravljinčne, propanojske, salicilne in sorbinske kisline. Očitno je, da vsi izmed naštetih konzervansov niso naravni. Za takšne namreč štejemo le snovi naravnega, najbolje rastlinskega izvora. Protimikrobno in antioksidativno zaščito nam ti rastlinski izvlečki nudijo na enak način, kot bi primarno ščitili rastline. Naravne konzervanse delimo na:

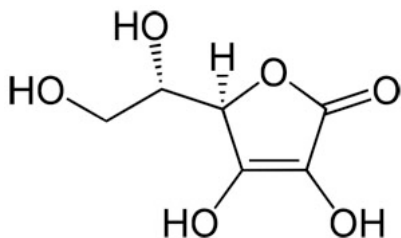
- ekstrakte (ekstrakt semen grenivke, ekstrakt hmelja ...),
- eterična olja (eterično olje čajevca, timijana ...),
- vitamine (vitamin C ...).

Naravni konzervansi so trenutno še dokaj neraziskani. Pozitivne lastnosti, ki jih delajo obetavne, so predvsem ugodne dišavne in negovalne lastnosti, širok nabor učinkovin in odsotnost strupenih sintetičnih spojin. Problemi, s katerimi se raziskovalci srečujejo pri odkrivanju načinov uporabe naravnih snovi kot konzervansov, so:

- majhna koncentracija snovi le redko deluje, prevelika pa lahko povzroča alergične reakcije;
- pogosto vsebujejo nenasičene snovi, ki se zlahka oksidirajo;
- niso brez barve in okusa, kar lahko pri potrebnih koncentracijah uporabnika moti.

## 2.5 IZBRANI KONZERVANSI

### Vitamin C



Slika 4: Strukturna formula vitamina C (9)

Askorbinska kislina ali vitamin C je antioksidant, ki ga najdemo tako pri živalih kot tudi pri rastlinah. Je najpomembnejši antioksidant v ekstracelularni tekočini in uporaben tudi kot antioksidant v kozmetičnih izdelkih. Z reduciranjem škodljivih prostih radikalov preprečuje oziroma zavira oksidacijo maščob (preprečuje oksidacijo lipoproteinov majhne gostote /LDL/, zmanjša oksidativno okvaro DNA in beljakovin ter zavira peroksidacijo maščob). Askorbinska kislina ima v telesu pomembne naloge, zavira namreč bakterijske okužbe, sodeluje pri reakcijah razstrupljanja in sintezi kolagena v različnih tkivih. (5)

Kozmetičnim pripravkom se vitamin C dodaja kot tehnološko sredstvo ali kot aktivna učinkovina. Kot tehnološko sredstvo vitamin C ščiti pred oksidacijo, predvsem maščob, in dobro deluje v kombinaciji z vitaminom E. Dodatek tudi ščiti pred porjavenjem, če preparat vsebuje na primer polifenole, ki so nagnjeni k oksidaciji in razvoju tipične rjave barve. Kot aktivna učinkovina je vitamin C ključen pri sintezi kolagena. Lovi tudi proste radikale, ki so glavni vzrok za poškodbe membran kožnih celic in tako razvoj gub. Če vitamin C prodre v kožo, lahko zavira nastanek gub in na splošno izboljšuje teksturo kože. Problem pri kozmetiki pa je enak kot pri živilih, in sicer askorbinska kislina ni stabilna, zato je pogosto v kozmetičnih pripravkih ob uporabi premalo askorbinske kisline, da bi imela želen učinek. Problem je tudi, ker vitamin C praktično ne prodira v kožo, saj je vodotopen in ne more penetrirati membran kožnih celic. Vendar obstaja rešitev; to je uporaba derivatov askorbinske kisline, na primer askorbil palmitata in natrijevega (ali magnezijevega) askorbil fosfata. Povečata namreč njeno stabilnost in topnost v maščobah. (6)

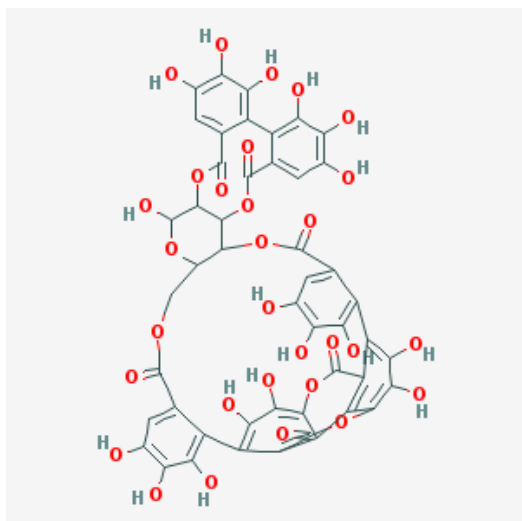
Dandanes se vitamin C v kozmetiki že pogosto uporablja. Pripisujejo mu spodbujanje tvorbe kožnega kolagena, s čimer pripomore k čvrstosti in elastičnosti kože ter tako zavira prehitro staranje. Pomaga proti aknam in osvetljuje pigmentacije, brazgotine, strije ...

Eden novejših izdelkov, ki oglašujejo pozitivne učinke vitamina C, je Nivea Q10plusC, ki vsebuje koencim Q10 in dodatek vitamina C. Niveini strokovnjaki zatrjujejo, da ima vitamin C poleg visoke učinkovitosti kot antioksidant še druge pozitivne učinke na kožo. Poveča gostoto dermalnih papil (bradavičastih izrastkov), zato koža v usnjico transportira več hranil in kisika ter tako zavira nastanek gub. (7)

## Sok granatnega jabolka

Granatno jabolko ali *Punica granatum* je že od antike dalje cenjeno zaradi svojih ugodnih lastnosti in znano kot simbol večne mladosti. Za našo raziskovalno nalogo najpomembnejši snovi, ki ju granatno jabolko vsebuje, so vitamin C in polifenoli.

Polifenoli so spojine z dvema ali več fenolnimi skupinami v molekuli. (8) So zelo močni oksidanti, ki jih najdemo v nekaterih delih posameznih rastlin, zato so podskupina fitokemikalij – snovi, ki jih pridobivamo iz rastlin in njihovih plodov. Spletni viri polifenolom pripisujejo mnoge zdravilne lastnosti, kot je na primer zdravljenje srčno-žilnih bolezni in raka. Poznamo več vrst polifenolov, in sicer fenolske kisline, flavonoide, stilbene in lignine. V granatnem jabolku so prisotni predvsem tanini, natančneje njihove hidrolizične oblike – punicalagini. Ti so odgovorni za več kot 50 % antioksidativnih sposobnosti granatnega jabolka. (9)



Slika 5: struktura punicalagina (10)

Na tržišču so številna prehranska dopolnila, ki vsebujejo sok granatnega jabolka zaradi njegovih antioksidativnih, protimikrobnih, protivnetnih in protivirusnih učinkov. Aktualno je tudi raziskovanje povezave med delovanjem granatnega jabolka ter zdravljenjem bolezni srca in ožilja, diabetesa in raka prostate. (11)

Kot komponenta kozmetičnega izdelka pa sok granatnega jabolka še ni v široki uporabi, a določene raziskave in proizvajalci kozmetike zagotavljajo, da imajo snovi, ki jih vsebuje ta sadež, pozitivne učinke tudi na koži. Olje, ki nastane ob stiskanju semen granatnega jabolka, naj bi vsebovalo različne maščobne kisline (linolensko in punično kislino), ki ščitijo celice kože pred zunanjimi škodljivimi vplivi. Ekstrakt granatnega jabolka vsebuje več polifenolnih antioksidantov kot npr. vino, zeleni čaj ali grozdje (12). Te snovi ščitijo celice kože pred prostimi radikali, ki v tkivu kože nastajajo zaradi UV-sevanja, metabolizma, različnih vnetnih procesov ... Prosti radikali pospešujejo oksidacijo maščob v kožnem tkivu in sprožijo staranje kože.

Zaradi močnih antioksidativnih lastnosti snovi, ki jih granatno jabolko vsebuje, predvidevamo, da bi lahko sok granatnega jabolka preprečeval oksidacijo maščob v kozmetičnem izdelku.

V naši raziskovalni nalogi smo se osredotočili na možnost uporabe soka granatnega jabolka kot antioksidanta in protimikrobno delujoče snovi v kremah. Zato smo pri pripravi dveh krem uporabljali sok granatnega jabolka, pri tretji njen liofilizat.

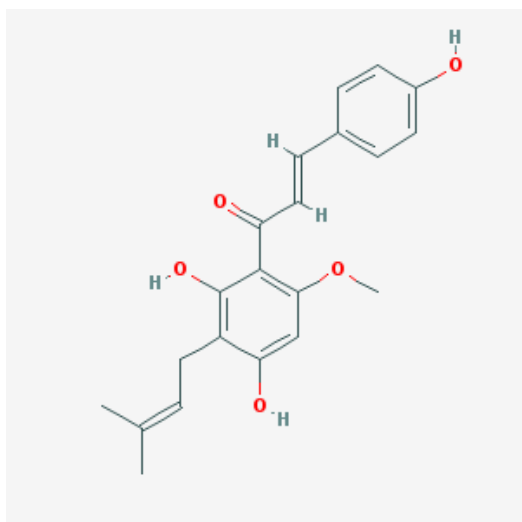
## Ekstrakt hmelja

Hmelj ali latinsko *Humulus lupulus* se že tisočletja uporablja za varjenje piva, njegovi ekstrakti in eterično olje pa se pogosto pojavljajo v kitajski medicini. Uporabni deli rastline so mladi poganjki in žleze v ženskih socvetjih.

Pomembna aktivna snov v hmelju je »železna moka«, ki se imenuje lupulin. Prijetno diši zaradi olja, ki izhlapeva. Hmelj pa vsebuje tudi snov ksantohumol. Gre za flavonoid, ki širše spada med polifenole. Flavonoidi so zelo razširjeni v rastlinah in imajo več funkcij. So rastlinski pigmenti – dajejo rumeno, rdečo in modro barvo cvetovom, plodovom in redkeje tudi listom. Poleg tega ščitijo rastline pred mikrobi in insekti. Delujejo antialergijsko, antiinflamatorno, antimikrobno in antikancerogeno. (13) Kakor vsi polifenoli, so tudi flavonoidi dobri antioksidanti.

Ksantohumolu viri poleg že za flavonoide značilne pozitivne učinke pripisujejo še lajšanje bolečin, zdravljenje raka na prebavilih, pomirjevalne lastnosti, blaženje vnetij na koži in protibakterijsko delovanje. (14), (15)

Zaradi prijetnega vonja, sposobnosti blaženja vnetij na koži, protibakterijskega in antioksidativnega delovanja bi bil ekstrakt hmelja potencialno uporaben tudi v kozmetični industriji.



Slika 6: struktura ksantohumola (16)

## 2.6 DELOVANJE RANCIMATA

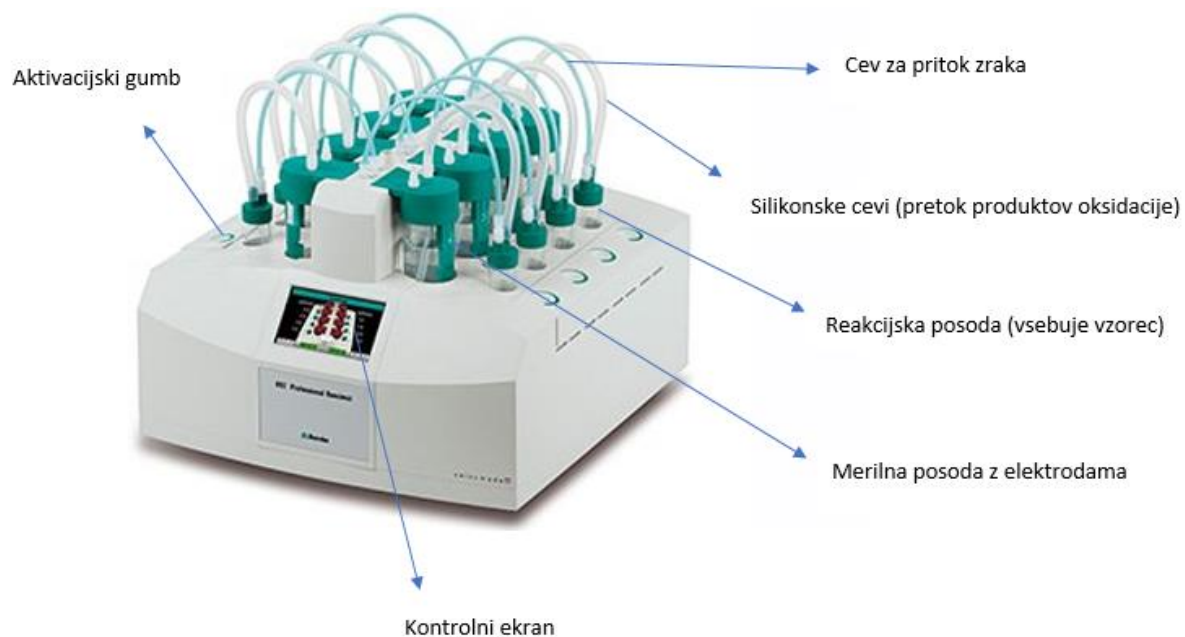
Rancimat (The 892 Professional Rancimat) je naprava, ki ob pomoči programa StabNet omogoča določanje oksidativne stabilnosti naravnih olj in maščob, antioksidativne učinkovitosti antioksidantov in oksidativne stabilnosti hrane in kozmetičnih izdelkov, ki vsebujejo maščobe. Metoda, po kateri deluje rancimat, je vključena v mnoge mednarodne standarde. Med njimi je tudi ISO 6886. Ta navaja, da določanje antioksidativnih lastnosti maščob poteka pod ekstremni pogoji, kar povzroča hitro oksidacijo maščob. Metode zato ne moremo posplošiti na sobne pogoje, omogoča pa primerjavo učinkovitosti različnih antioksidantov. (17)

Rancimat s pomočjo segrevanja in prepihanja z zrakom pospeši proces oksidacije maščob, ki se oksidirajo najprej v primarne produkte oksidacije – perokside, nato pa s sekundarno oksidacijo v organske kisline, kot sta npr. očetna kislina in mravljinčna kislina. Ker so te zaradi visokih temperatur, po standardu ISO med 100 in 120 °C, v plinastem agregatnem stanju, z zračnim tokom, ki ga povzroča prepihanje, potujejo po silikonski cevki v posodo z destilirano vodo. Vanjo je potopljena celica za merjenje prevodnosti. Ker so kisline topne v vodi in so elektroliti, dobimo raztopino, ki prevaja električni tok. Aparat zapisuje spremembe v električni prevodnosti, iz katerih lahko sklepamo o hitrosti oziroma poteku oksidacije. Čas med začetkom delovanja rancimata in pojavitvijo sekundarnih produktov oksidacije in s tem začetkom prevodnosti se imenuje indukcijski čas/indukcijska perioda ali indeks stabilnosti olj (OSI). Opisuje oksidacijsko stabilnost vzorca. Čim daljši je indukcijski čas, tem bolj je vzorec oksidativno stabilen. ISO 6886 za optimalni indukcijski čas navaja od 6 do 24 ur. V naši raziskovalni nalogi so bili vzorci krem meritvam izpostavljeni 48 ur, da bi s čim večjo gotovostjo lahko potrdili delovanje antioksidantov. (17)

Rancimat je povezan z računalnikom in s tem s programom StabNet. Ta spremembe v električni prevodnosti zapisuje v obliki grafov in tabel. Pri tem električno prevodnost meri v  $\mu\text{S cm}^{-1}$ , čas pa v sekundah. V takšni obliki bodo zapisani tudi rezultati raziskovalne naloge. (18) V ISO 6886 je navedeno opozorilo, da lahko zaradi maščobnih kislin, ki so produkti oksidacije, pride do manjših odstopanj pri rezultatih.

V raziskovalni nalogi smo uporabili rancimatovo sposobnost določanja oksidativne stabilnosti kozmetičnih izdelkov. Primerjali smo indukcijski čas vzorcev 10 krem in s tem ugotavljali antioksidativne lastnosti dodanih naravnih antioksidantov.





Slika 7: Sestavni deli rancimata (18)

## 2.7 PROTIMIKROBNO DELOVANJE PROUČEVANIH SNOVI

Vzorci kreme s proučevanimi snovmi smo inokulirali z bakterijo *E. coli*. Po 24-urni inkubaciji vzorcev pri 37 °C smo pripravili matično raztopino. Sledila je priprava razredčitev po Kochu, nato pa smo ustrezne razredčitve prenesli na petrijevke s hranljivim agarjem in po 24 urah inkubacije na 37 °C prešteli število kolonij. Rezultat smo izrazili kot število kolonijskih enot (KE)/g vzorca kreme.

## 3. EKSPERIMENTALNI DEL

### 3.1 PRIPRAVA KREM

Za proučevanje vpliva ekstraktov hmelja in granatnega jabolka na stabilnost krem za kožo smo morali najprej izdelati kreme.

#### Uporabljene kemikalije

- voda Milli Q (ustekleničena 16. 12. 2017)
- oljčno olje; rafinirano, hladno stiskano, deviško (Tovarna Organika, ser. št.: 311689)
- kakavovo maslo; bio, hladno stiskano, z vonjem (Herbana, HM55-115)
- naravni emulgator (Plantec OP2, Herbana, OP10135)
- konzervans (Geogard 221, Tovarna Organika, 4809469)
- vitamin C (Lekarne Ljubljana, 09001117)
- liofiliziran sok granatnega jabolka (Hicaz; Biotehniška fakulteta v Ljubljani, pripravljen 21. 12. 2015)
- ekstrakt hmelja na diatomejski zemlji DE (Hopsteiner, 761009)

#### Pripomočki

- sterilizirane kovinske posode, očiščene z etanolom
- sterilizirane kovinske spatule
- kovinska sterilizirana metlica
- analitska tehtnica Axis, Intertech.si
- indukcijska kuhalna plošča Silvercrest
- digitalni termometer Workzone
- sterilne plastične embalaže za kreme

#### Postopek

##### 1. Priprava vodne faze

V sterilizirano kovinsko posodo smo zatehtali 56 g destilirane in deionizirane vode.

##### 2. Priprava oljne faze

V drugo sterilizirano kovinsko posodo smo natehtali 20 g oljčnega olja, 16 g kakavovega masla in 8 g emulgatorja.

3. Obe fazi, vodno in oljno, smo ločeno segrevali nad vodno kopeljo, dokler obe nista dosegli temperature 65 °C. Oljno fazo smo med segrevanjem občasno premešali, da smo dobili homogeno zmes.



Slika 8: Segrevanje vodne in oljne faze (Vir: osebni arhiv)

4. Tako pripravljenim osnovam smo dodali različne dodatke, navedene v tabeli št. 1. Za potrebe raziskovalne naloge smo izdelali 11 krem.

Krema \ Sestavine	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
voda (g)	56,19	56,02	56,13	56,03	55,99	55,98	56,04	56,01	56,24	56,24	56,02
oljčno olje (g)	19,49	20,01	20,03	19,99	20,00	20,02	20,02	20,01	20,21	19,98	19,95
kakavovo maslo (g)	16,00	16,20	16,01	15,98	16,26	16,06	16,24	16,61	16,01	15,95	16,10
emulgator (g)	8,00	8,07	8,05	8,53	8,02	8,31	8,05	8,10	8,03	8,00	7,99
dodatek (g)	/	0,99	0,97	5,04	2,52	10,04	2,51	2,53	10,03	0,70	
etanol (g)							10,50				10,50

Tabela 1: Sestava posameznega vzorca kreme

- 1 – krema brez dodatkov
- 2 – krema z dodanim sintetičnim konzervansom Geogard
- 3 – krema z 1 g vitamina C
- 4 – krema s 5 g vitamina C
- 5 – krema z 2,5 g soka granatnega jabolka
- 6 – krema z 10 g soka granatnega jabolka

7 – krema z 2,5 g ekstrakta hmelja DE, delno raztopljenega v etanolu (oznaka: »ekstrakt hmelja DE v etanolu«)

8 – krema z 2,5 g ekstrakta hmelja DE, zamešanega neposredno v oljno fazo (oznaka: »ekstrakt hmelja DE v olju«)

9 – krema z 10 g trikrat koncentriranega liofiliziranega soka granatnega jabolka

10 – krema z neposredno vmešanim ekstraktom hmelja, ki smo ga dobili z ekstrakcijo hmelja DE v etanolu (oznaka: »ekstrakt hmelja«)

11 – krema z dodanim etanolom

#### 5. Popravki pri izdelavi določenih vzorcev

Kremi, ki sta vsebovali ekstrakt hmelja DE in liofiliziran sok granatnega jabolka, sta nam pri izdelavi povzročali težave. Zato smo ekstrakta obeh snovi pripravili še enkrat in dodali v kremi, pripravljeni po sicer isti recepturi kot druge kreme.

- Priprava hmeljevega ekstrakta

V 1 L etanola smo dodali 20,0 g hmelja. Zmes smo nato 2 uri mešali na magnetnem mešalniku. S tem smo poskusili čim več v etanolu topnih snovi, predvsem ksantohumola, ekstrahirati iz prej slabo topnega praha. Nastalo zmes smo dvakrat prefiltrirali in ostanek na filtrirnem papirju posušili ter stehtali. Masa je znašala 16,2 g. Glede na to, da smo v 1 L etanola dodali 20,0 g hmelja, 16,2 g pa ga je ostalo na filtrirnem papirju, lahko trdimo, da je bilo po do zdaj opravljenem procesu v etanolu še vedno 3,8 g hmeljskega ekstrakta. Ker je etanol sam po sebi konzervans in draži kožo, smo ga odparili z rotavaporjem. Preostanek smo pustili v bučki in po potrebi prenesli v destilirano vodo in pripravili suspenzijo za dodajanje kreme (slika 6).



Slika 9: Ekstrakt hmelja (Vir: osebni arhiv)



Slika 10: Rotavapor (Vir: osebni arhiv)

- Priprava ekstrakta granatnega jabolka

Kremama št. 5 in 6 smo dodali sok granatnega jabolka. Kremi št. 9 pa njegov liofilizat. Tega smo pripravili naknadno.

S fakultete smo dobili 3 falkonke, napolnjene z liofiliziranim sokom granatnega jabolka. V prvo izmed falkonk smo natočili 10 mL destilirane vode in jo stresali, dokler ni nastala homogena zmes. Nato smo vsebino te falkonke zlili v drugo falkonko, ki je vsebovala liofiliziran sok granatnega jabolka, in zopet pretresli, da smo dobili novo, dvakrat bolj koncentrirano homogeno zmes. To smo potem prelili še v tretjo falkonko z liofiliziranim sokom, pretresli in dobili končno raztopino, trikrat koncentriran ekstrakt, ki smo ga uporabljali za nadaljnje delo.



*Slika 11: Falconka s sokom granatnega jabolka (Vir: osebni arhiv)*

### 3.2 PREVERJANJE ANTIOKSIDATIVNIH LASTNOSTI VZORCEV KREM NA NAPRAVI RANCIMAT

Najprej smo delovanje rancimata preverili s testnim poskusom. V ta namen smo testirali dva vzorca kreme. V dve posebni epruveti, namenjeni delu z rancimatom, smo natehtali približno 4 g krem (v obeh primerih 4,02 g). Pred tehtanjem smo kremi pomešali, da bi zagotovili homogenost vzorca. Vzorca smo natehtali s pomočjo sterilne spatule, ki smo jo po vsaki uporabi obrisali in razkužili z etanolom.

V dve čaši, kamor vstavimo celico za merjenje prevodnosti, smo s pomočjo merilnega valja nalili 60,0 mL destilirane vode.

Čaši z vodo in epruveti z vzorcema smo nato namestili na aparat. Temperaturo smo nastavili na 115,0 °C, prepihanje z zrakom pa na 20 L/h. Tem pogojem smo vzorca izpostavili 20 ur. Začetna temperatura, preden smo zagnali proces, je bila 25,5 °C. Prevodnost destilirane vode je znašala 1,8  $\mu\text{S}/\text{cm}$ .



Slika 12: Delovanje naprave Rancimat (Vir: osebni arhiv)

Naslednji dan smo preverili rezultate in ugotovili, da rancimat deluje, saj je redno zapisoval spremembo prevodnosti, od krem pa je v posodicah ostal le še ostanek oljne faze.

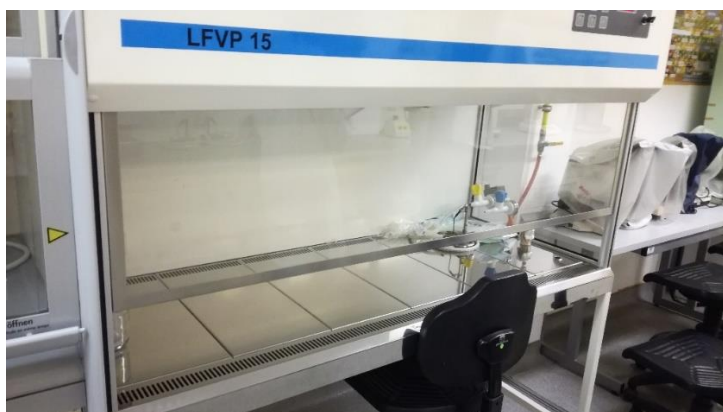
Prepričani, da naprava deluje, smo začeli s pravim eksperimentom. Postopka smo se lotili na enak način kot pri prvih dveh vzorcih, z razliko, da smo tokrat uporabili vseh 8 merilnih postaj na rancimatu. Preden smo napravo zopet zagnali, smo počakali, da je temperatura bloka A dohitela zaradi predhodne uporabe še ne povsem ohlajen blok B.

Tako smo 4 g vsakega vzorca izpostavili temperaturi 115,0 °C in prepihanju zraka. Naprava je delovala 48 ur in z merjenjem prevodnosti ugotavljala oksidacijo maščob v vzorcih.

### 3.3 PREVERJANJE PROTIMIKROBNIH LASTNOSTI PROUČEVANIH SNOVI

#### Priprava inokuluma bakterije *E. coli*

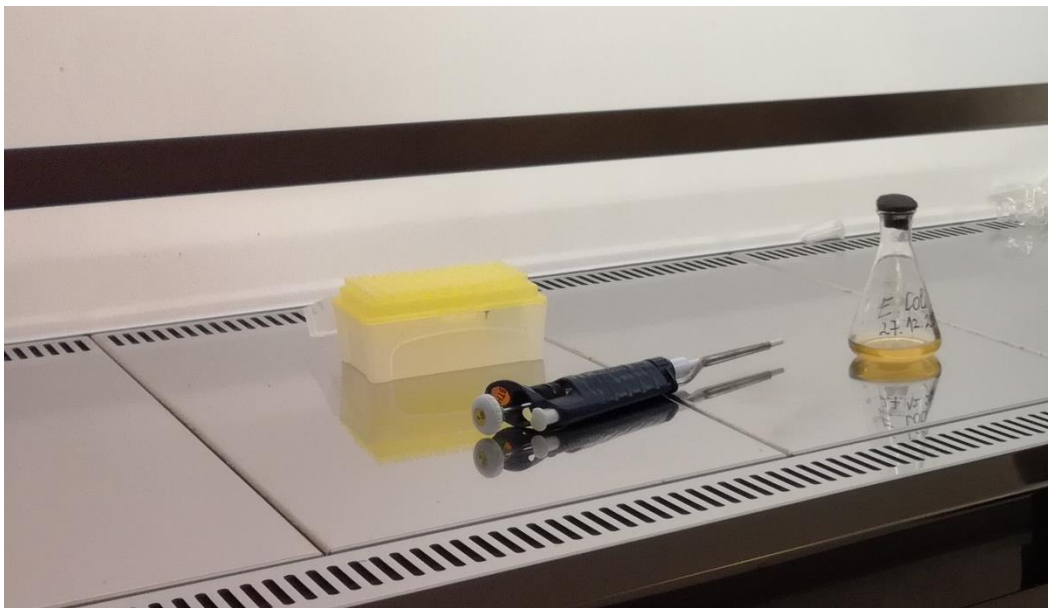
Bakterijo *E. coli* shranjujemo pri temperaturi  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  in v 20-odstotni raztopini glicerola, ki deluje kot krioprotektant – ščiti jo pred liziranjem. V takšnem stanju bakterija ne more uspevati, zato smo jo morali revitalizirati. Vse delo, ki smo ga opravljali s kulturo, je moralo potekati v aseptičnem okolju, zato smo ga izvajali v laminariju.



Slika 13: Laminarij (Vir: osebni arhiv)

Na sobni temperaturi smo celično suspenzijo bakterij odtajali, nato smo s pipeto  $50\text{ }\mu\text{L}$  kulture dodali v 20 mL hranljivega bujona, ki je bil v erlenmajerici. Nato smo erlenmajerico pokrili s čepom, narejenim iz filtra, ki je omogočal dotok prefiltriranega zraka. Erlenmajerico z brozgo (kultura + gojišče) smo dali v stresalnik in jo dobro pričvrstili; tam je bil vzorec izpostavljen stresanju pri 150 obratih/minuto in  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , kar so optimalne razmere za rast bakterij *E. coli*. Čez noč so bakterije prešle eksponentno fazo rasti in zjutraj je bila kultura v stanju pozne eksponentne rasti ter pripravljena za nadaljnje delo.





Slika 14: Pipeta in erlenmajerica z brozgo E. coli (Vir: osebni arhiv)



Slika 15: Stresalnik (Vir: osebni arhiv)

S pipeto smo iz erlenmajerice z že razvito kulturo bakterij *E. coli* odpipetirali 2 mL v vsako od dveh mini centrifugirk. Medtem smo brozgo redno mešali, da bi preprečili usedanje kulture. Mini centrifugirki smo nato namestili v centrifugo za 5 minut na 12 000 obratov/min.



Slika 16: Centrifuga z dvema centrifugirkama (Vir: osebni arhiv)



Slika 17: Mini centrifugirka, opazna je meja med sedimentom in supernatantom (Vir: osebni arhiv)

Dve mini centrifugirki smo uporabili le zaradi ravnovesja v centrifugi, nato smo postopek nadaljevali samo z eno od njiju. Po centrifugiranju smo v mini centrifugirki videli dve ločeni fazi – na dnu sediment, nad njim pa tekoč supernatant. Tega smo v laminariju odpipetirali in zavrgli. Ostal je sediment, ki smo mu dodali 2 mL fiziološke raztopine. Pri tem smo pazili, da se z nastavkom pipete nismo dotaknili sten embalaže fiziološke raztopine, saj nastavek prihaja v stik s kulturo. Da bi bila resuspenzacija uspešnejša, smo uporabili vrtnični mešalnik. Nastalo suspenzijo smo zopet namestili v centrifugo in izpostavili enakim pogojem kot pri prejšnji centrifugaciji. To stopnjo postopka priprave kulture imenujemo spiranje.

Po drugem centrifugiranju sta v mini centrifugirki zopet opazni dve fazi. Supernatant smo zavrgli in dodali 2 mL fiziološke raztopine. Dobili smo končno suspenzijo, ki smo jo uporabili v nadaljevanju postopka.

## Inokulacija vzorcev krem z bakterijo *E. coli*

V falkonke smo natehtali približno 10 g posameznega vzorca kreme. Pri polnjenju falkonk s kremami smo si pomagali z dvema spatulama, ki smo ju dezinficirali z etanolom.

V laminarij smo postavili predhodno pripravljene vzorce krem in odmašili zamaške vseh vzorcev ter v vsakega posebej s pipeto nacepili 100  $\mu$ L suspenzije *E. coli*. Inokuliran vzorec smo nato hitro zmešali s sterilno palčko, da bi preprečili lokalno reakcijo.

Enak postopek smo ponovili pri inokulaciji domnevno protimikrobno delujočih snovi. Edina razlika je, da smo vzorce po inokulaciji zmešali s tresenjem, pri čemer smo pazili, da tekočina ni prišla v stik s pokrovčkom.

Med samim postopkom smo suspenzijo z *E. coli* redno mešali, da se celice ne bi posedle.

Falkonke, ki so vsebovale inokulirane vzorce, smo za inkubacijsko dobo 24 ur namestili v stresalnik pri 150 obratih/minuto. Vzorci so se v stresalniku mešali predvsem zaradi ekstraktov, da se ti ne bi posedli na dno falkonk. Temperaturo smo nastavili na 37 °C, kar je optimalno za rast bakterij v vzorcih. V resničnem življenju bi bile seveda kreme oziroma vzorci izpostavljeni sobni temperaturi, toda to bi z vidika našega poskusa vzelo preveč časa.

Naslednji dan smo falkonke, v katerih so bakterije rastle čez noč, pripravili na nanašanje vzorcev na plošče. Iz falkonk z inokuliranimi kremami smo s sterilno spatulo v nove sterilne falkonke natehtali po 1 g vsakega vzorca. Spatulo smo sterilizirali s flambiranjem (jo pomočili v etanol in nesli skozi plamen). Pred tehtanjem smo vzorce s spatulo dobro premešali. Nato smo v falkonke s pipeto dodali 9 mL fiziološke raztopine. Vse to smo naredili ob gorilniku, da bi preprečili kontaminacijo pribora in vzorcev z mikroorganizmi iz zraka. Tako smo dobili 7 novih matičnih raztopin.

	1	2	3	7	8	9	10	11
Masa (g)	0,99	0,98	0,98	1,00	0,99	1,00	1,00	0,98

Tabela 2: Masa krem, ki smo jim nato dodali 9 mL fiziološke raztopine

Opomba: V testiranje protimikrobnih sposobnosti smo vključili le naslednje vzorce krem: 1 (krema brez dodatkov), 2 (krema z dodanim sintetičnim konzervansom Geogard), 3 (krema z 1 g vitamina C), 7 (krema z 2,5 g ekstrakta hmelja DE v etanolu), 8 (krema z 2,5 g ekstrakta hmelja DE v olju), 9 (krema z 10 g ekstrakta granatnega jabolka), 10 (krema z ekstraktom hmelja) in 11 (krema z dodanim etanolom). Izključili smo kremo s 5 g vitamina C, saj je bila zaradi večje količine askorbinske kisline zelo grudičasta in nehomogena. Namesto krem 5 in 6 smo testirali kremo številka 9, ki vsebuje na novo pripravljen ekstrakt granatnega jabolka.

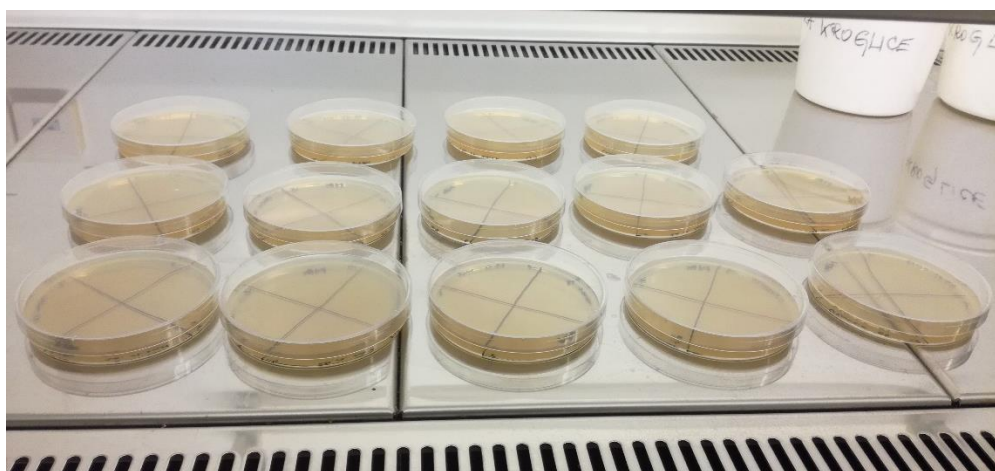
## Redčenje po Kochu

Redčenje je potekalo po naslednji shemi: V osmih falkonkah je bilo po 1 g vzorca, ki smo mu dodali 9 mL fiziološke raztopine, torej je bila razredčitev desetkratna ( $10^{-1}$ ).

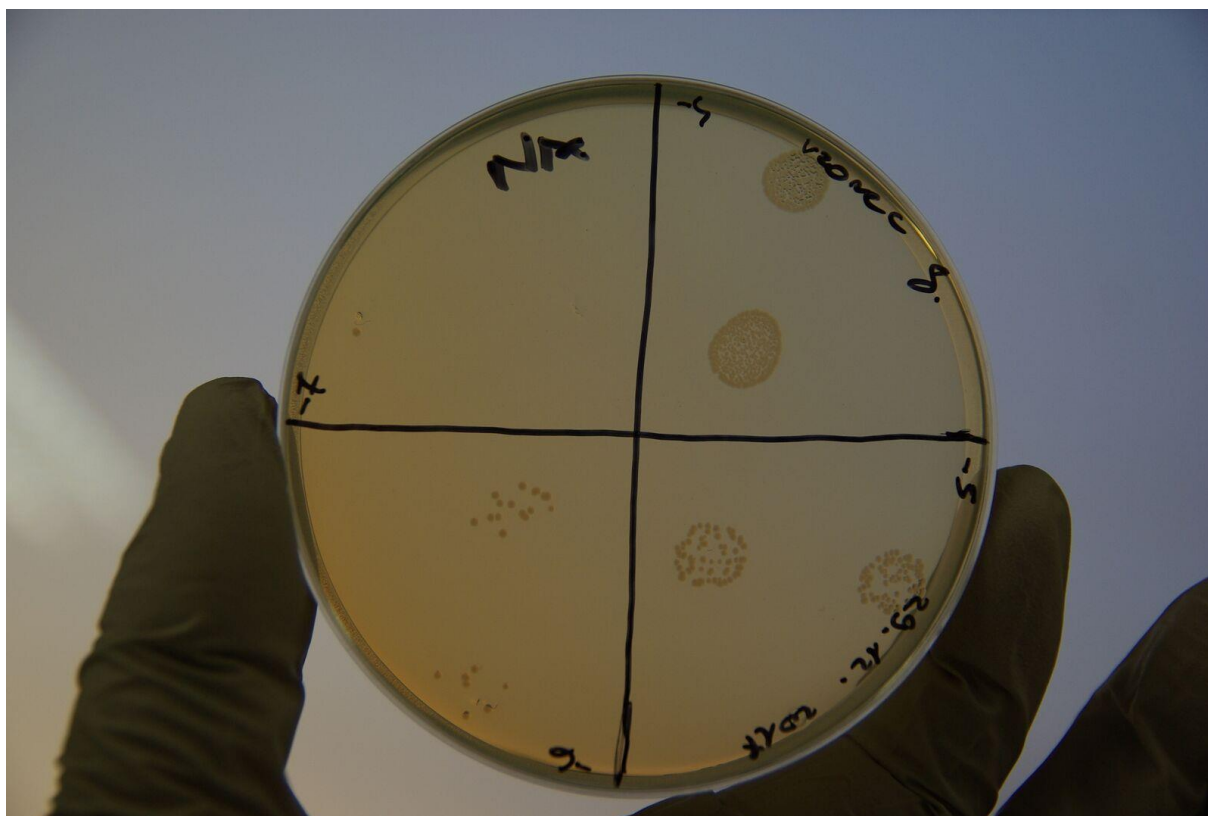
V takšni razredčitvi bi na ploščah zrastle veliko preveč kolonij, da bi jih lahko šteli, zato je bilo treba matično raztopino še vsaj nekajkrat razredčiti, da bi zagotovili števne plošče.

Tako smo odpipetirali 100  $\mu$ L matične raztopine in jo dodali k 900  $\mu$ L fiziološke raztopine. Dobili smo stokratno razredčitev ( $10^{-2}$ ). Iz te smo odpipetirali 100  $\mu$ L in jih dali v 900  $\mu$ L fiziološke raztopine, da smo dobili tisočkratno razredčitev ( $10^{-3}$ ), in postopek zopet ponovili, da smo dobili še desetstokratno razredčitev ( $10^{-4}$ ).

Sledilo je nanašanje različnih razredčitev na plošče s hranljivim agarjem. Tudi to je potekalo v laminariju. Vsako ploščo smo razdelili na kvadrate, vsak kvadrant za eno razredčitev. Na vsako četrtino smo nato s pipeto nanesli dve kapljici razredčenega vzorca, vsaka kapljica po 10  $\mu$ L – dve zato, da imamo ponovitev. Prej smo vsak vzorec premešali na vrtničnem mešalniku. Pri nanašanju smo pazili, da kapljic nismo nanesli preblizu druga drugi. Ko smo na vsak kvadrant nanesli dve kapljici, smo petrijevko zaprli in potem z njo ravnali zelo previdno (da se tekočina ne bi razlila po agarju). Ko smo končali, smo nacepljene petrijevke odnesli v inkubator s temperaturo 37 ° C; v tem času so na agarju zrastle kolonije bakterije *E. coli*.



Slika 18: Petrijevke z vzorci inokuliranih krem (Vir: osebni arhiv)



Slika 19: Plošča s kolonijami E. coli – vzorec 8 (Vir: osebni arhiv)

Kolonije smo nato prešteli in po spodnji formuli izračunali število KE/g vzorca kreme.

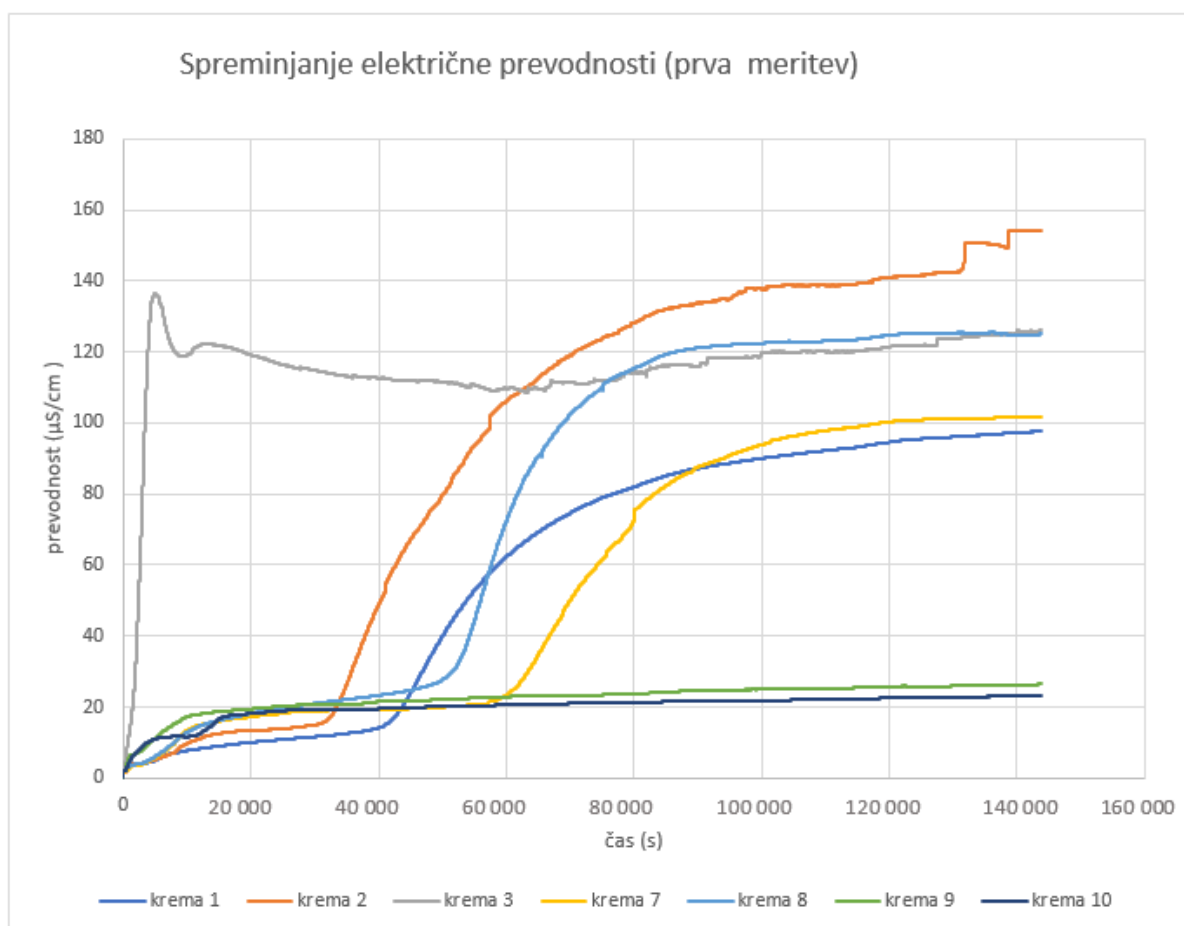
$$KE/g = (\text{število kolonij} \div \text{razredčitev vzorca}) \times 100$$

KE ... kolonijska enota

## 4. REZULTATI

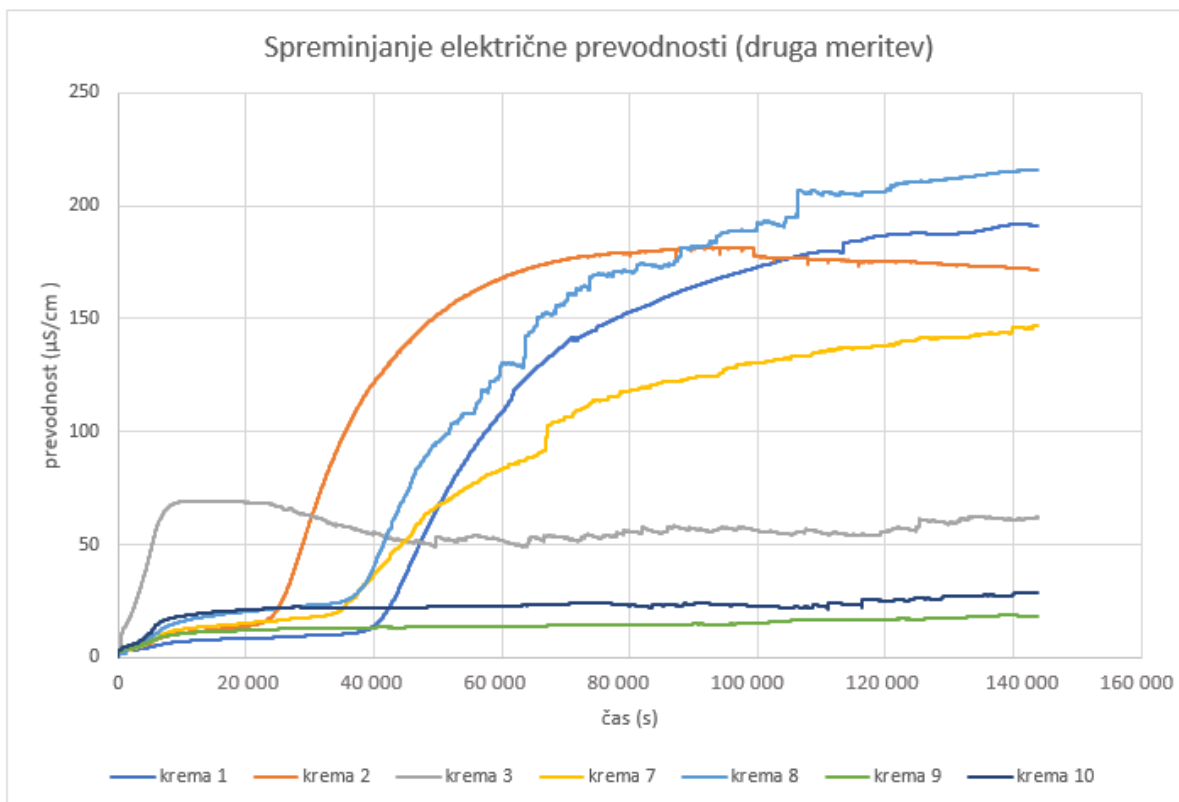
### 4.1 Rezultati rancimata

Grafa številka 1 (prva meritev) in številka 2 (druga meritev) prikazujeta časovno spreminjanje električne prevodnosti posameznih vzorcev krem.



Graf 1: Spreminjanje električne prevodnosti pri vseh kremah (prva meritev)





Graf 2: Spreminjanje električne prevodnosti pri vseh kremah (druga meritev)

Kot je razvidno iz grafov, sta oksidacijo maščob v kremah najuspešneje preprečila koncentrata granatnega jabolka (krema 9) in hmelja (krema 10). Pri obeh meritvah električna prevodnost vzorcev ni narasla za več kot 40  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , kar kaže na počasen razpad krem oziroma na precej neuspešno oksidacijo lipidov v kremah.

Električna prevodnost vzorcev krem z dodatkom hmeljevega ekstrakta, raztopljenega v olju (krema 8) oziroma etanolu (krema 7), je naraščala podobno kot električna prevodnost kreme brez dodatkov, kar je razvidno iz obeh grafov. Kljub temu je končna električna prevodnost vzorcev pokazala, da je hmeljev ekstrakt raztopljen v olju slabše zaviral oksidacijo kot hmeljev ekstrakt, raztopljen v etanolu, saj je električna prevodnost vzorca kreme št. 8 pri obeh meritvah za približno 50  $\mu\text{S}/\text{cm}$  presegala električno prevodnost vzorca kreme št. 7. Električna prevodnost vzorca z dodanim konzervansom Geogard je pri prvi meritvi presegala električno prevodnost vzorca št. 8, a to za drugo meritev ne velja. Ker je električna prevodnost kreme št. 8 v obeh meritvah večja od električne prevodnosti kreme brez dodatkov, lahko trdimo, da ekstrakt hmelja v olju ni uspešno zaviral oksidacije lipidov v kremi.

To pa ne velja za ekstrakt hmelja v etanolu. Sodeč po rezultatih druge meritve je električna prevodnost vzorca kreme št. 7 narasla za približno 50  $\mu\text{S}/\text{cm}$  manj kot električna prevodnost vzorca kreme brez dodatkov. Hmeljev ekstrakt, raztopljen v etanolu, je torej deloval kot antioksidant. Poleg tega je električna prevodnost vzorca kreme št. 7 v obeh meritvah narasla



manj kot električna prevodnost vzorca kreme z dodanim konzervansom Geogard. Hmeljev ekstrakt, raztopljen v etanolu, se je torej pri obeh meritvah izkazal za boljši antioksidant od konzervansa Geogard, saj je oksidacijo lipidov v kremah zaviral uspešneje.

Sintetični konzervans se je izkazal za manj antioksidativno učinkovitega, saj je krema št. 2 sicer sprva zavirala oksidacijo, a je po približno 2000 sekundah začela električna prevodnost naraščati. Pri prvi meritvi je električna prevodnost kreme št. 2 celo za 50  $\mu\text{S}/\text{cm}$  presegala električno prevodnost kreme brez dodatkov, kar pomeni, da so se lipidi v kremi z dodanim konzervansom oksidirali še prej kot v kremi brez dodatkov. Pri drugi meritvi se električni prevodnosti krem št. 1 in 2 praktično ujemata.

Nenavaden in nepričakovan pa je bil v prvi meritvi rezultat kreme z vitaminom C. Pri tej kremi je električna prevodnost začela strmo naraščati takoj po začetku meritve, dosegla neko vrednost, nato pa do konca meritve stagnirala. Za tak rezultat krivimo hidrolizo maščob v kremi, ki jo je povzročila askorbinska kislina oziroma vitamin C.

## 4.2 Rezultati mikrobioloških testiranj

	KE/g
1 – krema brez dodatkov	20 500 000
2 –krema z dodanim sintetičnim konzervansom Geogard	/
3 – krema z 1 g vitamina C	10 000
7 – krema z 2,5 g ekstrakta hmelja DE v etanolu	/
8 – krema z 2,5 g ekstrakta hmelja DE v olju	11 000 000
9 – krema z 10 g ekstrakta granatnega jabolka	12 500 000
10 – krema z ekstraktom hmelja DE	10 500 000
11 – krema z dodanim etanolom	/

Tabela 3: Število kolonijskih enot bakterij *E. coli* na gram določene kreme

Krema 11 je bila narejena naknadno, da bi se prepričali, ali ima etanol (v katerem je bil raztopljen ekstrakt hmelja DE) vpliv na živost bakterij *E. coli*.

Iz tabele 4 je razvidno, da so edini vzorci, kjer je bila rast bakterij *E. coli* popolnoma zavrta, krema št. 2 (krema, ki je vsebovala sintetični konzervans), krema št. 7 (krema s hmeljem v etanolu) in krema št.11 (krema z dodanim etanolom). Sledi krema št. 3, ki je vsebovala 1 g vitamina C. Sledijo krema s hmeljevim ekstraktom DE št. 10, krema s hmeljem v olju št. 8 in nazadnje krema z 10 g ekstrakta granatnega jabolka. Vitamin C je torej opazno zmanjšal rast bakterije *E. coli*. Tudi ekstrakta hmelja DE in granatnega jabolka sta imela nezanemarljive učinke. Skoraj za polovico sta zmanjšala rast bakterij *E. coli*.

Rezultati mikrobioloških testiranj so pokazali, da imajo vitamin C in ekstrakt hmelja DE v olju ter ekstrakt granatnega jabolka protimikrobne učinke, ki sicer niso primerljivi z učinki sintetičnega konzervansa, a so zadovoljivi.

## 5. DISKUSIJA

V zadnjih desetletjih vse bolj narašča uporaba sintetičnih snovi. Z njimi se srečujemo na vseh področjih življenja. S hrano vsakodnevno v svoje telo vnašamo industrijsko proizvedene snovi, v stiku pa smo tudi z mnogimi sintetičnimi kemikalijami v kozmetičnih izdelkih.

Koža je naš največji organ, zato je zelo občutljiva na takšne sestavine. Poleg tega za opravljanje svoje vloge potrebuje določene snovi, ki jih sintetični konzervansi zaradi svoje specializirane funkcije ne nudijo, naravni konzervansi in antioksidanti pa poleg zaviranja rasti mikroorganizmov in preprečevanja oksidacije maščob ponujajo še širok spekter pozitivnih učinkov za kožo, ki smo jih opisali v teoretičnem delu naše raziskovalne naloge.

V zadnjem času postajajo vse bolj priljubljeni naravni nadomestki sintetičnih kemikalij. Ker gre za precej mlado področje, o sestavinah naravne kozmetike še ni veliko znanega. Probleme predstavljajo organske sestavine, ki so hitro pokvarljive in zato potrebujejo ustrezno zaščito v obliki naravnih konzervansov. Ob zbiranju podatkov o njih smo prišli do ugotovitve, da je takšnih konzervansov zelo malo, njihovo delovanje pa dokaj vprašljivo. To nas je spodbudilo k testiranju treh snovi, ki imajo, sodeč po že obstoječi literaturi, antioksidativne in protimikrobne sposobnosti. To so: vitamin C, ekstrakt hmelja in ekstrakt granatnega jabolka.

Vitamin C se je izkazal za najučinkovitejšega v zaviranju rasti bakterij *E. coli*. Rast bakterij je preprečil z 99,9-odstotno učinkovitostjo. Antioksidativne lastnosti vitamina C so se izkazale za zanemarljivo majhne v primerjavi z drugimi testiranimi snovmi. Razlog za hiter razpad kreme je verjetno povezan z lastnostmi vitamina C, ki onemogočajo popolno homogenizacijo sestavin v kremi. Težave z nehomogenostjo pripravljene kreme smo imeli že ob pripravljanju krem. Takrat smo pripravili tudi kremo z dodatkom 5 g vitamina C. Zaradi nehomogenosti zmesi – grudičaste strukture in pozneje ločitev oljne faze – smo kremo odstranili iz nadaljnje raziskave. Krema z dodatkom 1 g vitamina C je bila sicer za razliko od kreme z dodanimi 5 g vitamina C na videz povsem homogena. Kljub temu je ob posebnih pogojih, ki so jim bili vzorci izpostavljeni v rancimatu, dokaj hitro razpadla, kar je dobro razvidno iz obeh grafov. Že po 6413 sekundah je namreč električna prevodnost, ki nakazuje prisotnost produktov oksidacije, narasla na 136  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Nato je v preostalih 46 urah stagnirala oziroma rahlo padla. Glede na hitrost razpada sklepamo, da je za oksidacijo oljne faze kreme z 1 g vitamina C v veliki meri kriva nehomogenost sestavin kreme. Askorbinska kislina je namreč povzročila hidrolizo trigliceridov ali maščob v kremi, torej je velika električna prevodnost posledica produktov hidrolize in ne oksidacije. Tako lahko prvo hipotezo, ki pravi, da ima vitamin C protimikrobne in antioksidativne lastnosti, le delno potrdimo. Vitamin C je znatno zavrl rast bakterij *E. coli*, ne moremo pa z gotovostjo govoriti o njegovih sposobnostih zaviranja oksidacije.

Hmeljev ekstrakt DE se je ob pripravi krem izkazal za slabo topnega v vodi in olju ter celo v etanolu. Zato smo za namene raziskave pripravili več vzorcev krem, v katere smo na različne načine dodajali ekstrakt hmelja DE. Tako smo pripravili kremo z 2,5 g ekstrakta hmelja v etanolu, kremo z 2,5 g ekstrakta hmelja v olju in na koncu kremo s koncentrirano različico 20 g ekstrakta hmelja. Pri nobeni izmed navedenih krem se hmeljev koncentrat v prahu ni popolnoma raztopil in povezal z drugimi sestavinami kreme. Ta je bila tako zeleno obarvana in ob mešanju se je čutilo »hrskanje« trdnih delcev.

Krema s hmeljskim koncentratom ni kazala izrazitih protimikrobnih učinkov, še manj krema z 2,5 g ekstrakta hmelja DE v olju. Inhibicija rasti bakterij *E. coli* v teh dveh kremah v primerjavi s kremo brez dodatkov je bila približno 50-odstotna. Nasprotno pa se je krema s hmeljem, raztopljenim v etanolu, izkazala za zelo obstojno proti bakterijam *E. coli*. Ugotovili smo, da je rast bakterij pri zadnji ustavilo delovanje etanola, saj je bila koncentracija hmelja v tem vzorcu veliko manjša od koncentracije hmelja v koncentrirani različici (2,5 : 20). Da bi se dodatno prepričali, da je za rezultat odgovorno le protimikrobno delovanje etanola, smo naknadno izdelali in inokulirali kremo z dodatkom etanola. Ker je bila v kremi rast bakterij *E.coli* popolnoma inhibirana, smo našo domnevo potrdili. O hmeljevih protimikrobnih sposobnostih tako težko govorimo.

Končen rezultati rancimata za kremo s hmeljem, raztopljenim v etanolu, sicer izrazito ne izstopa, a kljub temu presega antioksidativne lastnosti večine drugih vzorcev. Poleg tega je treba poudariti, da je hmelj, raztopljen v etanolu, kar 19 ur izjemno uspešno preprečeval oksidacijo maščob v kremi. Električna prevodnost je takrat znašala komaj 20  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Antioksidativne lastnosti hmelja, raztopljenega v olju, so bile manjše. Kakor koli že, hmeljev koncentrat se je izkazal za odličnega preprečevalca oksidacije maščob v kremi, zato lahko z gotovostjo potrdimo del druge hipoteze, ki pravi, da je hmelj dober antioksidant. Prvega dela hipoteze ne moremo potrditi, zato je celotna druga hipoteza potrjena le delno.

Glede na rezultate rancimata sklepamo, da je najboljša topilo za hmelj etanol, v katerem smo raztapljali hmelj za vzorca 9 in 7. Največ učinkovin povsem logično kaže večja koncentracija hmelja, torej vzorec 9.

Pri proučevanju učinkov granatnega jabolka smo sprva naredili kremo z dodatkom soka granatnega jabolka, a smo zaradi potrebe po večjih koncentracijah učinkovin pripravili še en ekstrakt, katerega pripravo smo opisali v eksperimentalnem delu. Krema z ekstraktom granatnega jabolka se je izkazala za najmanj protimikrobno učinkovito, a je zelo dobro preprečevala oksidacijo oljne faze kreme. Tako lahko delno potrdimo tretjo hipotezo; ekstrakt granatnega jabolka ima dobre antioksidativne lastnosti, ne zavira pa v celoti rasti bakterij *E. coli*. Inhibicija rasti v tej kremi v primerjavi s kremo brez dodatkov je bila 40-odstotna.

Vse meritve, ki smo jih izvajali na napravi Rancimat, smo zaradi preverjanja ponovljivosti izvedli dvakrat in rezultati so se izkazali za zelo primerljive. Manjša odstopanja, ki so se pojavila, pripisujemo vplivu produktov oksidacije. Drugo meritev smo na rancimatu izvedli nekaj dni pozneje, zato potek oksidacije ne more biti popolnoma enak. Možnost odstopanja upoštevajo že navodila standarda ISO 6886, kot je omenjeno v teoretičnem uvodu. Pri vrednotenju rezultatov se moramo zavedati tudi, da so bili pogoji, ki smo jim izpostavili vzorce krem na rancimatu, zelo ekstremni v primerjavi s pogoji, ki so jim kreme izpostavljene v vsakdanjem življenju. Tako bi na primer sintetični konzervansi in ekstrakta hmelja v etanolu in olju na sobni temperaturi nekaj časa uspešno zavirali oksidacijo maščob, kar jim ni uspelo pri ekstremnih pogojih na rancimatu. Kljub temu pa lahko z gotovostjo trdimo, da sta daleč najučinkovitejša antioksidanta koncentriran ekstrakt hmelja in ekstrakt granatnega jabolka.

Inokulacijo z bakterijo *E.coli* smo prav tako zaradi preverjanja ponovljivosti izvedli dvakrat. Rezultati ponovitve so se izkazali za zelo ponovljive, zato jih nismo posebej omenjali v raziskovalni nalogi. Rezultati mikrobioloških testiranj služijo predvsem primerjavi učinkovitosti

izbranih snovi v zaviranju rasti bakterije *E.coli*. Zato izbranih snovi ne moremo označiti za učinkovite oziroma neučinkovite glede na uredbe o dovoljenih vsebnostih mikroorganizmov, ki smo jih navedli v teoretičnem delu.

Četrto hipotezo, ki pravi, da vitamin C in oba proučevana rastlinska ekstrakta tvorijo z drugimi sestavinami kreme homogene zmesi, smo lahko potrdili le delno. Pravilna se je izkazala le v primeru ekstrakta granatnega jabolka; tu je bila krema res popolnoma homogena. Vitamin C in hmeljev ekstrakt sta povzročala precejšnje težave pri izdelavi krem. Krema z vitaminom C so imele grudičasto teksturo, po kratkem času so se začele ločevati na vodno in oljno fazo. V kremah z ekstraktom hmelja DE so bila prisotna drobna zrnca, ki jih nismo uspeli popolnoma raztopiti. Torej nam v primeru teh dveh dodatkov ni uspelo izdelati homogenega vzorca.

Čeprav sta nam vitamin C in ekstrakt hmelja DE povzročala težave pri teksturi krem, bi bilo njuno vključevanje v kozmetične izdelke zanimivo za nadaljnje proučevanje. Domnevamo, da bi vitamin C pokazal boljše antioksidativne lastnosti, če bi bil v kremo vstavljen drugače. Glede na že obstoječe kozmetične proizvode z dodanim vitaminom C verjamemo, da uspešnejši načini dodajanja vitamina C v kreme že obstajajo. Seveda obstaja dvom o koncentracijah vitamina C, ki se trenutno uporabljajo v kozmetični industriji. Za preprečevanje oksidacije maščob in razrasta mikroorganizmov bi morale biti visoke in tako manj dovzetne za povezavo z drugimi snovmi v kremi.

Vsak izmed testiranih vzorcev se je vsaj delno izkazal kot protimikrobno in antioksidativno funkcionalen. Vitamin C bi se v primeru ustrežnejše metode dodajanja kremi morda izkazal za celovit konzervans, tako protimikrobno kakor antioksidativno delujoč. Ekstrakta granatnega jabolka in hmelja sta po drugi strani pokazala izstopajoče antioksidativne lastnosti in bi se lahko brez dvoma pogosteje uporabljala v kozmetični industriji. Glede na njuno slabo protimikrobno delovanje v uporabljenih koncentracijah bi lahko ta dva ekstrakta kozmetične izdelke ščitila v kombinaciji z drugimi konzervansi.

Ker so vse tri snovi pokazale protimikrobne ali antioksidativne lastnosti, se nam za nadaljnje raziskovanje zdi zelo zanimivo proučevanje potencialnih kombinacij teh treh snovi. Zanimivo bi bilo raziskati, ali je možno v kozmetične izdelke vgraditi vsaj dve od treh preiskovanih snovi in doseči sinergijo njunih lastnosti ter tako zagotoviti optimalno zaščito kreme – s protimikrobnega in antioksidativnega vidika.

## 6. PRILOGI – Rezultati meritev na napravi Rancimat

Prva meritev:

s	μS/cm	s	μS/cm	s	μS/cm	s	μS/cm	s	μS/cm	s	μS/cm	s	μS/cm	s	μS/cm
1 brez kon	0	1 brez kon	1,66253	2 s konzer	0	2 s konzer	1,54844	3 vit C 1g	0	3 vit C 1g	3,54713	7 hmelj v	0	7 hmelj v	1,60711
	12,011		1,66736		12,011		1,5581		12,011		3,53168		12,009		1,61001
	24,022		1,68185		24,022		1,56775		24,022		3,5056		24,02		1,61773
	36,033		1,69731		36,033		1,5832		36,033		3,49111		36,031		1,62932
	48,044		1,7089		48,044		1,59382		48,044		3,48918		48,042		1,64381
	60,055		1,72436		60,055		1,60926		60,055		3,49207		60,053		1,66313
	72,065		1,73692		72,066		1,62567		72,066		3,57225		72,064		1,67278
	84,076		1,74754		84,076		1,64209		84,077		3,56549		84,075		1,68824
	96,087		1,75624		96,087		1,6527		96,087		3,58288		96,086		1,69983
	108,098		1,7717		108,098		1,66332		108,098		3,59737		108,097		1,70659
	120,109		1,78812		120,109		1,67491		120,109		3,6022		120,107		1,72977
	132,12		1,80551		132,12		1,69518		132,12		3,6022		132,118		1,74425
	144,131		1,81613		144,131		1,73669		144,131		3,60703		144,129		1,75874
	156,142		1,82676		156,142		1,74731		156,142		3,6022		156,14		1,77323
	168,152		1,83159		168,153		1,75696		168,153		3,59543		168,151		1,77806
	180,163		1,84898		180,163		1,76565		180,164		3,5906		180,162		1,79061
	192,174		1,85091		192,174		1,77241		192,174		3,99246		192,173		1,7993
	204,185		1,85284		204,185		1,77917		204,185		3,99149		204,184		1,8022
	216,196		1,85767		216,196		1,79558		216,196		3,9857		216,194		1,82538
	228,207		1,85574		228,207		1,80427		228,207		3,98087		228,205		1,82442
	240,218		1,85864		240,218		1,80427		240,218		4,22913		240,216		1,82442
	252,228		1,8625		252,229		1,80523		252,229		4,24072		252,227		1,83118
	264,239		1,86154		264,239		1,82647		264,239		4,23396		264,238		1,83214
	276,25		1,86154		276,25		1,8284		276,25		4,23299		276,249		1,83697
	288,261		1,86637		288,261		1,83323		288,261		4,23396		288,26		1,8418
	300,272		1,91177		300,272		1,83419		300,272		4,39914		300,27		1,84373
	312,283		1,91563		312,283		1,84095		312,283		4,47642		312,281		1,84856
	324,293		1,92046		324,294		1,83902		324,294		4,63002		324,292		1,86595
	336,304		1,9224		336,304		1,84288		336,304		4,6503		336,303		1,87657
	348,315		1,91853		348,315		1,84964		348,315		4,78651		348,314		1,87657
	360,326		1,92626		360,326		1,84964		360,326		4,7952		360,325		1,87657
	372,337		1,93109		372,337		1,85929		372,337		4,80389		372,335		1,88526
	384,348		2,08469		384,348		1,85929		384,348		4,96135		384,346		1,88623
	396,358		2,08759		396,359		1,86026		396,359		5,20865		396,357		1,89106
	408,369		2,09048		408,369		1,87281		408,369		5,2212		408,368		1,90071
	420,38		2,09435		420,38		1,87281		420,38		5,81626		420,379		1,89975
	432,391		2,09435		432,391		1,87667		432,391		5,82302		432,389		1,9123
	444,402		2,09628		444,402		1,8786		444,402		5,82785		444,4		1,9152
	456,412		2,09918		456,413		1,88246		456,413		5,98338		456,411		1,91906
	468,423		2,10111		468,423		1,88439		468,423		6,03844		468,422		1,92389
	480,434		2,10111		480,434		1,88536		480,434		6,25385		480,433		1,92969
	492,445		2,19385		492,445		1,89115		492,445		6,38137		492,443		1,93259
	504,456		2,19482		504,456		1,90853		504,456		6,39296		504,454		2,17597
	516,466		2,19771		516,467		1,90466		516,467		6,74458		516,465		2,19722
	528,477		2,20351		528,477		1,91335		528,477		6,75424		528,476		2,20205
	540,488		2,20544		540,488		1,93459		540,488		6,77356		540,487		2,2146
	552,499		2,35518		552,499		1,93556		552,499		7,10973		552,497		2,2175
	564,51		2,48656		564,51		1,93652		564,51		7,26911		564,508		2,21847
	576,52		2,50877		576,521		1,94135		576,521		7,40049		576,519		2,22136
	588,531		2,51071		588,531		2,01085		588,531		7,61398		588,53		2,22619
	600,542		2,51264		600,542		2,01279		600,542		7,65068		600,541		2,23006
	612,553		2,61214		612,553		2,01568		612,553		7,99651		612,551		2,23006
	624,563		2,61311		624,564		2,3217		624,564		8,09504		624,562		2,23295
	636,574		2,61697		636,574		2,32653		636,575		8,48337		636,573		2,23682
	648,585		2,62083		648,585		2,32846		648,585		8,50366		648,584		2,24261
	660,596		2,6218		660,596		2,32942		660,596		8,49883		660,594		2,24551
	672,606		2,62277		672,607		2,33232		672,607		8,63407		672,605		2,24551
	684,617		2,8208		684,617		2,37673		684,617		8,88716		684,616		2,24744
	696,628		2,84495		696,628		2,41052		696,628		8,89778		696,627		2,2513

## Druga meritev:

vzorec 1 brez konzervans		vzorec 2 s konzervans		vzorec 3 vitamin		vzorec 7 hmelj v €		vzorec 8 hmelj v olj		vzorec 10 konc. grar		vzorec 11	
cas	Prevodnost	cas	Prevodnost	cas	Prevodn	cas	Prevodn	cas	Prevodnos	cas	Prevodnos	cas	Prevodnc
s	µS/cm	s	µS/cm	s	µS/cm	s	µS/cm	s	µS/cm	s	µS/cm	s	µS/cm
0	1,34958	0	1,47995	0	2,5696	0	1,3521	0	1,2823	0	2,27544	0	3,17683
12,011	1,3602	12,011	1,49831	12,011	2,5464	12,011	1,3618	12,011	1,29484	12,011	2,26479	12,011	3,19036
24,022	1,37661	24,022	1,51956	24,022	2,5058	24,022	1,3763	24,022	1,31221	24,022	2,26189	24,022	3,19617
36,033	1,39785	36,033	1,53309	36,033	2,4633	36,033	1,3927	36,033	1,32186	36,033	2,26382	36,033	3,1981
48,044	1,40943	48,044	1,54758	48,044	2,4208	48,045	1,4014	48,044	1,32572	48,045	2,27447	48,045	3,19907
60,056	1,42295	60,055	1,5582	60,055	2,385	60,056	1,4062	60,055	1,33344	60,056	2,27931	60,056	3,20583
72,067	1,43453	72,066	1,564	72,066	2,3493	72,067	1,4149	72,066	1,3373	72,067	2,28124	72,067	3,21163
84,078	1,44225	84,078	1,57656	84,078	2,3213	84,078	1,4197	84,078	1,34405	84,078	2,29189	84,078	3,21937
96,089	1,4606	96,089	1,58332	96,089	2,2894	96,089	1,4255	96,089	1,34887	96,089	2,2977	96,089	3,22614
108,1	1,46542	108,1	1,59684	108,1	2,2614	108,1	1,4294	108,1	1,3508	108,1	2,30254	108,1	3,24064
120,111	1,47701	120,111	1,60554	120,111	2,2315	120,111	1,4342	120,111	1,35659	120,111	2,31028	120,111	3,24547
132,122	1,4857	132,122	1,61133	132,122	2,2846	132,12	1,4362	132,122	1,36431	132,122	2,31609	132,122	3,2503
144,133	1,49342	144,133	1,6181	144,133	2,2614	144,13	1,4429	144,133	1,36721	144,133	2,32673	144,133	3,25707
156,144	1,50211	156,144	1,62099	156,144	2,245	156,14	1,4497	156,144	1,37493	156,144	2,33544	156,144	3,26867
168,155	1,5079	168,155	1,63259	168,155	2,245	168,16	1,4555	168,155	1,38168	168,155	2,34803	168,155	3,27737
180,166	1,51948	180,166	1,63549	180,166	2,2247	180,17	1,4593	180,166	1,3865	180,166	2,35771	180,166	3,28414
192,177	1,52141	192,177	1,64321	192,177	2,2121	192,18	1,4632	192,177	1,39229	192,177	2,37222	192,177	3,28994
204,188	1,53107	204,188	1,65867	204,188	2,1996	204,19	1,4709	204,188	1,49746	204,189	2,39642	204,189	3,30541
216,2	1,53686	216,199	1,6664	216,199	2,274	216,2	1,4758	216,199	1,50229	216,2	2,41965	216,2	3,31315
228,211	1,54072	228,21	1,66833	228,21	2,2653	228,21	1,4738	228,21	1,50615	228,211	2,45449	228,211	3,31411
240,222	1,54072	240,221	1,67606	240,221	2,2585	240,22	1,4787	240,221	1,51001	240,222	2,46901	240,222	3,32281
252,233	1,55134	252,232	1,67992	252,232	2,3165	252,23	1,4845	252,232	1,51386	252,233	2,65677	252,233	3,32958
264,244	1,55713	264,244	1,67799	264,244	2,3058	264,24	1,4816	264,244	1,51676	264,244	2,6742	264,244	3,33538
276,255	1,55906	276,254	1,68282	276,254	2,3049	276,26	1,4893	276,254	1,52158	276,255	2,67807	276,255	3,34022
288,266	1,56486	288,266	1,68862	288,266	2,2991	288,27	1,4922	288,266	1,52448	288,266	2,68194	288,266	3,35375
300,277	1,56679	300,277	1,69151	300,277	2,2971	300,28	1,4941	300,277	1,52641	300,277	2,68194	300,277	3,36245
312,288	1,56968	312,288	1,69441	312,288	3,4834	312,29	1,4951	312,288	1,53027	312,288	2,68775	312,288	3,36825
324,299	1,57548	324,299	1,69731	324,299	3,4872	324,3	1,4951	324,299	1,53027	324,299	2,68968	324,299	3,38372
336,31	1,57644	336,31	1,69924	336,31	3,4892	336,31	1,4999	336,31	1,53316	336,31	2,69065	336,31	3,39145
348,321	1,57934	348,321	1,70118	348,321	3,4959	348,32	1,5752	348,321	1,53799	348,321	2,69355	348,321	3,39629
360,332	1,5803	360,332	1,70214	360,332	3,5008	360,33	1,5781	360,332	1,53992	360,332	2,69646	360,332	3,39822
372,343	1,58802	372,343	1,70504	372,343	4,5025	372,34	1,6554	372,343	1,53895	372,343	2,69646	372,343	3,40596
384,354	1,68746	384,354	1,71277	384,354	5,4656	384,35	1,6554	384,354	1,57562	384,354	2,70517	384,354	3,40692
396,365	1,68649	396,365	1,71663	396,365	5,455	396,37	1,6602	396,365	1,57658	396,365	2,70323	396,365	3,40982
408,376	1,68842	408,376	1,71856	408,376	5,4685	408,38	1,6602	408,376	1,57658	408,376	2,78066	408,376	3,41466
420,387	1,7087	420,387	1,71856	420,387	6,6596	420,39	1,7597	420,387	1,57948	420,387	2,78453	420,387	3,41562
432,398	1,71256	432,398	1,7205	432,398	6,6828	432,4	1,8631	432,398	1,57851	432,398	2,78743	432,398	3,41949
444,409	1,71545	444,409	1,72339	444,409	6,6992	444,41	1,8717	444,409	1,58044	444,409	2,79131	444,409	3,42142
456,42	1,71642	456,42	1,73595	456,42	6,7088	456,42	1,9616	456,42	1,58141	456,42	2,98391	456,42	3,42819
468,431	1,79558	468,431	1,73788	468,431	7,3387	468,43	1,9596	468,431	1,58237	468,431	2,98875	468,431	3,43013
480,442	1,79654	480,442	1,74175	480,442	7,3725	480,44	2,0012	480,442	1,58333	480,442	2,98972	480,442	3,42916
492,453	1,83999	492,453	1,74271	492,453	7,3841	492,45	2,005	492,453	1,58237	492,453	2,99069	492,453	3,43496
504,464	1,84385	504,464	1,75914	504,464	7,3986	504,46	2,0089	504,464	1,58526	504,464	2,99069	504,464	3,59448
516,475	1,84385	516,475	1,76203	516,475	7,4111	516,48	2,1354	516,475	1,59298	516,475	2,99165	516,475	3,59641
528,486	1,87667	528,486	1,76203	528,486	8,2583	528,49	2,1383	528,486	1,59588	528,486	3,04101	528,486	3,59931
540,497	1,951	540,497	1,7688	540,497	9,2803	540,5	2,1431	540,497	1,59491	540,497	3,04585	540,497	3,60318
552,508	2,00024	552,508	1,77653	552,508	9,6146	552,51	2,1596	552,508	1,59684	552,508	3,04972	552,508	3,61381
564,519	1,99927	564,519	1,79198	564,519	9,6435	564,52	2,2716	564,519	1,59684	564,519	3,04779	564,519	3,61768
576,53	2,0514	576,53	1,79102	576,53	9,6551	576,53	2,2764	576,53	1,59877	576,53	3,05166	576,53	3,62058
588,541	2,04947	588,541	1,79391	588,541	9,6735	588,54	2,2784	588,541	1,59877	588,541	3,04972	588,541	3,62155
600,552	2,05719	600,552	1,80744	600,552	9,686	600,55	2,2774	600,552	1,59877	600,552	3,04876	600,552	3,63508
612,563	2,1016	612,563	1,81903	612,563	9,6967	612,56	2,2803	612,563	1,59781	612,563	3,29653	612,563	3,63895
624,574	2,18462	624,573	1,82193	624,573	9,7102	624,57	2,2803	624,573	1,59877	624,574	3,2975	624,574	3,64378
636,585	2,19138	636,584	1,81903	636,584	10,512	636,59	2,2812	636,584	1,59588	636,585	3,2975	636,585	3,64765
648,596	2,19234	648,595	1,81903	648,595	10,522	648,6	2,2822	648,595	1,59877	648,596	3,2975	648,596	3,64862
660,607	2,23096	660,606	1,82096	660,606	10,539	660,61	2,2822	660,606	1,59877	660,607	3,2975	660,607	3,64668
672,618	2,23482	672,617	1,81806	672,617	10,549	672,62	2,2784	672,617	1,59781	672,618	3,29943	672,618	3,65055
684,629	2,23289	684,628	1,82	684,628	10,564	684,63	2,3151	684,628	1,59684	684,629	3,29846	684,629	3,64958
696,64	2,23482	696,639	1,82483	696,639	10,579	696,64	2,3141	696,639	1,59974	696,639	3,29556	696,64	3,81974

## 7. VIRI IN LITERATURA

1. **Mežnaršič, Irena Svolfšak.** *Kozmetologija: Učbenik za predmet Kozmetologija v 2. letniku programa kozmetični tehnik.* Ljubljana : Tehniška založba Slovenije, 2005.
2. **Urad Republike Slovenije za kemikalije.** Republika Slovenija; Ministrstvo za zdravje; Urad za kemikalije. *Mikrobiološka ustreznost kozmetičnih izdelkov.* [Elektronski] [Navedeno: 29. december 2017.] [http://www.uk.gov.si/si/delovna\\_podrocja/kozmeticni\\_proizvodi/mikrobioloska\\_ustreznost\\_kozmeticnih\\_izdelkov/](http://www.uk.gov.si/si/delovna_podrocja/kozmeticni_proizvodi/mikrobioloska_ustreznost_kozmeticnih_izdelkov/).
3. **Mowad, Christen.** Allergic Contact Dermatitis Caused by Parabens: 2 Case Reports and A Review . [Elektronski] [Navedeno: 29. januar 2018.] <http://www.dr-jetskeultee.nl/jetskeultee/download/common/artikel-parabenen-contact-dermatitis.pdf>.
4. **Spletna trgovina Herbana. Konzervans Geogard 221.** [Elektronski] [Navedeno: 20. december 2017.] <http://www.herbana.si/topila-geli-in-konzervansi/114-geogard-221-konzervans-dehydroacetic-acid-benzyl-alcohol.html>.
5. **PubChem. Ascorbic acid - Pharmacology and Biochemistry.** [Elektronski] [Navedeno: 1. marec 2018.] [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/ascorbic\\_acid#section=Pharmacology-and-Biochemistry](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/ascorbic_acid#section=Pharmacology-and-Biochemistry).
6. **Wechtersbach, Dr. L. Herbana.** [Elektronski] [Navedeno: 19. januar 2018.] <http://www.herbana.si/article/3-vitamin-c-uporaba-in-delovanje>.
7. **Nivea.** [Elektronski] [Navedeno: 22. januar 2018.] <https://www.nivea.si/nivea-novosti/q10plusc>.
8. **Belinal. Kaj so polifenoli in kje se nahajajo.** [Elektronski] [Navedeno: 24. februar 2018.] <http://si.belinal.com/belinal-ekstrakt/polifenoli.html>.
9. **Science direct. Punicalagin.** [Elektronski] [Navedeno: 24. februar 2018.] <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/punicalagin>.
10. **PubChem. Punicalagin.** [Elektronski] [Navedeno: 3. marec 2018.] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/16129869#section=Top>.
11. **Pubchem. Punicalagin - Pharmacology and Biochemistry.** [Elektronski] [Navedeno: 3. marec 2018.] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/16129869#section=Pharmacology-and-Biochemistry>.
12. **Shay Yehoshua Schubert, Ephraim Philip Lansky, Ishak Neeman.** Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. [Elektronski] [Navedeno: 19. januar 2018.] <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874198002220?via%3Dihub>.



13. Wikipedija, prosta enciklopedija. *Flavonoidi*. [Elektronski] [Navedeno: 22. februar 2018.] <https://sl.wikipedia.org/wiki/Flavonoidi>.
14. Vidmajer, Janez. *Zelišča. čaji in kozmetika*. Ljubljana : Cankarjeva založba, 1980.
15. Poler, Anton. *Spoznajmo zdravilne rastline*. Ljubljana : Kmečki glas, 2015.
16. PubChem. *Xanthohumol*. [Elektronski] [Navedeno: 1. marec 2018.] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Xanthohumol#section=Top>.
17. Online Browsing Platform. *ISO 6886*. [Elektronski] [Navedeno: 3. marec 2018.] <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:6886:ed-3:v1:en>.
18. Metrohm. Metrohm: Rancimat. [Elektronski] [Navedeno: 7. januar 2018.] <https://www.metrohm.com/en-in/products/stability-measurement/rancimat/>.
19. Benzyl alcohol. *Indiamart*. [Elektronski] [Navedeno: 15. februar 2018.] <https://www.indiamart.com/proddetail/benzyl-alcohol-13110709573.html>.
20. PrepChem. *Synthesis of dehydroacetic acid*. [Elektronski] [Navedeno: 18. februar 2018.] <http://www.prepchem.com/synthesis-of-dehydroacetic-acid/>.
21. World of molecules. *Vitamin C*. [Elektronski] [Navedeno: 20. januar 2018.] <https://www.worldofmolecules.com/antioxidants/vitaminc.htm>.
22. Wikipedia. Vitamin C. [Elektronski] [Navedeno: 25. januar 2018.] [https://en.wikipedia.org/wiki/Vitamin\\_C](https://en.wikipedia.org/wiki/Vitamin_C).