

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Romana SVETLIN

**OBLIKOVANJE NEGOVALNE KREME ZA SUHO
KOŽO Z IZVLEČKOM ŽAJBLJA (*Salvia officinalis* L.)**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Romana SVETLIN

**OBLIKOVANJE NEGOVALNE KREME ZA SUHO KOŽO Z
IZVLEČKOM ŽAJBLJA (*Salvia officinalis* L.)**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

**DESIGN OF DRY SKIN CARE CREAM WITH SAGE
(*Salvia officinalis* L.) EXTRACT**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Hortikultura. Delo je bilo opravljeno na Katedri za aplikativno botaniko, ekologijo, fiziologijo rastlin in informatiko Oddelka za agronomijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani ter na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, v laboratorijih Katedre za farmacevtsko tehnologijo.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Deo Baričevič in za somentorico prof. dr. Mirjano Gašperlin.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Gregor OSTERC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: prof. dr. Dea BARIČEVIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: prof. dr. Mirjana GAŠPERLIN
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

Članica: prof. dr. Zlata LUTHAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora: . jul. 2015

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Romana Svetlin

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 635.74:633.88:665.58(043.2)
KG	žajbelj/ <i>Salvia officinalis</i> /izvleček/suha koža/ nega kože/kozmetični pripravek/transepidermalna izguba vode/hidratacija kože/ pH kože
AV	SVETLIN, Romana
SA	BARIČEVIČ, Dea (mentorica); GAŠPERLIN, Mirjana (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
LI	2015
IN	OBLIKOVANJE NEGOVALNE KREME ZA SUHO KOŽO Z IZVLEČKOM ŽAJBLJA (<i>Salvia officinalis</i> L.)
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja)
OP	XI, 46, [7] str., 11 pregl., 22 sl., 1 pril., 65 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	V magistrski nalogi smo oblikovali in kozmetično vrednotili kozmetični pripravek za vlaženje kože, s katerim smo želeli zmanjšati izhlapevanje vlage iz kože in izboljšati njeno hidratacijo. V kremo smo dodali izvleček žajblja (<i>Salvia officinalis</i> L.) kot kozmetično aktivno sestavino, zaradi poznanih pozitivnih učinkov na kožo. Razvoj našega izdelka se je v prvi vrsti pričel v laboratoriju na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani, kjer smo po Soxhletovem postopku pripravili dva različna izvlečka žajblja (<i>Salvia officinalis</i> L.), diklormetanskega (DCM) in metanolnega (MeOH). Zatem smo iz laboratorijev Biotehniške fakultete izvlečka žajblja prenesli na Fakulteto za farmacijo Univerze v Ljubljani in ju vgradili v ustrezno podlago. Klinično študijo smo izvedli z uporabo formulacij DCM in MeOH ter placebom (brez aktivne sestavine), ki smo jih podvrgli testom kozmetične učinkovitosti na 12-tih prostovoljkah. Rezultati testiranj, ki temeljijo na meritvah s pomočjo Tewametra® TM 300, Corneometra® CM 825 in Skin-pH-Metera®, so pokazali kakšna je učinkovitost izdelka glede na TEWL (transepidermalno izgubo vode), hidratacijo in pH kože. TEWL se po nanosu formulacij DCM (95 % interval zaupanja od 0,58 do 1,18 g m ⁻² h ⁻¹) in MeOH (95 % interval zaupanja od 0,52 do 1,11 g m ⁻² h ⁻¹) statistično zmanjša. Statistično značilne povečane hidracije kože za formulaciji DCM in MeOH nismo uspeli dokazati. Poleg tega nobena uporabljena formulacija ni povzročila takšnih sprememb povprečnega pH kože prostovoljk, ki bi bil izven rahlo kislega do nevtralnega pH človeške kože.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2

DC UDC 635.74:633.88:665.58(043.2)

CX sage/*Salvia officinalis*/extract/dry skin/skin care/cosmetic preparation/transepidermal water loss/skin hydration/skin pH

AU SVETLIN, Romana

AA BARIČEVIČ, Dea (supervisor) / GAŠPERLIN, Mirjana (co-supervisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy

PY 2015

TY DESIGN OF DRY SKIN CARE CREAM WITH SAGE EXTRACT (*Salvia officinalis* L.)

DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)

NO XI, 46, [7] p., 11 tab., 22 fig., 1 ann., 65 ref.

LA sl

Al sl/en

AB In our thesis we designed and cosmetically evaluated a cosmetic preparation for skin moisturizing with objectives to reduce skin moisture evaporation and improve its hydration. A sage extract was added into the cream as a cosmetic active ingredient, which is known for having positive effects on the skin. Our product development started in the laboratory of Biotechnical Faculty of the University of Ljubljana, where two different sage extracts (dichloromethane - DCM and methanol - MeOH) were prepared according to Soxhlet procedure. Afterwards both sage extracts were brought to the Faculty of Pharmacy also University of Ljubljana, and built in a suitable ointment basis. We performed a clinical study using DCM, MeOH sage extracts and a placebo, which does not contain an active ingredient. All cream samples were subjected to efficacy testing on twelve female volunteers. The results, based on evaluations with Tewameter TM30, Corneometer CM 825 and Skin-pH-Metera[®], showed product efficacy with regards to the TEWL (transepidermal water loss), hydration and skin pH values. TEWL was statistically reduced after products with DCM (at 95 % confidence interval between 0,58 – 1,18 g m⁻² h⁻¹) and MeOH sage extracts (at 95 % confidence interval between 0,52 – 1,11 g m⁻² h⁻¹) were applied. An increase of skin hydration for both extracts could not be statistically proven. None of tested creams did not cause major changes of the average skin pH value outside its normal ranges.

KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE	X
SLOVARČEK	X
1 UVOD	1
1.1 VZROK ZA RAZISKAVO	1
1.2 NAMEN RAZISKAVE	1
1.3 DELOVNA HIPOTEZA	1
2 PREGLED LITERATURE	2
2.1 KOŽA	2
2.1.1 Zgradba in fiziologija kože	2
2.1.2 Funkcije kože	3
2.1.3 Razlike v normalni in suhi koži	4
2.1.3.1 Zmanjšan delež vode	4
2.1.3.2 Zmanjšan delež medceličnih lipidov	4
2.1.3.3 Zmanjšan naravni vlažilni faktor (NMF)	4
2.1.3.4 Motena epidermalna diferenciacija	5
2.1.4 Dejavniki in značilnosti suhe kože	5
2.1.4.1 Fiziološki dejavniki	5
2.1.4.2 Patološki (bolezenski) dejavniki	5
2.1.4.3 Dejavniki okolja	5
2.1.5 Nega suhe kože	6
2.2 KOZMETIČNE SESTAVINE RASTLINSKEGA IZVORA – RASTLINSKI IZVLEČKI (EKSTRAKTI)	6
2.2.1 Žajbelj - <i>Salvia officinalis</i> L.	7
2.2.1.1 Kemična sestava	8
2.2.1.2 Uporaba	9
2.2.1.3 Zdravilni učinki	9
2.2.1.4 Kozmetična vrednost in delovanje na kožo	10
2.3 METODE ZA VREDNOTENJE UČINKOVITOSTI KOZMETIČNIH IZDELKOV	15
2.3.1 TEWL	15
2.3.2 Hidratacija kože	15
2.3.3 pH kože	16
2.3.4 Organoleptično vrednotenje kozmetičnih izdelkov	16

3	MATERIALI IN METODE	17
3.1	NABIRANJE IN SUŠENJE RASTLINSKEGA MATERIALA	17
3.2	IZDELAVA SUHIH IZVLEČKOV ŽAJBLJA	17
3.2.1	Mletje rastlinskega materiala	18
3.2.2	Izdelava tekočih izvlečkov (<i>extracta fluida</i>)	18
3.2.3	Izdelava suhih izvlečkov (<i>extracta sicca</i>)	18
3.3	IZDELAVA KREME S SUHIM IZVLEČKOM ŽAJBLJA	19
3.3.1	Postopek izdelave	20
3.3.1.1	Priprava osnovne zmesi	20
3.3.1.2	Izdelava negovalnih krem z izvlečkom žajblja	20
3.4	ORGANOLEPTIČNO VREDNOTENJE FORMULACIJ Z 10/5/ 2,5 IN 1,25 % IZVLEČKOM ŽAJBLJA	20
3.5	VREDNOTENJE KOZMETIČNE UČINKOVITOSTI FORMULACIJ Z 2,5 % IZVLEČKOM ŽAJBLJA	21
3.5.1	Parametri za izvedbo klinične študije	22
3.5.2	Prostor in protokol študije	22
3.5.3	Aparature za izvedbo klinične študije	23
3.5.4	Meritev TEWL s Tewametrom® TM 300	23
3.5.4.1	Postopek merjenja s Tewametrom® TM 300	24
3.5.5	Meritev hidratacije kože s Corneometrom® CM 825	25
3.5.5.1	Postopek merjenja s Corneometrom® CM 825	25
3.5.6	Meritev pH kože s Skin-pH-Metrom®	26
3.5.6.1	Postopek merjenja s Skin-pH-Metrom®	27
3.6	STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV	27
4	REZULTATI	28
4.1	VIDEZ SUHIH IZVLEČKOV ŽAJBLJA	28
4.2	ORGANOLEPTIČNA OCENA FORMULACIJ Z 10/ 5/2,5 IN 1,25 % IZVLEČKOM ŽAJBLJA	28
4.3	TEWL PO NANOSU FORMULACIJ	29
4.4	HIDRATACIJA KOŽE PO NANOSU FORMULACIJ	31
4.5	pH KOŽE PO NANOSU FORMULACIJ	34
5	RAZPRAVA	37
5.1	ORGANOLEPTIČNE LASTNOSTI FORMULACIJ	37
5.2	SPREMEMBA TEWL	37
5.3	SPREMEMBA HIDRATACIJE KOŽE	38
5.4	SPREMEMBA pH KOŽE	38
6	SKLEPI	40
7	POVZETEK	41
8	VIRI	42
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	Str.
Preglednica 1: Priprava formulacij s koncentracijami 10, 5, 2,5 in 1,25 g/100 g kreme	20
Preglednica 2: Sestava za končnih 100 g: krema DCM, krema MeOH, placebo.....	21
Preglednica 3: Interpretacija vrednosti TEWL, izmerjenih z aparaturo Tewameter® TM 300 (Courage + Khazaka, 2003a).....	24
Preglednica 4: Interpretacija vrednosti hidratacije kože, izmerjenih z aparaturo Corneometer® CM 825 (Courage + Khazaka, 2003b).....	25
Preglednica 5: Organoleptično vrednotenje formulacij, ki se razlikujejo po deležu izvlečka žajblja	28
Preglednica 6: Povprečne vrednosti in standardne napake TEWL pred nanosom ter 30 in 60 min po nanosu posamezne formulacije. Rezultati so podani kot povprečje meritev na 12-tih prostovoljkah.....	30
Preglednica 7: Analize variance (ANOVA) za povprečen TEWL ($\text{g m}^{-2} \text{h}^{-1}$). Vrednost p podaja statistično značilnost rezultata.....	31
Preglednica 8: Povprečne vrednosti in standardne napake hidratacije kože pred nanosom ter 30 in 60 min po nanosu posamezne formulacije. Rezultati so podani kot povprečje meitev na 12-tih prostovoljkah	32
Preglednica 9: Analize variance (ANOVA) za povprečno hidratacijo kože. Vrednost p podaja statistično značilnost rezultata.....	33
Preglednica 10: Povprečne vrednosti in standardne napake pH kože pred nanosom ter 30 in 60 min po nanosu posamezne kreme. Rezultati so podani kot povprečje meritev na 12-tih prostovoljkah.....	35
Preglednica 11: Analize variance (ANOVA) za povprečen pH kože. Vrednost p podaja statistično značilnost rezultata.....	36

KAZALO SLIK

	Str.
Slika 1: Shematski prikaz treh plasti kože (cit. po Lackovič ..., 2015)	2
Slika 2: Nadzemni del in cvet žajblja (<i>Salvia officinalis</i> L.) (cit. po Sage ..., 2006).....	8
Slika 3: Nabiranje svežih rastlin žajblja (<i>Salvia officinalis</i> L.) (foto: Svetlin, 2014).....	17
Slika 4: Shematski prikaz Soxhletovega aparata (prirejeno po Soxhlet extractor ..., 2015) (levo) in potek ekstrakcije žajblja (<i>Salvia officinalis</i> L.) s Soxhletovim aparatom (foto: Svetlin, 2014).....	18
Slika 5: Uparjanje topila z rotacijskim vakuumskim uparjevalnikom (rotavapor Büchi) (foto: Svetlin, 2014)	19
Slika 6: Shema predelave svežih rastlin žajblja v suhi ekstrakt žajblja (prirejeno po Baumgartner in Zvonar, 2013).	19
Slika 7: Organoleptično vrednotenje formulacij, ki se razlikujejo po deležu DCM izvlečka žajblja (foto: Svetlin, 2015).....	21
Slika 8: Organoleptično vrednotenje formulacij, ki se razlikujejo po deležu MeOH izvlečka žajblja (foto: Svetlin, 2015).....	21
Slika 9: Označena področje nanosa krem na obeh podlakteh: DCM (levo označeno mesto), MeOH (na sredini označeno mesto in placebo (desno označeno mesto) (foto: Svetlin, 2015).....	22
Slika 10: Tewameter® TM 300.....	23
Slika 11: Meritev TEWL s Tewametrom® TM 300 (foto: Svetlin, 2015).....	24
Slika 12: Corneometer® CM 825.....	25
Slika 13: Meritev hidratacije kože s Corneometrom® CM 825 (foto: Svetlin, 2015)	26
Slika 14: Skin-pH-Meter®	26
Slika 15: Suhi DCM izvleček žajblja (levo) in suhi MeOH izvleček žajblja (desno) (foto: Svetlin, 2014).....	28
Slika 16: Vizualni zgled formulacij z 2,5 % DCM (levo) in 2,5 % MeOH (desno) izvlečkom žajblja (foto: Svetlin, 2015)	29
Slika 17: Grafični prikaz TEWL ($\text{g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$) po različnih ravneh proučevanih dejavnik- ov, meritve na istih prostovoljkah na istih mestih v treh časih so povezane s črto	29
Slika 18: Grafični prikaz povprečnega TEWL ($\text{g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$) vseh 12-tih prostovoljk po obravnavanjih in njihove standardne napake	30
Slika 19: Grafični prikaz hidratacije kože po različnih ravneh proučevanih dejavnik- ov, meritve na istih prostovoljkah na istih mestih v treh časih so povezane s črto	32
Slika 20: Grafični prikaz povprečne hidratacije kože vseh 12-tih prostovoljk po obravnavanjih in njihove standardne napake	33
Slika 21: Grafični prikaz pH kože po različnih ravneh proučevanih dejavnikov, meritve na istih prostovoljkah na istih mestih v treh časih so povezane s črto	34
Slika 22: Grafični prikaz povprečnega pH kože vseh 12-tih prostovoljk po obravnavanjih in njihove standardne napake	35

KAZALO PRILOG

Priloga A: Podatki klinične študije meritev TEWL, hidracije in pH kože

OKRAJŠAVE

DCM	Diklormetan
EA	<i>Extracta aquosa</i> (vodni izvlečki)
EF	<i>Extracta fluida</i> (tekoči izvlečki)
EMEA	Evropska agencija za zdravila
MeOH	Metanol
ND	Nano delec
NMF	Natural moisturizing factor (naravni vlažilni faktor)
NO	Dušikov oksid
RA	Rosmarinic acid (rožmarinska kislina)
ROS	Reaktivne kisikove zvrsti
SC	<i>Stratum corneum</i> (rožena plast)
UV	Ultravijolična svetloba
TEWL	Transepidermal water loss (transepidermalna izguba vode)

SLOVARČEK

Astringensi, antiseptiki – sredstva, ki koagulirajo površinske (kožne, sluznične) beljakovine in zaustavljajo manjše krvavitve ali delujejo protimikrobno

Antioksidanti – snovi, ki lahko učinkovito upočasnijo radikalske reakcije tako, da stabilizirajo že nastale radikale ali kako drugače zmanjšajo vrednost za tvorbo novih radikalov in reaktivnih kisikovih zvrsti

Edem – otekline oz. nabiranje tekočine med celicami

Metaloproteaze – encimi v zunajceličnem matriksu

Oksidativni stres – vrsta "kemičnega stresa", ki je prisoten v živih organizmih zaradi povečane količine potencialno škodljivih agensov, t.i. reaktivnih kisikovih zvrsti – ROS (angl. reactive oxygen species)

Eksikator – priprava, v kateri shranjujemo posušene preparate

Rastlinske droge – posušene rastline ali rastlinski deli, v stanju, sposobnem za vskladiščenje, kot npr. herba-, folium-, flos-, semen-, ali radix-droge

Ekstrakt – izvleček

Tirozinaza – ključni encim melanogeneze, ki pretvori tirozin preko 3,4-dihidroksi-fenilalanin (DOPA) v dopakinon, ki se v nadaljnjih reakcijah pretvori končno v oligomere melanina

1 UVOD

1.1 VZROK ZA RAZISKAVO

Vsakdo si prizadeva, da bi z rojstvom dano lepoto ohranjal skozi vse življenje. Otroci, ki so zdravi imajo v resnici lepo kožo, ta je nežne barve in mehka ob dotiku. Toda koža kmalu izgubi barvni videz breskve, najprej v obdobju najstništva, ima večina težav zaradi aken, nato se začne staranje kože in pojav prvih gubic. Staranje kože ne prinaša samo gub, ampak običajno opazimo tudi izgubo elastičnosti in suhost. Čeprav je bila suha koža v preteklosti predvsem težava starejših žensk, se danes s to težavo soočajo tudi mladi in moški. Suha koža je na videz bolj bleda in brez sijaja ob dotiku pa tanka in groba.

Za pravilno delovanje kože, ta potrebuje dodatno skrb in ustrezno nego. Pri tem si lahko zelo dobro pomagamo tudi s številnimi zelo cenjenimi in starimi zdravilnimi rastlinami, ki so prav posebne zaveznice kože. Lahko jo negujejo hkrati od znotraj, na primer v obliki čajev in od zunaj v obliki pripravkov, kot so na primer ekstrakti (izvlečki), eterična olja, rastlinska maščobna olja, iztisnjen sok in uprašene ali zdrobljene rastlinske droge, ki jih lahko vključujemo v kozmetične izdelke kot aktivne sestavine.

Po svoji izjemno zdravilni moči in ugodnih učinkih na kožo slovi tudi žajbelj (*Salvia officinalis* L.). To ustnatico sredozemskega porekla so uporabljali že Hipokrat, Dioskorides in Galen, v pozabo pa ni šel niti danes, saj raziskovalci ves čas težijo k temu, da bi tudi za kozmetične namene odkrili čim več njegovih učinkovitih aktivnih sestavin.

Dosedanje raziskave so pokazale, da ima žajbelj (*Salvia officinalis* L.) pozitivne učinke na kožo v smislu UV absorpcije (Lee in sod., 2011), antioksidativnih lastnosti (Barbinta-Patrascu in sod., 2013; Cuvelier in sod., 1994; Kennedy in Scholey, 2006; Lee in sod., 2011; Masuda in sod., 2002; Nickvar in sod., 2007), vplivom na melanogenezo (Oliveira in sod., 2012) in metaloproteaze (Offord in sod., 2002). Raziskovalci poročajo tudi o protivnetnem (Baričević in sod., 2001; Ehrnhöfer-Ressler in sod., 2013; Lee in sod., 2011; Flavex Natur ..., 2013), protibakterijskem (Celi Garcia in sod., 2012; Lee in sod., 2011) in proti-glivičnem (Abu-Darwish in sod., 2013) delovanju. Ni pa še bila natančno raziskana zveza med izvlečkom žajblja (*Salvia officinalis* extractum) na izhlapevanje vlage in hidratacijo kože. V tej zvezi je pomemben še tretji, prav tako neraziskan dejavnik in sicer povezanost aplikacije pripravkov z izvlečkom žajblja s pH kože.

1.2 NAMEN RAZISKA VE

Namen zastavljene magistrske naloge je bil oblikovati in kozmetično vrednotiti kozmetični pripravek za vlaženje kože, s katerim smo želeli zmanjšati izhlapevanje vlage iz kože in izboljšati njeno hidratacijo. V kremo bi dodali tudi izvleček žajblja (*Salvia officinalis* L.) kot kozmetično aktivno sestavino.

1.3 DELOVNA HIPOTEZA

V magistrskem delu smo želeli preveriti naslednje hipoteze:

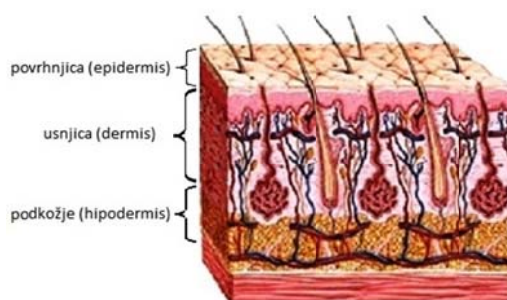
- izvleček žajblja zmanjša transepidermalno izgubo vode (TEWL),
- izvleček žajblja izboljša hidratacijo kože,
- izvleček žajblja ohranja rahlo kisel do nevtralen pH kože.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 KOŽA

2.1.1 Zgradba in fiziologija kože

Koža je največji organ človeškega telesa, ki je v povezavi z drugimi organi bistvena za nemoteno delovanje celotnega organizma. Površina kože odraslega človeka znaša okrog 1,8 m², teža okrog 10 – 12 kg. V grobem kožo sestavljajo tri plasti – povrhnjica (epidermis), usnjica (dermis) in podkožje (subcutis) ter kožni priveski (žleze lojnice, žleze znojnice, dlake in nohti) (Bartenjev in Rogl Butina, 2011).



Slika 1: Shematski prikaz treh plasti kože (cit. po Lackovič ..., 2015)

Epidermis je sestavljen predvsem s keratinociti in melanociti ter Langerhansovimi celicami. Keratinociti vsebujejo keratinske proteine, ki sestavljajo večino suhe celične mase. Melanociti proizvajajo melanin in ščitijo kožo pred ultravijolično (UV) svetlobo. Langerhansove celice so prosto gibljive in pomembne za razpoznavanje ter odstranjevanje tujih beljakovin – alergenov (Kristl ..., 2015).

Epidermis je najtanjša plast kože, debeline od 100-150 µm, ki jo delimo na štiri plasti – bazalna plast (*stratum basale*), trnasta plast (*stratum spinosum*), zrnata plast (*stratum granulosum*) in rožena plast (*stratum corneum*). Najbolj spodnja plast povrhnjice je bazalna plast, ki z delitvijo celic in njihovim premikanjem navzgor omogoča, da se koža nenehno obnavlja. Pri premiku proti površini kože celice spreminjajo svojo obliko. Celice najprej pridejo v *stratum spinosum* in od tod pot nadaljujejo do *stratum granulosum*. V *stratum granulosum* pride do glavnih sprememb, celice izgubijo jedra, membrane postanejo bolj sploščene. Po prehodu celic na površino kože sledi faza odmiranja in luščenja celic. Po 26- do 42 dnevih jih zamenjajo nove celice iz bazalne plasti. Proces luščenja celic imenujemo deskvamacija, odmirajoče celice pa korneociti. Korneociti so sploščene celice brez jedra, napolnjene s filamenti keratina in higroskopskimi snovmi, obdane pa z epidermalnimi maščobami (kožni lipidi), ki na površini kože tvorijo zunanjo oz. roženo plast - *stratum corneum* (Bartenjev in Rogl Butina, 2011; Bolko, 2012; Leskovar, 2007).

Za ohranjanje ustrezne količine vlage v koži so najpomembnejše higroskopne spojine – humektanti (aminokisline, laktat, sečnina in elektroliti), ki tvorijo tako imenovani naravni vlažilni dejavnik (NMF, natural moisturizing factor) v korneocitih. Glavna naloga NMF-ja je, da privlači vodo iz zraka in roženi plasti omogoča ustrezno hidratiranost. Poleg

zadostne hidratiranosti skrbi za kisli plašč kože (pri nastajanju NMF-ja se tvori veliko amonijaka, ki difundira iz kože in pušča za sabo večjo količino kislin) in nudi zaščito pred mikroorganizmi (Bolko, 2012; Barel in sod., 2006).

Poleg NMF-ja so za ohranjanje ustrezne količine vlage v koži pomembni lipidi. Tako korneocite v roženi plasti obdajajo predvsem ceramidi (50 %), holesterol (25 %) in maščobne kisline (10 %), trigliceridi, glikosfingolipidi ter sulfat pa le v sledovih. Korneociti, ki predstavljajo "opeke" skupaj z lipidi, ki predstavljajo "cement" sestavljajo skoraj vodoodporno pregrado (bariero), ki preprečuje izhlapevanje vode iz organizma in ga varuje pred vdorom tujih snovi (Bolko, 2012). Model opek v zidu koži zagotavlja ustrezno integriteto in hidratiranost.

Dermis sestavljajo celice fibroblasti, kolagenska vlakna in elastična vlakna. Med njimi najdemo limfatičen splet in krvne žile, ki so bistvene za dovajanje hranilnih snovi in kisika v epidermis. Dermis v splošnem delimo na papilarno plast in pod njo ležečo retikularno plast. Papilarna plast se stika z epidermisom in je tanka. Retikularna plast je debelejša. V njej fibroblasti proizvajajo kolagen, elastin in glikozaminoglikane. Kolagen in elastin koži dajeta prožnost, med tem ko glikozaminoglikani (mukopolisaharidi) omogočajo vezavo vode (Bartenjev in Rogl Butina, 2011; Leskovar, 2007). Hialuronska kislina (HA) je glavna predstavnica skupine glikozaminoglikanov (Koračin ..., 2015).

Glikozaminoglikani se vežejo s proteinoidnim ogrodjem vezivnega tkiva v tako imenovane proteoglikane. Ti so sposobni vezave vodnih molekul in omogočajo ustrezno hidracijo kože. Poleg tega proteoglikani ustvarjajo ustrezen volumen medceličnine in tako skrbijo za visoko notranjo napetost (turgor) kože, kar je pomembno s stališča zmanjšanja nastanka gubic. Glikozaminoglikani so podvrženi stalnemu nastajanju in razgradnji, med tem ko se kolagen obnavlja samo, kadar je to potrebno, na primer v primeru poškodbe kože (Koračin ..., 2015).

Podkožje ali subcutis je sestavljen iz maščevja, ki je obdano z vezivom. Gre za najdebelejši del kože (odvisno od mesta in prehranjenosti), ki ščiti organizem pred izgubo toplote (termoizolator) in uravnava telesno temperaturo. Poleg tega zaradi svoje gibljivosti nudi zaščito globljim organom pred mehanskimi udarci (Bartenjev in Rogl Butina, 2011; Leskovar, 2007).

2.1.2 Funkcije kože

Zaščitna vloga je osnovna naloga kože, ki omogoča človeškemu organizmu normalno delovanje. Idealna je za zaščito pred mehanskimi (pritisk, udarec, padec) in kemijskimi dejavniki, pred izhlapevanjem (funkcija rožene pregrade) in UV sevanjem. Ključna je za imunsko zaščito in zaščito pred vdorom mikroorganizmov (kisli pH kože). Poleg zaščitne vloge ima sekretorno vlogo, pomembno pri izločanju tudi nekaterih toksičnih snovi (znojnice in lojnice) in ohranjanju stalne telesne temperature (termoregulacija). Koža je tudi čutilni organ (vloga Merkllovih celic), ki reagira na morebitne škodljive vplive in ne nazadnje omogoča izločanje ter tvorbo vitamina D (Bartenjev in Rogl Butina, 2011; Leskovar, 2007).

2.1.3 Razlike v normalni in suhi koži

2.1.3.1 Zmanjšan delež vode

Normalen *stratum corneum* vsebuje relativno velik delež vode, kar pomeni med 20 in 35 %. Če se voda v koži skozi daljše obdobje hitreje izgublja kot je dotok vode iz spodnjih plasti povrhnjice, lahko vsebnost vode v roženi plasti pade celo pod 10 %. Takrat je cikel menjave celic moten, saj encimi v takem stanju niso več sposobni odstranjevati odmrlih celic. Koža postane dehidrirana, izgubi svojo prožnost, začne se fino luščenje povrhnjice in pojavi se stanje suhe kože (Bolko, 2012; Oyedeji in Okeke, 2010; Proksch in Lachapelle, 2005).

2.1.3.2 Zmanjšan delež medceličnih lipidov

Raziskovalci poročajo, da je stanje suhe kože pogosto povezano s pomanjkanjem kožnih lipidov. Za pravilno sestavo lipidov, ki obdajajo korneocite, so zlasti pomembni ceramidi, holesterol in maščobne kisline. Pomanjkanje katere izmed teh sestavin se kaže v povečani izgubi vode (transepidermal water loss – TEWL) in tudi z dobro opaznimi spremembami ultrastrukturnih lastnosti lipidnih zunajceličnih domen. Te barierne okvare sprožijo epidermalno hiperproliferacijo kot tudi pripeljejo do suhe in hrapave kože (Kristl ..., 2015).

Spoznanje, da ima suha koža občutno manjšo vsebnost ceramidov v primerjavi z normalno kožo sta med drugimi s klinično študijo dokazala Proksch in Lachapelle (2005), ki zmanjšano sintezo ceramidov v *stratum corneum* prepisujeta strukturni spremembi lipidne pregrade, motnjam v diferenciaciji keratinocitov in zmožnosti večjega vnetnega odziva.

Dejstvo, da k ustrezni negi kože sodi tudi skrb za ohranitev primerne nivoja medceličnih lipidov v koži pojasnjuje tudi študija Machado in sod. (2007), objavljena v reviji *Cosmetic Dermatology*. V študiji so z namenom preprečevanja stanja suhe kože oblikovali stabilne voda-v-olju (v/o) emulzije, obogatene z olji z visokim odstotkom maščobnih kislin, steroli, vitamini, holesterolom in ceramidi v enakem razmerju, kot je razmerje lipidov v *stratum corneum in vivo*. Izdelani sta bili dve emulziji z maščobnimi kislinami in holesterolom, ena od njiju je dodatno vsebovala ceramide. Rezultati *in vivo* testov so nato pokazali, da sta obe emulziji bistveno povečali količino sebuma v koži in izboljšali hidratacijo kože. Obe opisani emulziji sta pokazali biološko učinkovitost pri normalni koži, kar kaže na možnost preprečevanja nastanka suhe kože z ustrezno sestavo in ustreznim razmerjem zmesi lipidov, ki je podobno sestavi in razmerju lipidov v roženi plasti. Dodatno večji vpliv na hidratacijo kože je bil opazen pri uporabi emulzije z vsebnostjo ceramidov. Razlog je verjetno prav prisotnost ceramidov v tej emulziji. Ceramidi so ključni za organizacijo lipidov v *stratum corneum*, holesterol pa olajša medsebojno strukturiranje različnih lipidov (Kristl ..., 2015).

2.1.3.3 Zmanjšan naravni vlažilni faktor (NMF)

Zmanjšan NMF (notranji dejavnik) v koži se kaže zlasti v zmanjšani prisotnosti filagrina (protein, iz katerega nastajajo proste aminokisline) in vsebnosti prostih aminokislin v *stratum corneum*, predvsem pri suhi koži starejših. Pomanjkanje zračne vlage vpliva na manjšo proizvodno prostih aminokislin ter večjo nagnjenost k nastanku suhe kože (Barel in sod., 2006).

2.1.3.4 Motena epidermalna diferenciacija

Epidermalna diferenciacija je proces, povezan s proizvodnjo keratina in ceramidov v *stratum basale* ter z NMF-jem. Ob moteni epidermalni diferenciaciji je nastanek suhe kože skoraj neizogiben (Proksch in Lachapelle, 2005).

2.1.4 Dejavniki in značilnosti suhe kože

Različni dejavniki, kot so fiziološki, patološki (bolezenski) in dejavniki iz okolja lahko oslabijo pregrado kože in koža se lahko izsuši.

Za suho kožo je značilno, da je na videz bolj bleda, brez sijaja in luskasta ob dotiku pa groba (hrapava) in manj elastična. Daje občutek suhosti, zbadanja in zategovanja, včasih srbeča. Huda oblika se lahko razvije v ekcem, z rdečico in tvorbo razpok.

2.1.4.1 Fiziološki dejavniki

Stanje suhe kože se lahko pojavi v vseh starostnih obdobjih, vendar so običajno znaki suhe kože pri starostnikih pogostejši. Ta izjava je v skladu z raziskavo Proksch in Lachapelle (2005), katera sta primerjala kožo starejših in kožo mladostnikov. Opazila sta, da je pri koži starejših občutno zmanjšana sposobnost delitev celic oz. epidermalna proliferacija in manjša vsebnost kolagena. Koža starostnikov je sposobna proizvajati manj sebuma¹ in ceramidov ter je slabše elastična. Pojav stanja suhe kože je s tem razlogom pri starejših pogostejši kot pri mladostnikih.

2.1.4.2 Patološki (bolezenski) dejavniki

Stanje suhe kože je lahko posledica motenj delovanja sistema, odgovornega za obnavljanje kože. Moteno obnavljanje kože je lahko posledica bolezni kože (ihtioza, dermatitis, luskavica) ali bolezni organizma (sladkorna bolezen, odpoved ledvic ali motnje delovanja ščitnice).

2.1.4.3 Dejavniki okolja

Raznovrstni okoljski dejavniki, kot so veter, mraz, sonce, mila, čistila, organska topila in nizka zračna vlaga, nemalokrat oslabijo epidermalno pregrado in so pogosto odgovorni za nastanek suhe kože.

Zmanjšano hidratacijo kože že dolgo časa povezujejo z nizko zračno vlago in nizkimi temperaturami, značilnih v zimskem obdobju. Podobno stanje je opazno tudi v poletnih mesecih, ko ljudje veliko svojega časa preživimo v hladnih klimatiziranih prostorih. Stanju suhe kože se težko izognemo tudi v primeru daljšega zadrževanja v prostorih s suhim in vročim zrakom (npr. sodobno centralno ogrevanje) (Proksch in Lachapelle, 2005).

Kaj pa izpostavljenost soncu? Sončni žarki so bistveni za življenje na Zemlji, vendar so raziskovalci ugotovili, da je prekomerno izpostavljanje sončnim žarkom lahko tudi nevarno. Prekomerno izpostavljanje sončnim žarkom se kaže predvsem v zadebeljeni in

¹¹ Sebum je holokrini produkt žlez lojnic, kateri se izlivajo v zg. del lasnega mešička.

suhi koži, povečanem nastanku gub, motenj v pigmentaciji in večji verjetnosti za pojavnost kožnega raka (Proksch in Lachapelle, 2005; Vovk, 2012).

Za stanje suhe kože so pomembno odgovorni tudi dejavniki, povezani s posameznikovim življenjskim slogom. Dnevna izpostavljenost cigaretne dimu, pogost stik z mili, čistili ali organskimi topili ter drugimi iritanti (npr. okoljski onesnaževalci) so pogost vzrok za oslABLJENO roženo pregrado in povečano difuzijo vode skozi kožo navzven.

Velja omeniti tudi to, da je vzrok za stanje suhe kože lahko tudi nepravilno ravnanje in nega kože. To se kaže ob prepogostem stiku z vodo in preveliki uporabi agresivnih mil v povezavi s prepogostim umivanjem, zlasti pri sodobnih, skrbno urejenih ženskah in športnikih. S tem lahko bistveno vplivamo na nepravilno delovanje kože (Kristl ..., 2015; Proksch in Lachapelle, 2005; Tlaker Žunter ..., 2015).

2.1.5 Nega suhe kože

Suha koža je stanje kože, ki se pojavi in zopet lahko izzveni ob pravilnem ravnanju in ustrezni negi. Ohranjanje normalnega stanja kože je priporočljivo tako iz estetskih kot zdravstvenih razlogov. Način s katerim lahko ustrezno negujemo in ohranjamo normalno stanje kože je tudi uporaba negovalnih kozmetičnih proizvodov.

Zakon o kozmetičnih proizvodih (Zakon ..., 2013) opredeljuje kozmetični proizvod kot katerokoli snov ali pripravek v končni obliki, namenjen nanašanju na zunanje dele človeškega telesa (povrhnjico, lasišče, nohte, ustnice ali zunanja spolovila) ali na zobe in sluznico v ustni votlini, z izključnim ali glavnim namenom, da jih očisti, odišavi ali zaščiti, jih ohrani v dobrem stanju, spremeni njihov izgled ali odpravi neprijeten telesni vonj.

Primarni cilj kozmetičnega izdelka (KI), namenjenega negi suhe kože, je z izbiro primernih sestavin, vplivati na izhlapevanje vode s površine kože (TEWL), izboljšati delež vode v SC ter izboljšati vsebino kožnih lipidov (Bolko, 2012).

Uporabo ustreznih negovalnih KI se priporoča vsakemu, saj le zadosti hidratirana koža lahko opravlja njene funkcije, ohranja njeno čvrstost ter elastičnost (Barel in sod., 2006).

Če ustrezno negujemo kožo, se nam ni treba bati, kaj nam bodo dejavniki tveganja prinesli.

2.2 KOZMETIČNE SESTAVINE RASTLINSKEGA IZVORA – RASTLINSKI IZVLEČKI (EKSTRAKTI)

Ekstrakti so tekoči (tekoči ekstrakti in tinkture), poltrdni (gosti ekstrakti in oljne smole) ali trdni (suhi ekstrakti) pripravki, pridobljeni iz rastlinskih drog ali živalskih materialov, ki so običajno posušeni (Formularium Slovenicum, 2011).

Rastlinski izvlečki (ekstrakti) so snovi, pridobljene z ekstrakcijo rastlinskih drog, ki jih v kozmetičnih izdelkih dodajamo zato, da povečamo kozmetični učinek (Benaiges in Guillen, 2007).

Vedenje o učinkih rastlinskih izvlečkov na telo temelji na spoznanjih zgodovinske tradicije in ljudske medicine. Že Indijke so uporabljale za nego kože zelišča kot so sandalovina in

kurkuma, kano za barvanje las, dlani in podplatov (Ramasamy, 2011). Sčasoma so poleg že tradicionalno opisanih in poznanih sredstev v proizvodnjo izdelkov za kozmetično nego uvedli tudi moderne pristope. Danes rastlinske izvlečke uporabljajo predvsem na osnovi spoznanj raziskovalcev o specifičnem delovanju aktivnih spojin. Na kožo delujejo astringentno, protimikrobno, pomirjevalno, protivnetno, lovijo proste radikale, stimulirajo prekrvavitev, kožo obarvajo, zavirajo procese staranja, jo vlažijo idr. (Benaiges in Guillen, 2007; Oyedeji in Okeke, 2010).

Za izdelavo rastlinskih izvlečkov lahko uporabimo različne metode in ustrezna organska topila (voda npr. za ekstrakcijo polarnih snovi, etanol za lipofilne, zmes vode in etanola za tako hidrofilne kot lipofilne snovi), ki ustrezajo vsem zadevnim monografijam v Farmakopeji (Formularium Slovenicum, 2011). Osnovni metodi, ki se uporabljata za izdelavo rastlinskih izvlečkov v kozmetični industriji, sta maceracija in perkolacija (Benaiges in Guillen, 2007).

Za kakovostno in uspešno izdelavo rastlinskih ekstraktov se je potrebno držati strogih pravil. Ključni dejavniki pri zagotavljanju ustrezne kakovosti in stabilnosti kozmetičnih izdelkov so vir in kakovost materiala, dobra kmetijska praksa (GAP) ter postopek izdelave (Rajkot, 2010). Dejavniki kot so uporaba svežih rastlin, starost in rastlinski del, čas ter metoda nabiranja, temperatura, izpostavljenost svetlobi, dostopnost vode, hranilne snovi, sušenje, pakiranje, transport surovega materiala in shranjevanje lahko vplivajo na kakovost in kozmetično vrednost kozmetičnih pripravkov rastlinskega izvora.

Posamezni strokovnjaki za področje kozmetologije dosledno zagovarjajo stališče, da farmacevtskih izvlečkov (ekstraktov) za namene zdravljenja ne moremo enačiti s tistimi za uporabo v kozmetične (torej negovalne) namene. Poudarjajo stališče, da morajo rastlinski ekstrakti za uporabo v kozmetičnih izdelkih ustrezati po barvi in vonju ter se ne smejo obarjati. Kar zadeva vsebnost kozmetično učinkovitih spojin v ekstraktih, bi le te morale biti tudi kvantitativno določene tudi za uporabo v kozmetičnih izdelkih. Ponovljivost ekstrakcije in stabilnost ekstrahiranih učinkovin sta ključna dejavnika za zagotavljanje kakovosti. Zaradi želje, da bi bili kozmetični izdelki dokazano varni in učinkoviti, bodo morali proizvajalci vanje dodajati standardizirane ekstrakte z definirano koncentracijo kozmetično aktivnih spojin, zagotovljeno stabilnostjo, ob ustreznem videzu in galenskih lastnostih ekstrakta (Šmid-Korbar in Kristl, 1998).

2.2.1 Žajbelj - *Salvia officinalis* L.

Žajbelj (*Salvia officinalis* L.) je rastlina, razširjena po hribovitih območjih Sredozemlja, Dalmacije, Črne gore, Hercegovine, od koder se je razširil v srednjo Evropo, pri nas izjemno dobro uspeva na kraškem območju v okolici Kozine in Petrinja (Baričevič, 1996; Wagner, 1980). Danes so največje pridelovalke droge Italija, Rusija in Severna Amerika. Iz naravnih rezervoarjev pa ga je moč dobiti v Grčiji in Turčiji (Baričevič, 1996). Žajbelj pripada družini Lamiaceae (ustnatice), v najštevilčnejši rod *Salvia* (kadulja). V rodu *Salvia* je namreč okoli 900 vrst. So enoletnice, trajnice in polgrmi. *Salvia* raste na sončnih legah, kot so suhi ali vlažni travniki in skalnata pobočja. Žajbelj je pokončna lesnata trajnica v obliki polgrma. Ima močne, globoke korenine, iz katerih zraste veliko število stebel, od 30 do 60 centimetrov visoko. Stebla so štiriroba, prekrita z dlačicami in pri dnu olesenela. Listi so sivi do srebrno-sivi, dolgi in ovalne oblike. Nasprotni listi so debeli, pecljati in

zaradi močno izraženih mrežastih žil nekoliko nagubani. Na vrhu stebela se od junija do julija v vretencih pojavi svetlo do modro-vijoličasto socvetje, ki se odpira postopno, od spodaj navzgor. Rastlina ima prijeten aromatičen vonj (Strzalka in sod., 2011; Wagner, 1980).



Slika 2: Nadzemni del in cvet žajblja (*Salvia officinalis* L.) (cit. po Sage ..., 2006)

2.2.1.1 Kemična sestava

2.2.1.1.1 Eterično olje

Eterično olje je glavna aktivna sestavina žajblja. Posušeni listi ga v povprečju vsebujejo od 1 – 3 % (Baričevič, 1996; BHMA ..., 2006). Po navedbah *European Pharmacopoeia* (Ph. Eur., 2008) morajo celi listi *Salvia officinalis* L. vsebovati eteričnega olja vsaj 15 mL kg⁻¹, v posušenih zdrobljenih listih mora biti njegova vsebnost vsaj 10 mL kg⁻¹. Glavne hlapne sestavine eteričnega olja so α -tujoni in β -tujoni (35 – 60 %) in drugi monoterpeni (do 20 %), predvsem 1,8-cineol ter seskviterpeni, kot α -pinen in kafa (Baričevič, 1996; BHMA ..., 2006).

2.2.1.1.2 Fenolne spojine

Izvleček iz listov žajblja vsebuje veliko različnih skupin fenolnih spojin. Največji delež predstavljajo vodotopne fenolne kisline, vključujoč rožmarinsko kislino, *p*-kumarno, ferulno kislino, galno kislino in kavno kislino, ki imajo močno antioksidativno delovanje. Raziskovalci poročajo tudi o protivnetnem, protimikrobnem in protivirusnem delovanju. Dokazali so tudi, da stabilizirajo membrane in preprečujejo poškodbe, ki jih povzroča UV sevanje (Leskovar, 2007; Lovrec, 2009). Tem sledijo fenolni diterpeni, ki predstavljajo komponente nepolarne frakcije v ekstraktu. Glavni sestavini diterpenskega izvora sta grenčini karnozol in karnozolna kislina, ki imata prav tako dokazano antioksidativno in široko protimikrobno delovanje (Gerard in sod., 1995; Leskovar, 2007; Weckesser, 2007; BHMA ..., 2006). In ne nazadnje je rastlinska droga bogata tudi z različnimi vrstami flavonoidov, kot hesperedin, apigenin, hispidulin, gekvanin, luteolin in njihovih derivatih. V manjših količinah žajbljevi listi vsebujejo tudi kumarine, kot je eskuletin.

2.2.1.1.3 Triterpeni

Žajbelj je tudi dober vir triterpenov, kot germanikol, ursolna kislina, oleanololna kislina in njihovih derivatov, katerih učinkovitost je prav tako zanimiva in zato omembe vredna (Baričevič, 1996; Strzalka in sod., 2011; Flavex Natur ..., 2013). Ursolna in oleanolna kislina sta prisotni v številnih zeliščih z dokazanim protivnetnim in protitumorinim delovanjem na telo (Flavex Natur ..., 2013). Raziskovalci poročajo tudi o tem, da so rastlinski izvlečki, bogati z ursolno in oleanolno kislino, pomembne aktivne sestavine v izdelkih za nego od sonca poškodovane kože (Nishimori, 1997, cit. po Flavex Natur ..., 2013; Eggensperger, 2001, cit. po Flavex Natur ..., 2013).

2.2.1.1.4 Drugo

V manjših količinah žajbljevi listi vsebujejo derivate benzojske kisline, fitosterole (β -sitosterol in stigmasterol) in vitamine, kot so vitamin B1, vitamin C in nikotinska kislina (Baričevič, 1996; Strzalka in sod., 2011; Flavex Natur ..., 2013).

Vitamin C ima na koži mnogo ugodnih učinkov. Učinkovit je pri zdravljenju raznih patoloških stanj kože, od lažjih vnetij do kožnega raka. Kot antioksidant odstranjuje reaktivne proste radikale, ki jih povzroča UV svetloba (Rozman in Gašperlin, 2009). Dokazano je tudi njegovo protivnetno delovanje. Izboljša elastičnost kože, saj stimulira nastanek kolagena, in tako zmanjša tudi nastajanje gub. Poleg tega z zaviranjem pigmentacije vpliva na samo obarvanost kože. Vsa pozitivna delovanja vitamina C pripomorejo k upočasnitvi fotostaranja (gube, izguba elastičnosti) kože (Gašperlin, 2001).

V študiji v kateri so v suhem izvlečku žajblja določevali vsebnost osmih elementov (natrija, kalija, magnezija, kalcija, železa, mangana, cinka in bakra) so ugotovili, da so listi žajblja predvsem zelo bogati z železom in magnezijem (EMEA ..., 2010).

2.2.1.2 Uporaba

Žajbelj je že zelo dolgo časa znana dragocena zdravilna rastlina tako v uradni, kakor tudi ljudski medicini. Kot zdravilo proti različnim boleznim so ga gojili že v 9. stoletju na samostanskih vrtovih. Sprva so liste žajblja uporabljali kot zdravilo proti neplodnosti, zatem so bili ljudje mnenja, da zagotavlja dobro zdravje in dolgo življenje. Danes vemo, da ima to vsestransko zelišče, zaradi različnih biološko aktivnih sestavin tako v medicini kot kozmetiki zelo široko vrednost.

2.2.1.3 Zdravilni učinki

Žajbelj deluje antiseptično in astrigentno, zato se njegove pripravke uporablja predvsem za spiranje ustne votline pri vnetjih obzobnega mesa (dlesni), vnetjih ustne in žrelne sluznice ter grla, otiskih proteze, kot tudi na poškodovani koži zaradi opeklin in drugih ran. Prisotnost grenkih spojin (npr. karnozol) naredi žajbelj učinkovito zdravilo pri boleznih želodčno-črevesnega trakta. Pospešuje prebavo in preprečuje prekomerno fermentacijo ter nabiranje plinov v črevesju. Poleg tega zavira krvavitve iz prebavnega kanala in zmanjšuje prepustnost krvnih žil. Kot dodatno zdravilo se uporablja pri boleznih jeter in v začetni fazi diabetesa. Nepogrešljiv je tudi v obliki obkladkov, pri aroma-terapevtskih mešanicah, v kopelih in masažnih pripravkih, saj pomaga pri infekcijah kože (nalezljive bolezni, razjede, gube), bakterijskih okužbah, kašlju, artritisu, revmatizmu, v primeru bolečih in napetih

mišic (Baričevič, 1996; Strzalka in sod., 2011). Raziskovalci poročajo tudi o njegovem protivirusnem delovanju in ga kot aktivno sestavino, največkrat v obliki vodnega ali alkoholnega izvlečka, v kombinaciji z drugimi rastlinskimi pripravki, uporabljajo za zdravljenje akutnega in kroničnega bronhitisa (Baričevič in sod., 2001).

2.2.1.4 Kozmetična vrednost in delovanje na kožo

2.2.1.4.1 Antioksidativno delovanje in lovljenje prostih radikalov

Različni avtorji navajajo, da je žajbelj zelo dober vir antioksidantov. Z raziskavami so dokazali, da listi žajblja vsebujejo podobno kot priznane antioksidativne rastline *Ginkgo biloba* in *Panax ginseng* številne spojine z antioksidativnim delovanjem (Kennedy, 2006).

Karnozolna kislina je pomembna sestavina žajblja, ki ima dokazano močno antioksidativno delovanje. V živalskih testih so ugotovili tudi njeno zaščitno vlogo proti raku. Močno pričakovana je tudi njena ocena klinične aktivnosti (Svobodova in sod., 2003). Antioksidativni mehanizem karnozinskega kinona naj bi vključeval redoks reakcije v kombinaciji z izomerizacijo do laktonskega derivata. V prvi stopnji antioksidacije, reducent karnozinskega kinona prispeva k antioksidativni aktivnosti raztopine. Predlagan mehanizem razloži enega ključnih razlogov za močno antioksidativno aktivnost žajbljevih izvlečkov (Masuda in sod., 2002).

Poseben način delovanja karnozolne kisline, ki pomembno vpliva na stanje kože, je v njenem vplivu na metaloproteaze². Raziskava, v kateri so predhodno obdelali človeške fibroblaste s karnozolno kislino, je pokazala da slednja zavira delovanje metaloproteaz v fibroblastih kože, izpostavljenih UVA sevanju (Offord in sod., 2002). Izvlečki *Salvia officinalis* imajo dobro sposobnost lovljenja prostih radikalov, v povprečju 0,54 mg mL⁻¹ oz. z najnižjo IC₅₀ vrednostjo 0,36 mg mL⁻¹, *Salvia officinalis* 'Berggarten'. Za pozitivno kontrolo antioksidativne aktivnosti so v raziskavi uporabili tokoferol (IC₅₀ = 0,02 mM).

Poleg karnozolne kisline glavni delež antioksidantov predstavljajo tudi druge fenolne spojine, kot npr. derivati rožmarinske kisline. Za rožmarinsko kislino domnevajo, da bi mogoče lahko nadomestili konvencionalne antioksidante, kot sta BHT in BHA (Kennedy, 2006; Cuvelier in sod., 1994).

Zelo obetavna in zato omembe vredna je tudi eksperimentalna študija Barbinta-Patrascu in sod. (2013). Gre za okolju prijazen pristop, v katerem so pripravili antioksidativne srebrove nano delce (ND) z uporabo žajbljevih ekstraktov. Natančneje, za pripravo žajbljevih srebrovih ND so uporabili metodo, ki temelji na t.i. ultrazvočnem žarčenju. Z namenom zvečanja stabilnosti in biokompatibilnosti, so ND dodatno vgradili v dva različna tipa liposomov, sojin lecitin in Chla-DPPC-lipidni vehikel (podlaga). Tako pripravljeni ND so izkazovali močne antioksidativne lastnosti.

² Metaloproteaze so endopeptidaze (encimi) v zunajceličnem matriksu, ki imajo pomembno vlogo pri migraciji celic.

2.2.1.4.2 Protivnetno delovanje

Zaradi zelo dobrih rezultatov želimo na začetku predstaviti raziskavo v kateri so preverjali učinkovitost izvlečka žajblja na rdečini povzročeni z UV³ svetlobo (Flavex Natur ..., 2013). V študiji je sodelovalo 40 ljudi, katerim so na vneto kožo ramen, povzročeno z UV svetlobo, nanесли pripravek z 2 % izvlečkom žajblja, izoliranega s superkritičnim plinom – CO₂⁴. Rezultati so pokazali, da izvleček žajblja bistveno zmanjša eritem. Poleg tega so želeli preveriti ali izvleček žajblja na kožo deluje iritativno. Poskus so izvedli tako, da so na "zdrava" ramena nanесли pripravek z izvlečkom žajblja in tudi v tem primeru prišli do pozitivnih rezultatov, saj ni bilo opaziti iritacije na izvleček žajblja na ne obsevani površini. Študija dokazuje, kar so mnogi slutili: izvleček žajblja deluje protivnetno in je koristen pri lokalni uporabi vnete kože (Reuter in sod., 2007). Na eni strani fenoli predstavljajo močne antioksidante in so lovilci prostih radikalov, na drugi strani pa regenerativni in protivnetni triterpeni, kot je ursolna kislina, kažejo učinkovite popraviljalne lastnosti.

Z lokalno uporabo triterpenskimi kislin je mogoče obnoviti strukturo kolagenskih vlaken, poškodovanih zaradi UVB sevanja, posledično se izboljša elastičnost kože in gubice so zmanjšane (Reuter in sod., 2007).

Ursolna kislina ima dokazano protivnetno delovanje. Vpliva na metabolizem arahidonske kisline v človeških trombocitih in levkocitih, inhibira elastazo in preprečuje proteolizo elastina v koži (Leskovar, 2007).

Nadalje, Baričević in sod. (2001) so v svoji študiji preiskovali dermalne protivnetne lastnosti listov *Salvia officinalis* L., pridobljenih iz 4 genskih virov. Izkazalo se je, da izvlečki heksana in kloroforma zavirajo ušesni edem miši, povzročen s krotonovim oljem⁵. Najbolj aktivni so bili izvlečki kloroforma. Metanolni (MeOH) izvlečki so pokazali nizek učinek, eterično olje pa je bilo neaktivno oz. je celo povzročalo vnetje kože. Kemijske in farmakološke študije najbolj učinkovitih kloroformnih izvlečkov, pridobljenih iz avtohtonih rastlin žajblja, ki rastejo v submediteranskih regijah Slovenije, so pokazale, da je glavna komponenta, odgovorna za protivnetno aktivnost, ursolna kislina. Protivnetni učinek te kisline (ID₅₀ = 0,14 μmol cm⁻²) je bil dvakrat večji od indometacina (ID₅₀ = 0,26 μmol cm⁻²), ki se v terapiji uporablja kot nesteroidni antirevmatik. Vsebnost ursolne kisline v žajblju in njegovih derivatih za dermalno uporabo velja za parameter kontrole kakovosti (Baričević in sod., 2001).

Raziskovalci so dokazali protivnetno delovanje tudi za oleanolno- in rožmarinsko kislino (EMEA ..., 2010; Svobodova in sod., 2003). Rožmarinska kislina deluje kot inhibitor

³ UV svetloba povzroči v koži nastanek vnetja, oksidacijo bioloških makromolekul, stimulacijo žlez lojnic, melanogenezo in spremembo v setavi kože.

⁴ Ekstrakcija s superkritičnimi plini je postopek izolacije, ki s spreminjanjem tlaka in temperature v območju tekočega stanja plina spreminjajo njegove lastnosti kot topila (npr. polarnost). Tako lahko dokaj selektivno izoliramo posamezne spojine, tudi eterično olje, pri nizkih temperaturah in tako preprečimo neželene kemijske reakcije.

⁵ Olje iz azijske rastline *Croton tiglium*, je kožni iritant in močno odvajalo.

aktivnosti komplementa, ki ima osrednjo vlogo pri razvoju vnetnih reakcij in predstavlja enega od pglavitnih obrambnih sistemov telesa (EMEA ..., 2010).

2.2.1.4.3 Zaviranje nastanka dušikovega oksida (NO)

NO je vrsta prostih radikalov, ki lahko povzročajo melanogenezo, eritem in imunosupresijo ter druge vnetne reakcije kože. Rezultati študije Lee in sod. (2011) so pokazali, da ima rod *Salvia*, močan zaviralni učinek na nastanek NO v primerjavi z rodом *Ocimum*, vendar nekoliko manjši v primerjavi z rodом *Rosmarinus*, ki se je pri tem izkazal z najboljšimi rezultati.

Močno pozitivno povezanost z učinki DPPH⁶ (difenil-2-pikrilhidrazil) – lovljenjem in učinki na zaviranje tvorbe NO prepisujejo vsebnosti skupnih fenolov in skupnih flavonov, značilnih za rastline rodu *Salvia* (Lee in sod., 2011).

2.2.1.4.4 Stabilizacija krhkih kapilar, učvrstitvena in proticelulitna aktivnost

Izvleček žajblja stabilizira krhke kapilare, zmanjšuje njihovo prepustnost in tako zmanjšuje edem tkiva. Razlog pozitivnega delovanja izvlečka žajblja je najverjetneje v vsebnosti flavonoidov (npr. hesperidin), prisotnih v izvlečku žajblja.

Anthoine in Aubert (1990) v svojem prispevku navajata pripravke, ki vsebujejo kozmetično ali farmacevtsko sprejemljive nosilce in kombinacijo rastlinskih izvlečkov sestavljenih iz izvlečkov žajblja (*Salvia officinalis* L.) in bodeče lobodike (*Ruscus aculeatus* L.). Po številnih študijah so ugotovili, da lahko dosežemo sinergistično delovanje na zmanjšanje permeabilnosti kapilar in porast odpornosti, s tem da kombiniramo izvleček bodeče lobodike z izvlečkom žajblja. Tovrstne pripravke lahko uporabljamo v primeru krhkih kapilar, saj zmanjšujejo permeabilnost in povečajo njihovo odpornost. Dodatno imajo pripravki, primerni za dermalno uporabo, učvrstitveno in proticelulitno aktivnost, posebej še v kombinaciji z ostalimi rastlinskimi izvlečki, katerih glavni delež predstavljajo vodotopne organske spojine.

2.2.1.4.5 UV absorpcijsko delovanje

Prekomerna izpostavljenost UVA in UVB žarkom vodi do nastanka kožnih gub in kožnega raka. Izvleček *Salvia officinalis* 'Icterina' raztopljen v MeOH (10 mg mL⁻¹) je pokazal močno UVA in UVB absorpcijsko delovanje, ko so merili absorbanco pri 365 nm (UVA) in 300 nm (UVB) glede na pozitivno kontrolo ZnO (5 %) in metil salicilat (100 µg mL⁻¹). Ugotovili so, da ima UVA absorpcija pozitivno povezavo z UVB absorpcijo (Lee in sod., 2011).

2.2.1.4.6 Protibakterijsko in protiglivično delovanje

Celi Garcia in sod. (2012) so v svoji eksperimentalni študiji preverjali protibakterijsko in protiglivično delovanje vodno-alkoholnega izvlečka pridobljenega iz posušene rastline

⁶ DPPH je stabilni prosti radikal, opisan kot hitra, enostavna in konvencionalna metoda za pregled aktivnosti lovljenja radikalov

Salvia officinalis L. proti *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Candida albicans* in *Candida tropicalis*. Rezultati so pokazali, da *Salvia officinalis* L. ni bil učinkovit proti *Streptococcus agalactiae*, *Candida albicans* ali *Candida tropicalis*. Nasprotno so zelo dobre rezultate beležili v primeru protibakterijskega delovanja proti *Staphylococcus aureus*.

Staphylococcus aureus je gram-pozitivna bakterija, ki povzroča kožne, urinarne in respiratorne infekcije (Celi Garcia in sod., 2012). Na koži naredi pogoje primerne za razvoj aken, komedonov, papul, pustul in celulita (Lee in sod., 2011).

Zaključijo s tem, da *Salvia officinalis* L. ohranja normalno mikrofloro kože in zato bi lahko bili pripravki z vsebnostjo *Salvia officinalis* L. primerni za na bakterije občutljivo kožo. Predlagajo razvoj čistilnega in negovalnega tekočega mila za kožo obolelo z infekcijskim dermatitisom, pri katerih je povzročitelj *Staphylococcus aureus* (Celi Garcia in sod., 2012).

Pozitivne rezultate beleži tudi študija Lee in sod. (2011), kjer so delovanje *Salvia officinalis* L. proti *Staphylococcus aureus* primerjali z učinkom penicilina (100 %). Izvlečki *Salvia officinalis* L. izkazujejo močno delovanje proti *Staphylococcus aureus*, z povprečnim razmerjem⁷ med 24,4 – 32,7 %.

Tovrstni učinek pripisujejo predvsem bogati in pestri vsebnosti žajblja s spojinami, kot so 1,8-cineol, tujon, kafra, tanini, saponini, za katere številni viri poročajo o njihovem protibakterijskem delovanju (Celi Garcia in sod., 2012).

Med tem pa so v drugi študiji ocenjevali protiglivično in protivnetno delovanje eteričnih olj na citotoksične makrofage in keratinocite. Olja so preiskovali z GC, GCMS, protiglivično aktivnost pa preverjali glede na kvasovke, dermatofite in plesen iz rodu *Aspergillus*. Glavni sestavini žajbljevega eteričnega olja sta bili 1,8-cineol (39,5 – 50,3 %) in kafra (8,8 – 25,0 %). Eterična olja so razkrila protiglivično aktivnost proti dermatofitom in signifikantno zavirala nastanek dušikovega oksida (NO), ki jo stimulira lipopolisaharid (LPS⁸) v makrofagih, brez vpliva na celico. Ta dognanja kažejo, da aktivne koncentracije žajbljevega olja ne vplivajo na sesalske makrofage in keratinocite, zato jih lahko vgradimo v kozmetične in farmacevtske formulacije (Abu-Darwish in sod., 2013).

2.2.1.4.7 Vpliv na melanogenezo

Vredno branja je delo Oliveira in sod. (2012), s katerim so želeli oceniti prispevek rožmarinske kisline pri delovanju žajbljevega izvlečka na melanogenezo. Za vrsto *Salvia officinalis* L. so se odločili predvsem zato, ker vsebuje visoke količine fenolov in fenolnih derivatov, vključujoč rožmarinsko kislino, za katere so dokazali, da biološko vplivajo na melanogenezo in imajo fotoprotektivne lastnosti. Najprej so izvedli test citotoksičnosti tekočega (EF) in vodnega (EA) izvlečka žajblja ter prečiščene rožmarinske kisline (RA) na

⁷ Razmerje med inhibicijsko cono, ki jo povzroči izvleček (10 mg na disk) in inhibicijsko cono: 4,2 cm, značilno za penicilin $\times 100$

⁸ LPS - komponenta celične stene večine po Gramu negativnih bakterij. Močan spodbujevalec naravne odpornosti

B16F10⁹ celicah, nato je sledilo vrednotenje proizvodnje melanina in aktivnost tirozinaze¹⁰.

Opazili so, da oba izvlečka *S. officinalis* ob prisotnosti L-tirozina¹¹ pomembno vplivata na melanogenezo v B16F10 celicah in je njuno delovanje celo boljše od čiste RA. To kaže na dejstvo, da je RA ena, a ne edina spojina, prisotna v izvlečkih *S. officinalis*, ki vplivajo na melanogenezo. Izvlečki *S. officinalis* lahko služijo kot alternativni substrat, ki inducira delovanje tirozinaze.

Z nadaljnjimi testi so ugotovili, da ima RA celo dvojni učinek na melanogenezo B16F10 celic. In sicer so opazili, da RA pri majhnih koncentracijah deluje kot pozitivni modulator melanogeneze, vključujoč sintezo tirozinaze, ki ji sledi hitro povečano delovanje tirozinaze ter večja proizvodnja melanina. Nasprotno so večje koncentracije RA povzročile zmanjšano delovanje tirozinaze v obeh sistemih. Razlog močno zavrte encimske aktivnosti v priemeru večjih, vendar ne citotoksičnih koncentracijah RA, je lahko v tem, da RA enako kot drugi polifenoli deluje zaviralno na veznem mestu tirozinaze, ki vodi do tvorbe o-kinon derivata in blokiranja encimske oksidacije L-DOPA¹² do o-dopakina. Nadaljujejo, da je RA močan antioksidant in zato lahko v velikih koncentracijah deluje na zmanjšanje o-dopakina prisotnega v reakcijski zmesi do L-DOPA, kar omejuje formacijo dopakrome in posledično melanina. Izpostavljenost B16F10 celic višjim koncentracijam RA sproži več postopkov, ki negativno vplivajo na proces melanogeneze.

Če povzamemo rezultate študije Oliveira in sod. (2012) ugotovimo, da izvlečki *S. officinalis* in RA posegajo v proces melanogeneze z izražanjem melanina v celicah, odvisno od njihove koncentracije v mediju, pri tem pa ni nujno da se spreminja delovanje celic ali delovanje tirozinaze.

Različne snovi, prisotne v izvlečkih žajblja, lahko različno delujejo na melanogenezo ter posegajo v različne faze sinteze in delovanja tirozinaze. Lahko delujejo tudi sinergistično.

Salvia officinalis in RA, se lahko štejejo kot potencialno terapevtsko sredstvo za zdravljenje bolezni, povezanih s pigmentacijo kože.

2.2.1.4.8 Pripravki za zobno nego

Žajbelj je pogosta aktivna sestavina v pripravkih za zobno nego in zeliščnih zdravilnih pripravkih. Zaradi znanih protimikrobnih lastnosti, kakor tudi svoje trpkosti, ki temelji na taninih (čreslovinah) prisotnih v žajblju, koristi pri zmanjšanju rasti zobnih oblog, zavirajo vnetje dlesni in imajo pozitivne učinke na preprečevanje kariesa (Baričević in sod., 2001). Vodni izvlečki se uporabljajo kot vir naravnih oksidantov v ustnih vodah in zobnih pastah za beljenje zob (Kokalj ..., 2013).

⁹ B16F10 celice so celice, ki se delijo z običajnimi človeškimi melanociti v mnogih melanogenih poteh. V tem delu predstavljajo model za vrednotenje učinkov izvlečka žajblja in rožmarinske kisline na melanogenezo

¹⁰ Tirozinaza je ključni encim melanogeneze pri človeku

¹¹ L- tirozin je substrat za aktivnost encima tirozinaza, ki je odgovoren za sintezo melanina

¹² L-DOPA - prekurzor dopamina

2.2.1.4.9 Antiperspirantno delovanje

Dokazan je vpliv žajblja na znojenje, saj vodni ali alkoholni izvlečki žajblja izkazujejo antiperspirantno delovanje (Baričevič, 1996; Alonso, 2004). Dezodoranti lahko pretirano potenje zmanjšajo v dveh do treh urah in delujejo do tri dni.

2.2.1.4.10 Izdelki za nego las

Izvlečki žajblja se pojavljajo v izdelkih za nego las. Z njihovo uporabo lahko potegnemo sive lase in zaviramo nastanek prhljaja, zaradi dokazanega antioksidativnega in protivnetnega delovanja spojin v izvlečkih žajblja (Gediya in sod., 2011; Madhuri Reddy in sod., 2011).

2.2.1.4.11 Dišava

Eterična olja se pojavljajo kot dišavna komponenta v parfumi, milih, šamponih, osvežilnih zraka, detergentih in drugih kozmetičnih izdelkih (Strzalka in sod., 2011; Kokalj ..., 2013).

2.3 METODE ZA VREDNOTENJE UČINKOVITOSTI KOZMETIČNIH IZDELKOV

Med metode za vrednotenje učinkovitosti kozmetičnih izdelkov (KI) uvrščamo tudi transepidermalno izgubo vode (TEWL – trans epidermal water loss), hidratacijo kože in pH kože, dodatno pa lahko KI vrednotimo organoleptično. Podrobneje opisano v nadaljevanju.

2.3.1 TEWL

TEWL je parameter za izgubo vode skozi intaktno roženo plast (*stratum corneum*) kože, v razmerah, ko ni inducirano potenje (Barel in sod., 2006). Z njim lahko opredelimo splošno stanje kožne (epidermalne) bariere, ki je odvisno od notranjih dejavnikov, kot je hidratacija kože in zunanjih dejavnikov, kot so temperatura, relativna vlažnost, letni čas. Poleg tega je metoda uporabna za vrednotenje učinkovitosti KI, razvoj in raziskave le-teh. Za določitev TEWL vrednosti običajno uporabimo napravo, ki se imenuje Tewameter® TM 300 (Courage + Khazaka, 2003a). Tewameter® TM 300 vrednost TEWL izmeri kot gostoto toka vode iz notranjosti telesa v okolico (TEWL ne moremo direktno izmeriti) v $\text{g m}^{-2} \text{h}^{-1}$. Ta je odvisen od osebe (spol, starost, anatomsko mesto (preiskovana površina), temperatura kože, potenje), okolja (temperatura, relativna vlažnost, kroženje zraka), formulacije (Rogiers, 2001; Zvonar, 2013a). Nizke vrednosti TEWL pomenijo dobro stanje epidermalne bariere, povečane vrednosti pa kažejo na oslABLJENO (rane, opekline, površinsko aktivne snovi (PAS), preveč suha koža) epidermalno bariero (Zvonar, 2013a).

2.3.2 Hidratacija kože

Hidratacija kože je ocena za splošno stanje kože. Je indikator za stanje epidermalne bariere, mehanskih lastnosti in sposobnosti vezave vode ter penetracije spojin v kožo. Na hidratacijo kože vplivajo številni dejavniki, kot so: prisotnost naravnega vlažilnega faktorja (NMF), uporaba vlažilcev in negovalnih KI, zdravstveno stanje (npr. sladkorna bolezen, luskavica) in uporaba zdravil ter poklicne dejavnosti in okoljske razmere (Zvonar, 2013a). Hidratacijo površine kože oz. rožene plasti (15 μm) lahko merimo z aparaturom, ki se imenuje Corneometer® CM 825 (Courage + Khazaka, 2003b).

2.3.3 pH kože

pH kože je pomemben parameter rožene plasti in regulator homeostaze kožne bariere. Aparat Skin-pH-Meter (Courage + Khazaka, 2003c) meri pH vodne raztopine na površini kože, ki jo tvori koža s svojimi izločki in vsebnostjo vlage. Vrednost pH je merilo za kislost ali bazičnost vodne raztopine na površini kože. Z njim lahko vrednotimo obstoječe stanje in kakovost kože. Merjenje pH *in vivo* je odvisno od notranjih dejavnikov (endogeni) kot so starost osebe, spol, mesta preiskovane površine, uživanja hrane in zdravil ter zunanjih dejavnikov (eksogenih), kot so okolje (letni časi), način umivanja, uporaba KI in dermatikov. Vrednost pH kože, ki jo štejemo za normalno je med 4,5 in 6,5, vrednost 5,5 pa naj bi veljala za povprečni pH kože (Zvonar, 2013b).

2.3.4 Organoleptično vrednotenje kozmetičnih izdelkov

Dodana vrednost, ki govori o občutkih, ki jih je kozmetični izdelek povzročil uporabniku. Človek preko čutnega zaznavanja (vid, otip, vonj) poda oceno sprejemljivosti izdelka, glede na videz, konsistenco, barvo (Ahlin Grabnar, 2012).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 NABIRANJE IN SUŠENJE RASTLINSKEGA MATERIALA

Rastline žajblja (*Salvia officinalis* L.) so bile nabrane v juliju 2014 iz naravnega rastišča na Krasu, natančneje v Petrinjah pri Kozini.



Slika 3: Nabiranje svežih rastlin žajblja (*Salvia officinalis* L.) (foto: Svetlin, 2014)

Sveže nabrane rastline žajblja smo posušili v industrijski sušilni omari Heraeus TU 3 na Biotehniški fakulteti (40 °C, krožna ventilacija) do konstantne mase (2 – 3 dni).

Posušen rastlinski material (rastlinsko drogo žajblja) smo do naslednjega postopka hranili v platnenih vrečkah v prostorih Biotehniške fakultete (BF), na Jamnikarjevi 101 v Ljubljani.

3.2 IZDELAVA SUHIH IZVLEČKOV ŽAJBLJA

Delo je potekalo na Oddelku za agronomijo na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani, v laboratorijih Katedre za aplikativno botaniko, ekologijo, fiziologijo rastlin in informatiko.

Suhi ekstrakti (extracta sicca) so trdni pripravki, pridobljeni z izparitvijo uporabljenega topila (Formularium Slovenicum, 2011).

Suhi izvleček žajblja je običajno v obliki finega praška, svetlo sive do rjavo-zelene, lahko rumeno-rjave barve (Ph. Eur., 2008).

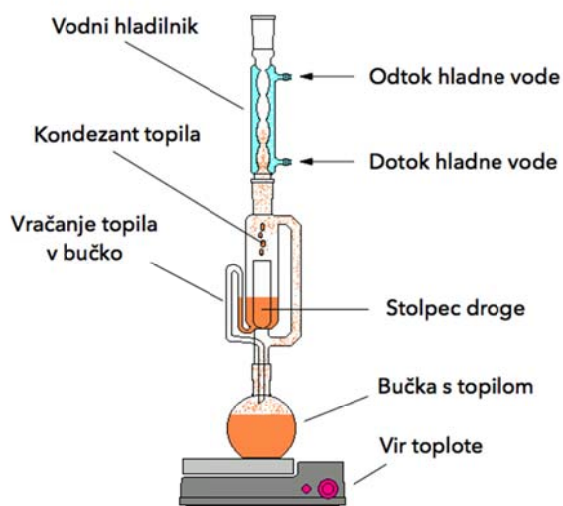
Proces izdelave izvlečkov iz svežih rastlin in pripadajoče tehnološke operacije so prikazane na sliki 6.

3.2.1 Mletje rastlinskega materiala

Rastlinsko drogo žajblja (*Salvia officinalis* L.), ki smo jo uporabili za izdelavo izvlečkov smo najprej ustrezno zmleli do uprašenega vzorca.

3.2.2 Izdelava tekočih izvlečkov (extracta fluida)

Izvlečke smo pripravili z vročo kontinuirano ekstrakcijo (Soxhletov postopek) in uporabili napravo, ki se imenuje Soxhletov aparat (slika 4). Želeli smo dobiti dva različna izvlečka, enega s pretežno lipofilnimi spojinami in drugega s pretežno hidrofilnimi spojinami. Za ekstrakcijo smo tako uporabili dve različni organski topili, to sta diklormetan (DCM) za ekstrakcijo bolj lipofilnih spojin in metanol (MeOH) za ekstrakcijo bolj hidrofilnih spojin. Tulec (Soxhlet Extraction Thimbles) iz filtrirnega papirja smo napolnili s 40 – 50 g (1 cm pod vrhom) posušeno in ustrezno razdrobljeno drogo, na vrhu pokrili z vato in vstavili v Soxhletov aparat. Stolpec droge v tulcu smo prelili s 500 mL ustreznega topila. Ekstrakcijsko topilo DCM, smo segrevali na ustreznem grelniku v 500 mL bučki, kateri smo dodali nekaj vrelnih kamenčkov. Topilo je pričelo vreti, pare so se utekočinile v hladilniku in kondenzat je kot čisto topilo kapljal na stolpec droge. Ko je kondenzat topila napolnil nastavek do višine odtoka, se je ta prelil nazaj v bučko in pričel se je novi cikel. Opazili smo, da so prvi cikli najbolj intenzivno temno zeleno obarvani, nato je barva iz cikla v cikel postajala vse svetlejša in ko je iztekalo že skoraj brezbarvno topilo je bila ekstrakcija končana. Postopek smo izvajali tako dolgo, da je poteklo 30 ciklov. Dobili smo skoncentriran tekoči izvleček (extracta fluida).



Slika 4: Shematski prikaz Soxhletovega aparata (prirejeno po Soxhlet extractor ..., 2015) (levo) in potek ekstrakcije žajblja (*Salvia officinalis* L.) s Soxhletovim aparatom (foto: Svetlin, 2014)

3.2.3 Izdelava suhih izvlečkov (extracta sicca)

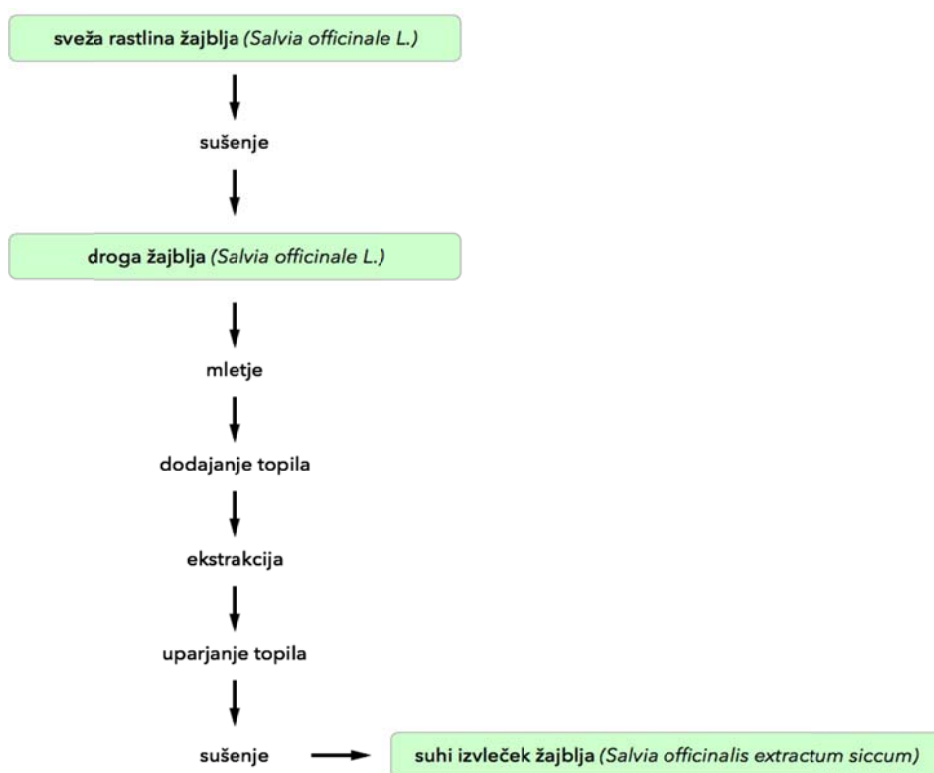
Zatem je sledilo odparevanje topila z rotacijskim vakuumskim uparjevalnikom (rotavapor Büchi) (slika 5). Iz bučke smo odstranili vrelnne kamenčke in jo skupaj z tekočim izvlečkom dali na rotavapor. Pričeli smo uparjati topilo, tako da smo postopoma povečevali hitrost uparjevanja, z regulatorjem tlaka pa zagotovili želen podtlak v sistemu.

Uparjanje je trajalo približno 2 uri. Z izparitvijo uporabljenih topil smo dobili suhi izvleček žajblja. Tako prvega kot drugega smo zaščitena (z alufolijo) pred svetlobo do naslednjega postopka hranili v eksikatorju.

Na enak način je potekala tudi ekstrakcija, ko smo za topilo izbrali MeOH.



Slika 5: Uparjanje topila z rotacijskim vakuumskim uparjevalnikom (rotavapor Büchi) (foto: Svetlin, 2014)



Slika 6: Shema predelave svežih rastlin žajblja v suhi ekstrakt žajblja (prirejeno po Baumgartner in Zvonar, 2013).

3.3 IZDELAVA KREME S SUHIM IZVLEČKOM ŽAJBLJA

Delo je potekalo na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, v laboratorijih Katedre za farmacevtsko tehnologijo.

3.3.1 Postopek izdelave

3.3.1.1 Priprava osnovne zmesi

V popolnoma suhi terilnici smo zatehtali 5 g suhega izvlečka žajblja DCM ali MeOH. Nato smo terilnico dali na vodno kopel (40 °C) in postopoma v majhnih volumnih (po pravilu rastočih mas) dodali 10 g olivnega olja, po vsakem dodatku smo intenzivno premešali dokler ni nastala primerna homogena gladka zmes. Izdelano zmes smo zunaj vodne kopeli med mešanjem ohladili. Zmes je vsebovala 33 % suhega izvlečka žajblja. Tako pripravljena zmes je bila primerna za vgradnjo v poltrdno podlago.

3.3.1.2 Izdelava negovalnih krem z izvlečkom žajblja

Iz osnovne zmesi smo nato pripravili kreme (formulacije) s koncentracijami 10, 5, 2,5 in 1,25 g/100 g kreme (preglednica 1). Kot podlago za izdelavo kreme smo uporabili amfifilno (amf) Lexobazo (o/v). Gre za komercialno dostopno podlago, pogosto uporabljeno za pripravo dermalnih pripravkov, ki ima natančno definirano sestavo po naslednji recepturi:

Glycerolmonostearat 60	4,0 g
Cetylalkohol	6,0 g
Kratkoveržni trigliceridi	7,5 g
Macrogol-20-glycerolmonostearat	7,0 g
Propylenglycol	10,0 g
Aqua purificata	40,0 g

Sestava za končnih 100 g Lexobaze amf (Lexobaza, 2015).

V pateno smo zatehtali Lexobazo amf in osnovno zmes žajblja in mešali, da je nastala homogena zmes.

Preglednica 1: Priprava formulacij s koncentracijami 10, 5, 2,5 in 1,25 g/100 g kreme

Formulacije z izvlečkom žajblja	Priprava
10 % (m/m)	15 g osnovne zmesi redčimo z Lexobazo do 50 g
5 % (m/m)	25 g formulacije 10 % (m/m) redčimo z Lexobazo do 50 g
2,5 % (m/m)	25 g formulacije 5 % (m/m) redčimo z Lexobazo do 50 g
1,25 % (m/m)	25 g formulacije 2,5 % (m/m) redčimo z Lexobazo do 50 g

3.4 ORGANOLEPTIČNO VREDNOTENJE FORMULACIJ Z 10/5/ 2,5 IN 1,25 % IZVLEČKOM ŽAJBLJA

Pripravljene formulacije (kreme) smo postavili v vrsto glede na delež izvlečka žajblja (sliki 7 in 8) in organoleptično vrednotili. V to področje sodi ugotavljanje videza, barve, vonja, konsistence, mazljivosti in občutka po nanosu. Formulacijam smo ocenili videz, ki mora biti homogen in kremast. Barvo smo ocenili tako, da smo primerjali vzorce glede na belo podlago. Vonj smo ocenili tako, da smo vonj formulacij primerjali z vonjem Lexobaze, ki nima značilnega vonja. Konsistenco smo ocenili tako, da smo jo primerjali s konsistenco Lexobaze, ki je poltrdna in je znana za kreme. Mazljivost smo ocenili tako, da smo vzorce

razmazali po površini kože in zatem ocenili penetracijo v kožo. Nazadnje smo ocenili občutek (lahek/težak, nemasten/masten), ki ga izdelek pusti na koži po nanosu formulacij.



Slika 7: Organoleptično vrednotenje formulacij, ki se razlikujejo po deležu DCM izvlečka žajblja (foto: Svetlin, 2015)



Slika 8: Organoleptično vrednotenje formulacij, ki se razlikujejo po deležu MeOH izvlečka žajblja (foto: Svetlin, 2015)

3.5 VREDNOTENJE KOZMETIČNE UČINKOVITOSTI FORMULACIJ Z 2,5 % IZVLEČKOM ŽAJBLJA

V klinični študiji smo uporabili formulaciji z 2,5 % izvlečkom žajblja in izdelali tri različne vzorce. Prva dva vzorca sta vsebovala različna izvlečka žajblja, ki sta se razlikovala glede na uporabljeno topilo pri ekstrakciji, tretji vzorec je predstavljal placebo (Lexobazo z olivnim oljem).

Izdelali smo 50 g posameznega vzorca (preglednica 2).

Preglednica 2: Sestava za končnih 100 g: krema DCM, krema MeOH, placebo

Vrsta formulacije	Sestavine	Masa sestavin
DCM	Suhi ekstrakt žajblja pridobljen s topilom DCM	2,5 g
DCM	Rafinirano olivno olje	5,0 g
DCM	Lexobaza	92,5 g
MeOH	Suhi ekstrakt žajblja pridobljen s topilom MeOH	2,5 g
MeOH	Rafinirano olivno olje	5,0 g
MeOH	Lexobaza	92,5 g
Placebo	Rafinirano olivno olje	5,0 g
Placebo	Lexobaza	92,5 g

3.5.1 Parametri za izvedbo klinične študije

Pred izvedbo klinične študije smo najprej določili območje in količino nanosa uporabljenih formulacij. Glede na izkušnje preteklih študij (Gobec, 2014) in priporočenih smernic smo določili, da sta obe podlahti (leve in desne roke) najbolj primerno mesto aplikacije za kozmetične izdelke v naši študiji. Poleg tega nas je predhodno zanimalo kolikšno količino formulacije je potrebno nanesti, da se pokažejo merljivi rezultati. Glede na poskus se je kot najboljše izkazala količina 30 mg. To je tista količina formulacije, ki se v našem primeru lepo razmaže po celotno označenem mestu nanosa in se v kožo tudi po nekaj časa v celoti vpije.

3.5.2 Prostor in protokol študije

Klinično študijo smo izvedli na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, v laboratorijih Katedre za farmacevtsko tehnologijo.



Slika 9: Označena področja nanosa krem na obeh podlaktah: DCM (levo označeno mesto), MeOH (na sredini označeno mesto in placebo (desno označeno mesto) (foto: Svetlin, 2015)

V klinični študiji je sodelovalo 12 prostovoljk, starih od 18 – 25 let. Prostovoljke so bile zdrave in niso jemale zdravil. Vse prostovoljke so soglašale s postopkom testiranja. Dva dni pred študijo, na testiranem mestu niso smele uporabljati negovalnih kozmetičnih izdelkov (kreme, mila, ličila), dovoljeno je bilo umivanje oz. čiščenje z vodo, vendar najkasneje 2 – 3 ure pred meritvijo. Prostovoljkam se je ob prihodu v laboratorij s testiranega področja (podlakti obeh rok) odstranilo oblačilo. Na notranjo stran leve in desne podlakti smo narisali tri področja nanosa. Območja so bila na neporaščeni koži in ne neposredno na velikih žilah. Vsako področje je bilo veliko 9 cm^2 ($3 \times 3\text{ cm}$). Po označitvi območij so se prostovoljke aklimatizirale. Zagotovili smo jim primeren sedeč položaj ter počakali 30 – 40 minut, da se je koža navadila na pogoje v prostoru ($T = 22 - 24\text{ }^{\circ}\text{C}$,

relativna vlažnost: 40 – 60 %). V tem času prostovoljke niso uživale toplih pijač (kava, čaj), alkoholnih pijač in niso kadile ter niso bile fizično aktivne ali pod vplivom stresa. Po štiridesetih minutah smo najprej izvedli bazalne meritve na označenih področjih. Določili smo TEWL z napravo Tewameter® TM 300, hidratacijo kože z napravo Corneometer® CM 825 in pH z napravo Skin-pH-Metrom®. Sledil je nanos vzorcev, na prvo področje smo nanесли formulacijo DCM, na drugo področje formulacijo MeOH in na tretje področje placebo. Kot že omenjeno smo odmerili vse vzorce v enakih količinah 30 mg, ki smo jo nanесли s pomočjo brizge in spatule. Vzorce smo nanесли z nekaj minutnim zamikom, da smo lažje izvajali vse meritve. Meritve smo nato izvedli 30 in 60 minut po nanosu, in sicer v naslednjem zaporedju: najprej smo izmerili vrednost TEWL, nato hidratacijo in nazadnje še pH kože. Na vsakem področju smo s posamezno napravo naredili po dve (2) meritvi na posamezni roki.

3.5.3 Aparature za izvedbo klinične študije

Za vrednotenje učinkovitosti formulacij smo uporabili naslednje aparature:

- Tewameter® TM 300 (Courage + Khazaka, 2003a)
- Corneometer® CM 825 (Courage + Khazaka, 2003b)
- Skin-pH-Meter® (Courage + Khazaka, 2003c)

3.5.4 Meritev TEWL s Tewametrom® TM 300

Tewameter® TM 300 je aparatura, s katero merimo izgubo vode skozi intaktno roženo plast kože. Vrednost interpretiramo s parametrom TEWL (gostota toka vode iz notranjosti telesa v okolico) v $\text{g m}^{-2} \text{h}^{-1}$ (preglednica 3) (Courage + Khazaka, 2003a). Merilna celica je odprta (omogoča manjši vpliv na kožo) in opremljena z dvema paroma senzorjev za vlago in temperaturo.



Slika 10: Tewameter® TM 300

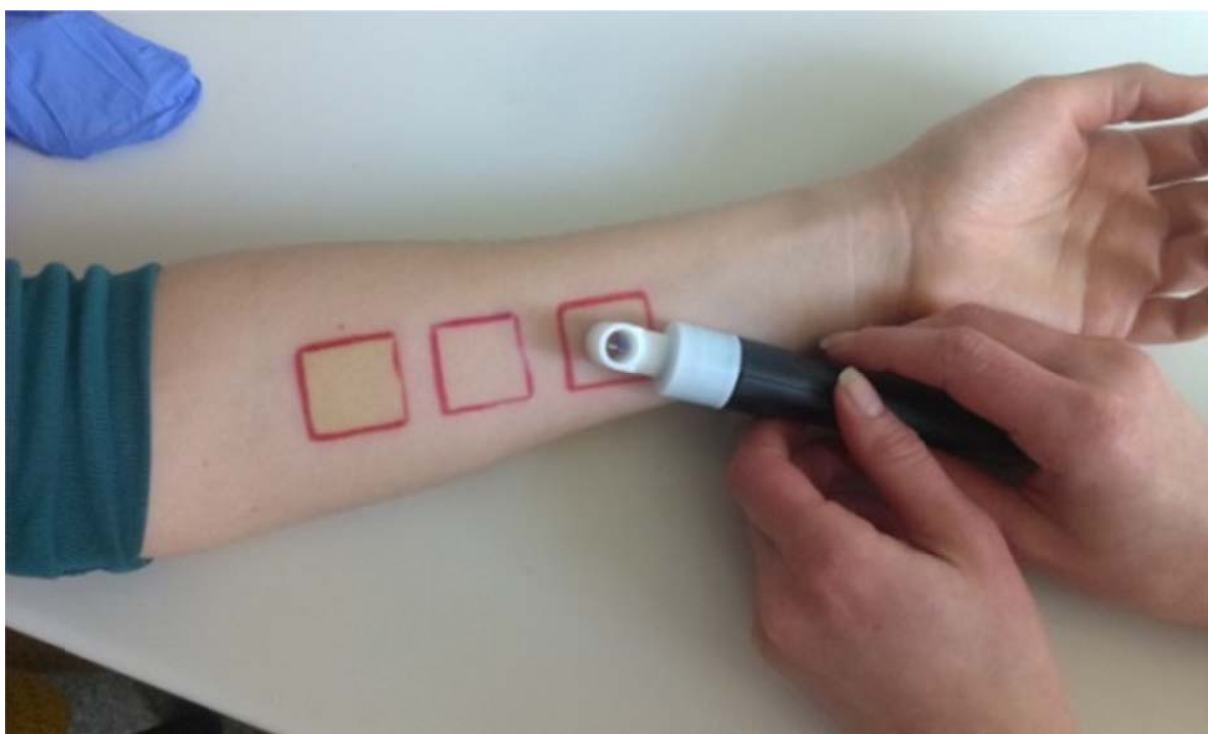
Preglednica 3: Interpretacija vrednosti TEWL, izmerjenih z aparaturo Tewameter® TM 300 (Courage + Khazaka, 2003a)

Interpretacija	TEWL v $\text{g m}^{-2} \text{h}^{-1}$
Zelo zdrava bariera	0 – 10
Zdrava bariera	10 – 15
Normalna bariera	15 – 25
Omejena bariera	25 – 30
Kritično stanje bariere	nad 30

3.5.4.1 Postopek merjenja s Tewametrom® TM 300

Celotno površino merilne celice smo najprej vertikalno namestili na ravno površino kože, da smo zagotovili dober stik s kožo in preprečili izhlapevanje vode na stiku med kožo in merilno celico. S pritiskom na gumb na strani merilne sonde se je opravila meritve, ki traja 30 s. Sondo smo premaknili na drugo območje posameznega testnega mesta in postopek ponovili (opravili smo 2 meritvi za vsako območje posameznega pravokotnika).

Merilna celica je izredno občutljiva na razmere iz okolja, zato med meritvijo v merilno celico nismo govorili ali dihali, meritve nismo izvedli pod direktno sončno svetlobo ali lučmi, merilne celice nismo pritiskali močno na kožo in jo med meritvijo držali popolnoma na miru (roki prostovoljca in izvajalca meritve sta popolnoma mirni).



Slika 11: Meritev TEWL s Tewametrom® TM 300 (foto: Svetlin, 2015)

3.5.5 Meritev hidratacije kože s Corneometrom® CM 825

Corneometer® CM 825 je aparatura, s katero merimo hidratacijo površine kože oz. rožene plasti (15 μm). Meritve temeljijo na povsem različni dielektrični konstanti vode (81) in drugih snovi (običajno < 7) ter na predpostavki, da se električne lastnosti kože spreminjajo v odvisnosti od njene hidratacije. Vrednost je podana v arbitrarnih enotah (preglednica 4) (Courage + Khazaka, 2003b; Zvonar, 2013a)



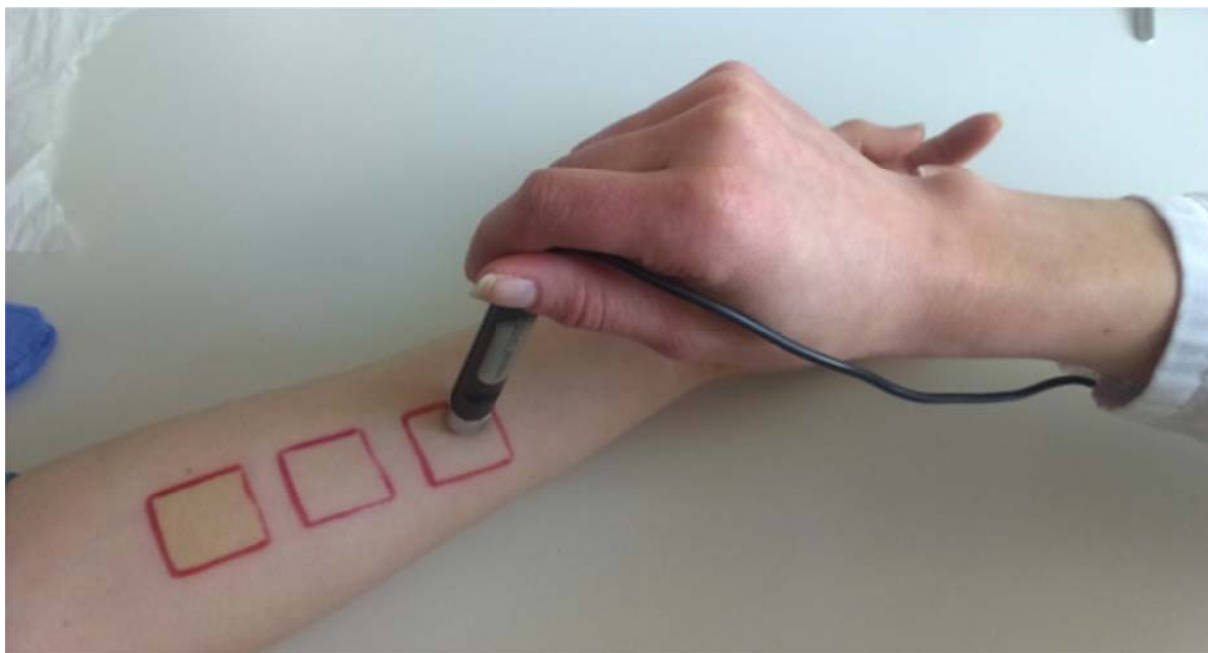
Slika 12: Corneometer® CM 825

Preglednica 4: Interpretacija vrednosti hidratacije kože, izmerjenih z aparaturo Corneometer® CM 825 (Courage + Khazaka, 2003b)

Interpretacija	Vrednosti
Zelo suha koža	pod 30
Suha koža	30 – 45
Normalna koža	nad 45

3.5.5.1 Postopek merjenja s Corneometrom® CM 825

Merilno celico smo vertikalno pritisnili na kožo za 1 s (kratka meritev brez okluzije), nato smo sondo premaknili in izvedli naslednjo meritev v bližini predhodne meritve označenega mesta.



Slika 13: Meritev hidracije kože s Corneometrom® CM 825 (foto: Svetlin, 2015)

3.5.6 Meritev pH kože s Skin-pH-Metrom®

Aparat Skin-pH-Meter meri pH vodne raztopine na površini kože, ki jo tvori koža s svojimi izločki in vsebnostjo vlage. pH vrednost (pH med 0 in 14) je merilo za kislost ali bazičnost vodne raztopine na površini kože. Z njim lahko vrednotimo obstoječe stanje in kakovost kože. Vrednost pH kože, ki jo štejemo za normalno je med 4,5 in 6,5 (Zvonar, 2013b).



Slika 14: Skin-pH-Meter®

3.5.6.1 Postopek merjenja s Skin-pH-Metrom®

Meritev pH kože smo opravili tako, da smo elektrodo položili na ravno površino kože, pritisnili na gumb ob strani in ga držali nekaj (1 – 3) sekund, da je voda reagirala s hidrolipofilnim plaščem kože. Elektrodo smo rahlo dvignili in postopek ponovili, da smo opravili še drugo meritev. Na zaslonu sta se izpisali izmerjeni vrednosti pH kože, končni rezultat je bila povprečna vrednost. Po končani meritvi smo elektrodo dvignili nad kožo, postavili čašo za zbiranje odpadne destilirane vode in elektrodo sprali s prečiščeno vodo iz pihalke. pH elektrodo smo pred vsako meritvijo rahlo stresli in nežno popivnali s papirnato brisačo, da smo odstranili odvečno vodo. Elektroda se ne sme izsušiti, zato jo v daljšem časovnem obdobju pokončno hranimo v raztopini 3M KCl, med posameznimi meritvami pa smo jo vedno potopili v prečiščeno vodo.

3.6 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV

V našem poskusu smo proučevali vpliv 3 dejavnikov: formulacija (DCM, MeOH in placebo), čas nanosa (0, 30, 60 minut) in mesto nanosa (L roka, D roka). Vse tri ravni dejavnika formulacija smo aplicirali na obe roki in spremljali dogajanje v vseh treh ravneh dejavnika čas nanosa. Podatke smo analizirali z analizo variance za trofaktorski poskus v kateri smo upoštevali, da so bile meritve opravljane pred nanosom ter 30 in 60 minut po nanosu formulacij na istih mestih na roki in na istih osebah. Skupaj imamo 18 obravnavanj v dvanajstih ponovitvah (12 prostovoljk), poskusna enota je ena prostovoljka.

Analizo variance (ANOVA) zbranih podatkov (priloga A) in kontraste za interakcijo formulacija $\times$ čas nanosa smo naredili s pomočjo statističnega programa R 3.2.0 (R Core Team ..., 2015).

4 REZULTATI

4.1 VIDEZ SUHIH IZVLEČKOV ŽAJBLJA

Z izparitvijo DCM topila smo dobili suhi izvleček žajblja v obliki trdnega pripravka, rumeno-zeleno-rjave barve, po izparitvi MeOH topila smo dobili suhi izvleček žajblja v praškasti obliki, temno zelene barve (slika 15).



Slika 15: Suhi DCM izvleček žajblja (levo) in suhi MeOH izvleček žajblja (desno) (foto: Svetlin, 2014)

4.2 ORGANOLEPTIČNA OCENA FORMULACIJ Z 10/ 5/2,5 IN 1,25 % IZVLEČKOM ŽAJBLJA

Najboljše organoleptične lastnosti imajo formulacije z 2,5 in 1,25 % izvlečka žajblja. Imajo poltrdno konsistenco, so svetlo zelene barve in imajo rahel vonj po žajblju. Po pričakovanjih sta imeli najslabše lastnosti formulaciji z 10 % in nato formulaciji s 5 % izvlečka žajblja. Pri teh formulacijah so konsistenca, barva in vonj manj primerni. Na podlagi sprejemljivosti izdelka, in z namenom ugotavljanja merljivih rezultatov smo za nadaljnjo vrednotenje izbrali formulaciji z 2,5 % izvlečka žajblja (preglednica 5 in slika 16).

Preglednica 5: Organoleptično vrednotenje formulacij, ki se razlikujejo po deležu izvlečka žajblja

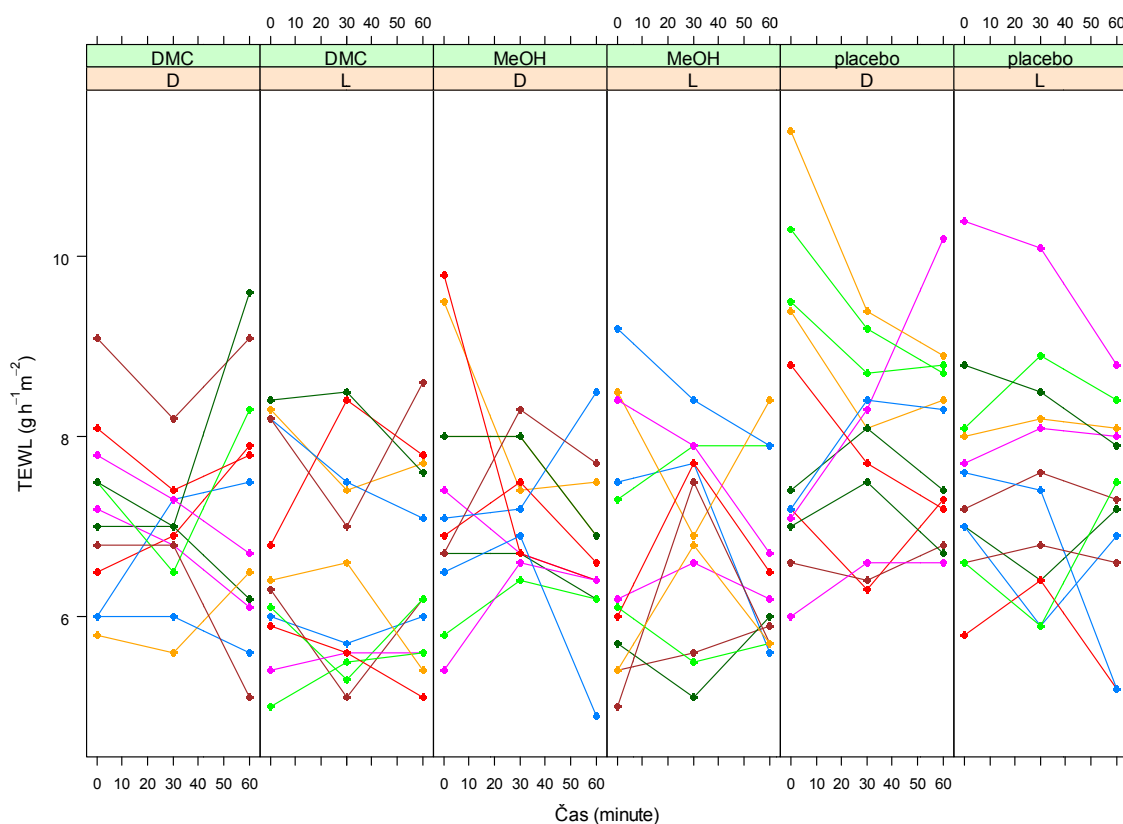
Fomrulacija	Videz	Barva	Vonj	Konsistenca	Mazljivost	Filem na koži
10 %	losjonast, heterogen	temno zelena	intenziven vonj po žajblju	nezadovoljiva	zadovoljiva	viden zaostanek formulacije
5 %	homogen	olivno zelena	vonj po žajblju	poltrdna	zadovoljiva	viden zaostanek formulacije
2,5 %	kremast, homogen	svetlo zelena	rahel vonj po žajblju	poltrdna	dobra	lahek, ne masten, dobra penetracija
1,25 %	kremast, homogen	svetlo zelena	zelo rahel vonj po žajblju	poltrdna	dobra	lahek, ne masten, dobra penetracija



Slika 16: Vizualni zgled formulacij z 2,5 % DCM (levo) in 2,5 % MeOH (desno) izvlečkom žajblja (foto: Svetlin, 2015)

4.3 TEWL PO NANOSU FORMULACIJ

Slika 17 prikazuje vpliv vseh preizkušenih formulacij (DCM, MeOH, placebo) na TEWL kože pri vseh 12-tih prostovoljkah (ena krivulja predstavlja 1 prostovoljko) s časom (0, 30 in 60 minut) na D in L roki. Opazimo, da prostovoljke zelo različno odreagirajo na posamezno formulacijo, vendar v povprečju splošna tendenca TEWL s časom pada, kar pokaže tudi statistična analiza. Opazimo razlike v bazalnem TEWL med prostovoljkami.

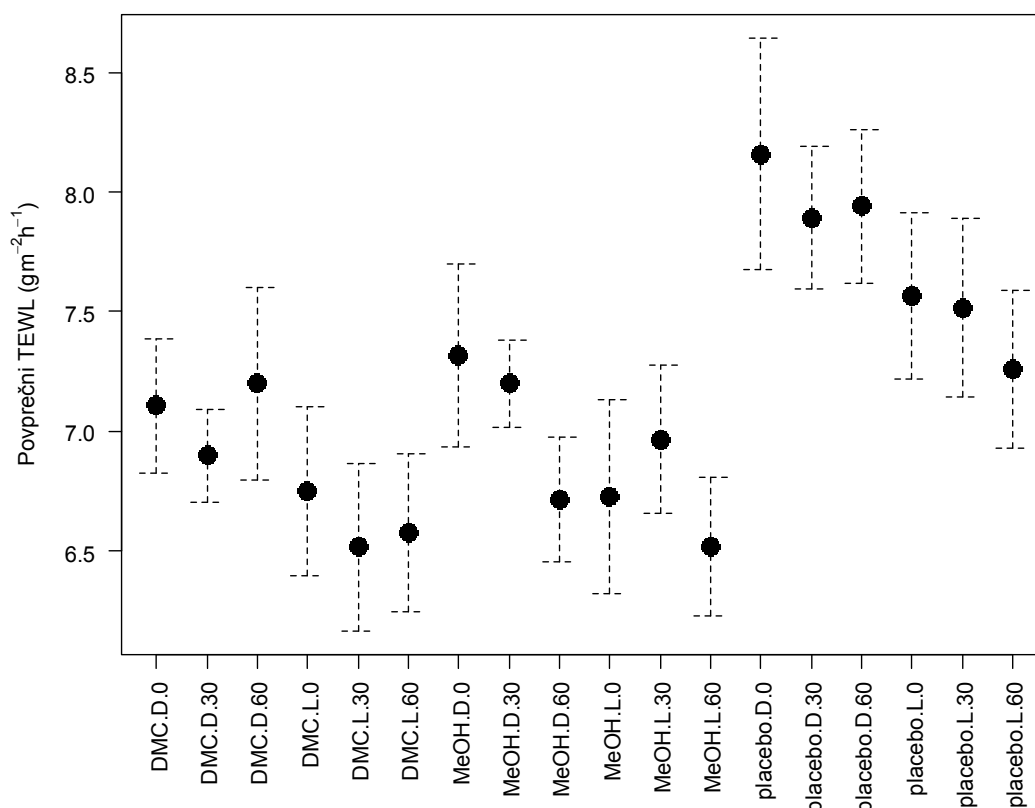


Slika 17: Grafični prikaz TEWL ($\text{g m}^{-2} \text{h}^{-1}$) po različnih ravneh proučevanih dejavnikov, meritve na istih prostovoljkah na istih mestih v treh časih so povezane s črto

Preglednica 6 in slika 18 prikazujeta povprečne vrednosti in standardne napake TEWL pred nanosom ter 30 in 60 minut po nanosu za vsako roko in formulacijo posebej. Opazen je nekoliko višji povprečen TEWL pri placebo, kar pokaže tudi statistična analiza.

Preglednica 6: Povprečne vrednosti in standardne napake TEWL pred nanosom ter 30 in 60 min po nanosu posamezne formulacije. Rezultati so podani kot povprečje meritev na 12-tih prostovoljkih

Formulacija	Mesto nanosa	TEWL ($\text{g m}^{-2} \text{h}^{-1}$)	TEWL ($\text{g m}^{-2} \text{h}^{-1}$)	TEWL ($\text{g m}^{-2} \text{h}^{-1}$)
		Pred nanosom	Pred nanosom	Pred nanosom
		Povprečje $\pm$ SE	Povprečje $\pm$ SE	Povprečje $\pm$ SE
DCM	D	$7,1 \pm 1,0$	$6,9 \pm 0,7$	$7,2 \pm 1,4$
DCM	L	$6,7 \pm 1,2$	$6,5 \pm 1,2$	$6,6 \pm 1,1$
MeoH	D	$7,3 \pm 1,3$	$7,2 \pm 0,6$	$6,7 \pm 0,9$
MeoH	L	$6,7 \pm 1,4$	$7,0 \pm 1,1$	$6,5 \pm 1,0$
Placebo	D	$8,2 \pm 1,7$	$7,9 \pm 1,0$	$7,9 \pm 1,1$
Placebo	L	$7,6 \pm 1,2$	$7,5 \pm 1,3$	$7,3 \pm 1,2$



Slika 18: Grafični prikaz povprečnega TEWL ($\text{g m}^{-2} \text{h}^{-1}$) vseh 12-tih prostovoljk po obravnavanjih in njihove standardne napake

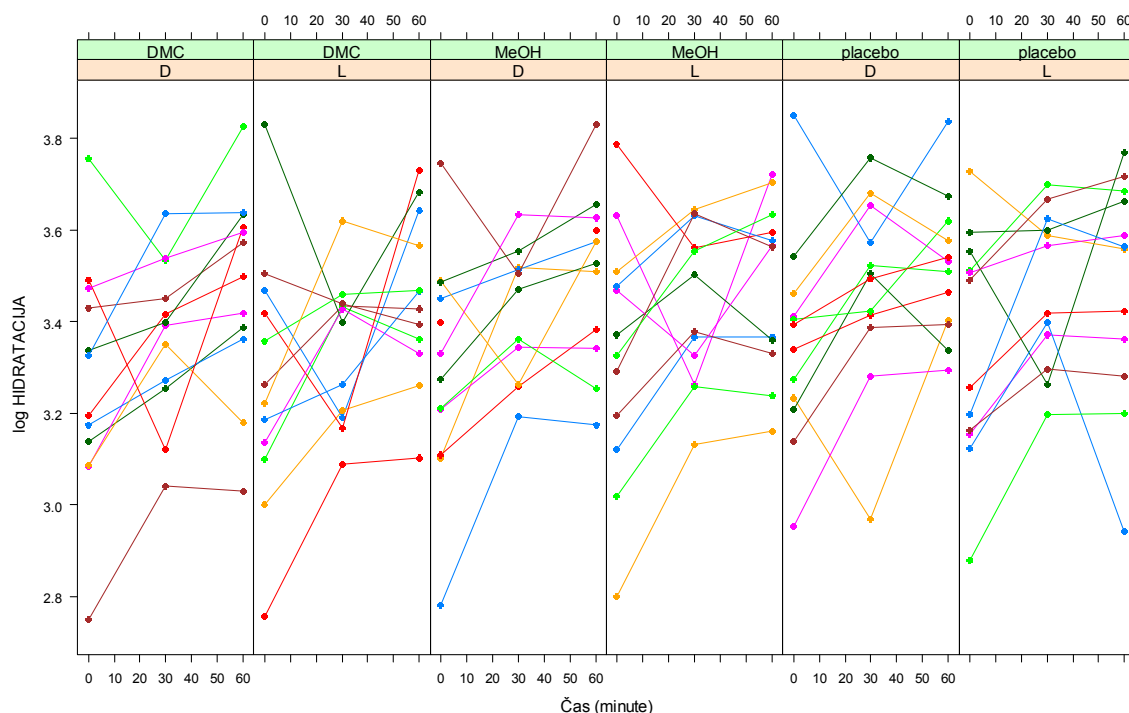
Statistična analiza (preglednica 7) je pokazala, da so vse interakcije (formulacija $\times$ čas nanosa $\times$ mesto nanosa, formulacija $\times$ čas nanosa, formulacija $\times$ mesto nanosa, čas nanosa $\times$ mesto nanosa) statistično ne značilne ($p > 0,05$). Obstaja statistično značilna razlika v povprečnem TEWL med placebom in DCM ($p = 0,0000$) ter med placebom in MeOH ($p = 0,0000$). Pri 95 % zaupanju je v povprečju TEWL pri DCM manjši od 0,58 do 1,18 $\text{g m}^{-2} \text{h}^{-1}$ kot pri placebo in od 0,52 do 1,11 $\text{g m}^{-2} \text{h}^{-1}$ manjši kot pri MeOH. Statistično značilne razlike v povprečnem TEWL med DCM in MeOH nismo dokazali ($p > 0,05$). Pokaže se statistično značilna razlika v povprečnem TEWL med D in L roko ($p = 0,0005$). Pri 95 % zaupanju je v povprečju TEWL od 0,21 do 0,69 $\text{g m}^{-2} \text{h}^{-1}$ višji na desni roki. S časom se v povprečju TEWL mejno statistično značilno zmanjšuje za 0,004 $\text{g m}^{-2} \text{h}^{-1}$ na minuto (95 % interval zaupanja od 0,000006 do 0,008 $\text{g m}^{-2} \text{h}^{-1}$).

Preglednica 7: Analize variance (ANOVA) za povprečen TEWL ($\text{g m}^{-2} \text{h}^{-1}$). Vrednost p podaja statistično značilnost rezultata

Vir variabilnosti	p - vrednost
formulacija	0,0000
čas nanosa	0,0540
mesto nanosa	0,0006
formulacija $\times$ čas nanosa	0,4725
formulacija $\times$ mesto nanosa	0,7908
čas nanosa $\times$ mesto nanosa	0,9636
formulacija $\times$ čas nanosa $\times$ mesto nanosa	0,5202

4.4 HIDRATACIJA KOŽE PO NANOSU FORMULACIJ

Slika 19 prikazuje vpliv vseh preizkušenih formulacij (DCM, MeOH, placebo) na hidracijo kože pri vseh 12-tih prostovoljkah (ena krivulja predstavlja 1 prostovoljko) s časom (0, 30 minut in 60 minut) na D in L roki. Podobno kot pri TEWL tudi tu opazimo, kako prostovoljke zelo različno odreagirajo na posamezno formulacijo, vendar v povprečju splošna tendenca hidracije kože s časom narašča, kar pokaže tudi statistična analiza. Prav tako opazimo razlike v bazalnih vrednostih hidracije kože med prostovoljkami.



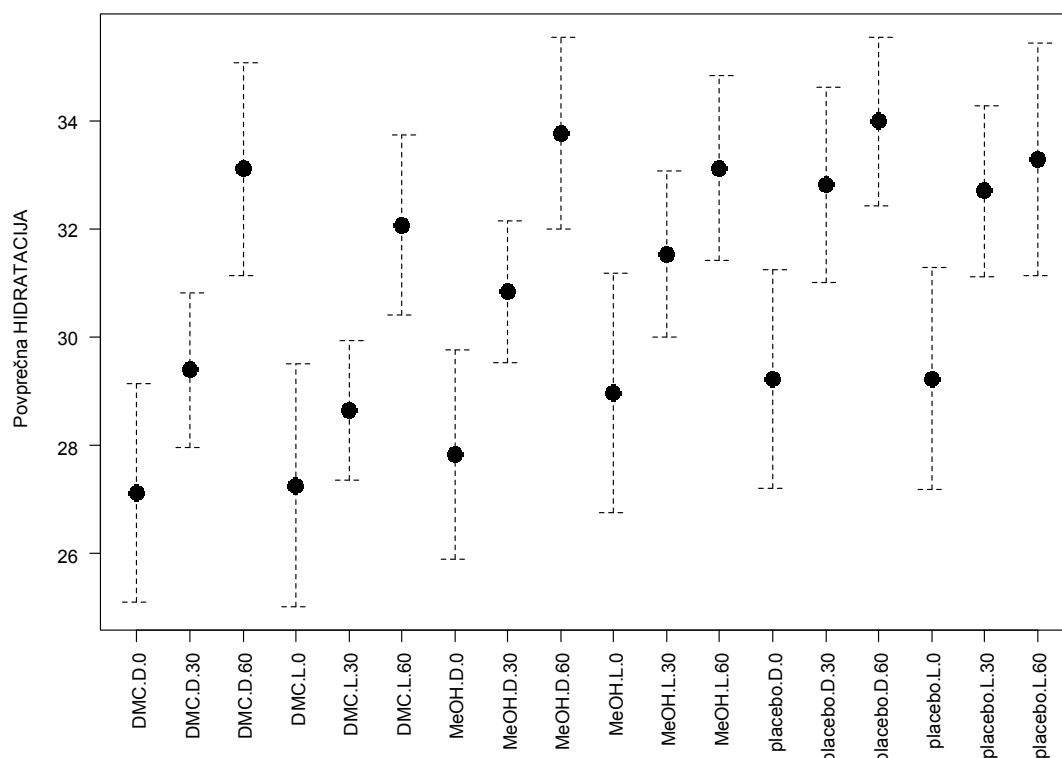
Slika 19: Grafični prikaz hidratacije¹³ kože po različnih ravneh proučevanih dejavnikov, meritve na istih prostovoljkih na istih mestih v treh časih so povezane s črto

Preglednica 8 in slika 20 prikazujeta povprečne vrednosti in standardne napake hidratacije kože pred nanosom ter 30 in 60 minut po nanosu za vsako roko in formulacijo posebej. Opazimo linearno naraščanje povprečne hidratacije kože po nanosu posameznih formulacij s časom, kar pokaže tudi statistična analiza.

Preglednica 8: Povprečne vrednosti in standardne napake hidratacije kože pred nanosom ter 30 in 60 min po nanosu posamezne formulacije. Rezultati so podani kot povprečje meritev na 12-tih prostovoljkih

Formulacija	Mesto nanosa	Hidratacija (arbitrarne enote)	Hidratacija (arbitrarne enote)	Hidratacija (arbitrarne enote)
		Pred nanosom	Pred nanosom	Pred nanosom
		Povprečje ± SE	Povprečje ± SE	Povprečje ± SE
DCM	D	27 ± 7	29 ± 5	33 ± 7
DCM	L	27 ± 8	29 ± 5	32 ± 6
MeoH	D	28 ± 7	31 ± 4	34 ± 6
MeoH	L	29 ± 8	32 ± 5	33 ± 6
Placebo	D	29 ± 7	33 ± 6	34 ± 5
Placebo	L	29 ± 7	33 ± 5	33 ± 7

¹³ Zaradi prevelikih varianc med prostovoljkami v hidrataciji kože smo podatke v analizi logaritemsko (naravni logaritem) transformirali.



Slika 20: Grafični prikaz povprečne hidratacije kože vseh 12-tih prostovoljk po obravnavanjih in njihove standardne napake

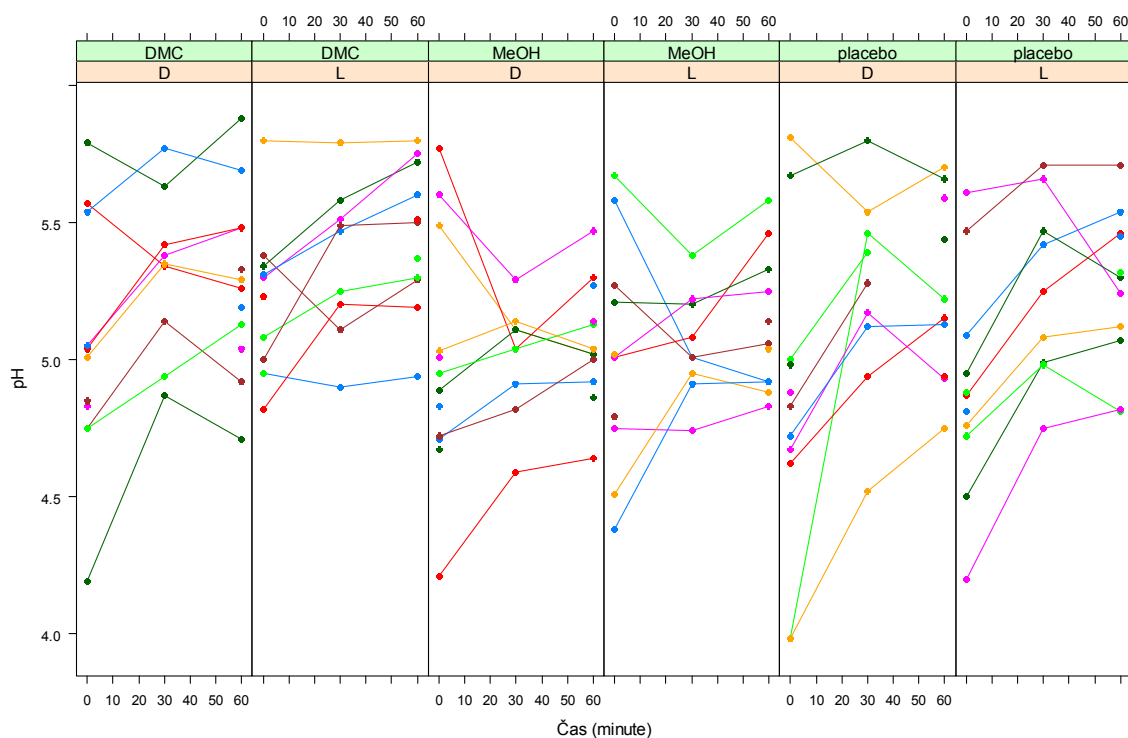
Statistična analiza (preglednica 9) je pokazala, da so vse interakcije (formulacija $\times$ čas nanosa $\times$ mesto nanosa, formulacija $\times$ čas nanosa, formulacija $\times$ mesto nanosa, čas nanosa $\times$ mesto nanosa) statistično ne značilne ($p > 0,05$). Obstaja statistično značilna razlika v povprečni hidrataciji kože med placebo in DCM ($p = 0,0005$) ter med DCM in MeOH ($p = 0,0173$). Pri 95 % zaupanju je v povprečju hidratacija kože pri DCM od 1,04 do 1,14 manjša kot pri placebo in od 1,01 do 1,10 manjša kot pri MeOH. Statistično značilne razlike v povprečni hidrataciji kože med placebo in MeOH nismo dokazali ($p > 0,05$). S časom se v povprečju hidratacija kože povečuje za 0,03 % na minuto (95 % interval zaupanja od 0,02 do 0,04 %).

Preglednica 9: Analize variance (ANOVA) za povprečno hidratacijo kože. Vrednost p podaja statistično značilnost rezultata

Vir variabilnosti	p - vrednost
formulacija	0,0021
čas nanosa	0,0000
mesto nanosa	0,6884
formulacija $\times$ čas nanosa	0,6442
formulacija $\times$ mesto nanosa	0,8173
čas nanosa $\times$ mesto nanosa	0,3737
formulacija $\times$ čas nanosa $\times$ mesto nanosa	0,9597

4.5 pH KOŽE PO NANOSU FORMULACIJ

Slika 21 prikazuje vpliv vseh preizkušenih formulacij (DCM, MeOH, placebo) na pH kože vseh 12-tih prostovoljk (ena krivulja predstavlja 1 prostovoljko) s časom (0, 30 in 60 minut) na D in L roki. Podobno kot pri meritvah TEWL in hidratacije kože, tudi tukaj opazimo jasne razlike v bazalnih vrednostih pH kože prostovoljk. Za razliko od meritev TEWL in hidratacije kože opazimo, da smo pH kože v času 30 minut izmerili le prvim devetim prostovoljkam, pri zadnjih treh prostovoljkah pa smo meritev pH kože izpustili. S tem smo preprečili izpiranje apliciranih vzorcev, zaradi zaostanka (pogoj za meritev) prečiščene vode na pH elektrodi.

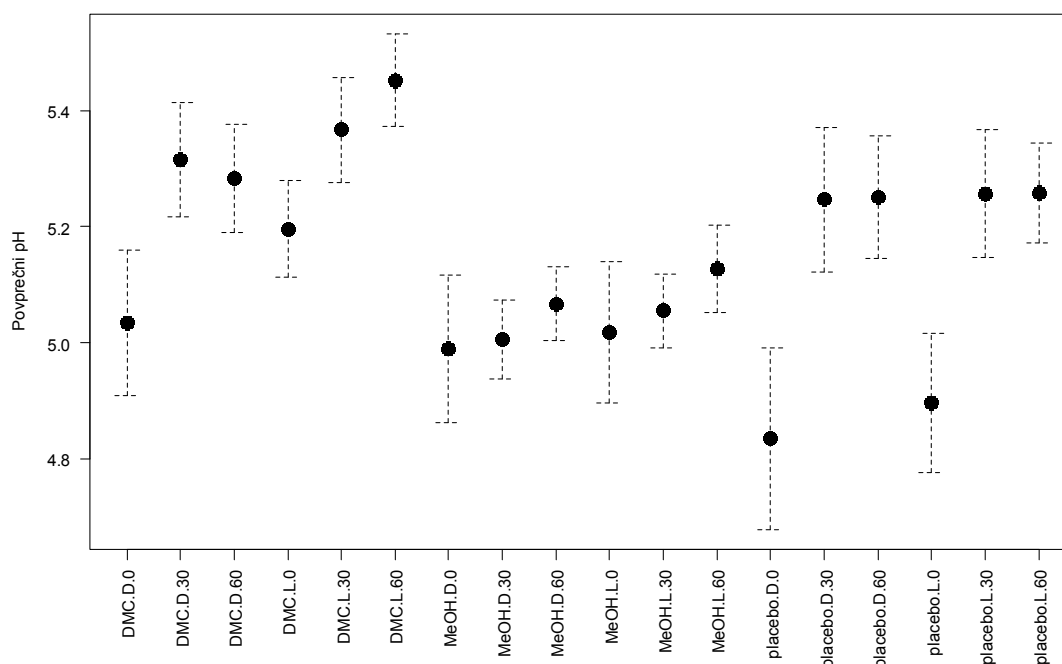


Slika 21: Grafični prikaz pH kože po različnih ravneh proučevanih dejavnikov, meritve na istih prostovoljkah na istih mestih v treh časih so povezane s črto

Preglednica 10 in slika 22 prikazujeta povprečne vrednosti in standardne napake pH kože pred nanosom, 30 in 60 minut po nanosu za vsako roko in formulacijo posebej. Opazimo, da je vpliv časa pri različnih formulacijah različen, kar pokaže tudi statistična analiza. Razlike so tudi med različnimi formulacijami.

Preglednica 10: Povprečne vrednosti in standardne napake pH kože pred nanosom ter 30 in 60 min po nanosu posamezne kreme. Rezultati so podani kot povprečje meritev na 12-tih prostovoljkah

Formulacija	Mesto nanosa	pH	pH	pH
		Pred nanosom Povprečje $\pm$ SE	Pred nanosom Povprečje $\pm$ SE	Pred nanosom Povprečje $\pm$ SE
DCM	D	5,0 $\pm$ 0,4	5,3 $\pm$ 0,3	5,3 $\pm$ 0,3
DCM	L	5,2 $\pm$ 0,3	5,4 $\pm$ 0,3	5,5 $\pm$ 0,3
MeoH	D	5,0 $\pm$ 0,4	5,1 $\pm$ 0,2	5,1 $\pm$ 0,2
MeoH	L	5,0 $\pm$ 0,4	5,1 $\pm$ 0,2	5,1 $\pm$ 0,3
Placebo	D	4,8 $\pm$ 0,5	5,3 $\pm$ 0,4	5,3 $\pm$ 0,3
Placebo	L	4,9 $\pm$ 0,4	5,3 $\pm$ 0,3	5,3 $\pm$ 0,3



Slika 22: Grafični prikaz povprečnega pH kože vseh 12-tih prostovoljk po obravnavanjih in njihove standardne napake

Statistična analiza (preglednica 11) je pokazala, da je interakcija formulacija $\times$ čas nanosa statistično značilna ($p = 0,0003$). Ker je interakcija značilna smo razlike med ravnmi teh dveh dejavnikov (formulacija, čas nanosa) preučili z nadaljnjo analizo kontrastov. Vse ostale interakcije (formulacija $\times$ čas nanosa $\times$ mesto nanosa, formulacija $\times$ roka, čas nanosa $\times$ mesto nanosa) niso statistično značilne ($p > 0,05$).

Kontrasti od 1 do 3: primerjali smo posamezno formulacijo med različnimi časi nanosa, kot smo npr. primerjali DCM med 0 in 30 min, med 0 in 60 min ter med 30 in 60 min

Kontrasti od 4 do 6: primerjali smo MeOH – DCM, placebo – DCM in placebo – MeOH v vsakem času nanosa posebej (v času 0, 30 in 60 min).

V povprečju se pH kože pri DCM s časom statistično značilno spremeni v prvih 30 minutah ($p = 0,006$), v zadnjih 30 minutah nismo opazili statistično značilne spremembe ($p > 0,05$). Pri 95 % zaupanju je v povprečju pH kože v času 30 minut od 0,04 do 0,38 večji kot pred nanosom formulacije.

V povprečju se pH kože pri placebo s časom statistično značilno spremeni v prvih 30 minutah ($p = 0,006$), v zadnjih 30 minutah nismo opazili statistično značilne spremembe ($p > 0,05$). Pri 95 % zaupanju je v povprečju pH v času 30 minut od 0,09 do 0,41 večji kot pred nanosom formulacije.

Statistično značilne razlike v povprečju pH pri MeOH s časom nismo opazili ($p > 0,05$).

V povprečju se pH kože med placebom in DCM v času 0 statistično značilno razlikuje ($p = 0,003$), v obdobjih 30 in 60 minut nismo opazili statistično značilne spremembe ($p > 0,05$). Pri 95 % zaupanju je v povprečju pH v času 0 od 0,05 do 0,44 večji pri DCM kot pri placebo.

V povprečju se pH kože med placebom in MeOH v času 30 minut statistično značilno razlikuje ($p = 0,01$), v zadnjih 30 minutah nismo opazili statistično značilne spremembe ($p > 0,05$). Pri 95 % zaupanju je v povprečju pH kože v času 30 minut od 0,02 do 0,45 večji pri placebo kot pri MeOH.

V povprečju se pH kože med MeOH in DCM v času 30 minut statistično značilno razlikuje ($p = 0,001$), v zadnjih 30 minutah nismo opazili statistično značilne spremembe ($p > 0,05$). Pri 95 % zaupanju je v povprečju pH v času 30 minut od 0,09 do 0,52 večji pri DCM kot pri MeOH.

V povprečju se pH kože s časom zvišuje za 0,004 na minuto (95 % interval zaupanja od 0,003 do 0,005).

Preglednica 11: Analize variance (ANOVA) za povprečen pH kože. Vrednost p podaja statistično značilnost rezultata

Vir variabilnosti	p - vrednost
formulacija	0,0003
čas nanosa	0,0000
mesto nanosa	0,0927
formulacija $\times$ čas nanosa	0,0003
formulacija $\times$ mesto nanosa	0,4961
čas nanosa $\times$ mesto nanosa	0,7752
formulacija $\times$ čas nanosa $\times$ mesto nanosa	0,9097

5 RAZPRAVA

5.1 ORGANOLEPTIČNE LASTNOSTI FORMULACIJ

Organoleptične lastnosti smo vrednotili po občutku. Zanimal nas je predvsem videz formulacij, ki je moral biti ustrezno homogen in ustrezne barve. Najboljše organoleptične lastnosti so dosegle formulacije z 2,5 % in 1,25 % izvlečkom žajblja. To pomeni, da so imele poltrdno konsistenco in svetlo zeleno barvo. Ker so formulacije vsebovale izvleček žajblja so imele prijeten in značilen vonj po žajblju. Sicer so se formulacije lepo mazale in razporejale po koži. Dobro so se vpile in niso puščale lepljivega občutka. Formulacije z večjim deležem (5 % in 10 %) izvlečka žajblja so imele manj poltrdno konsistenco, bile so temno ali olivno zelene barve in imele manj prijeten vonj, sicer značilen za žajbelj. Na podlagi sprejemljivosti izdelka, in z namenom ugotavljanja merljivih rezultatov smo za nadaljnje vrednotenje izbrali formulaciji z 2,5 % izvlečkom žajblja.

5.2 SPREMEMBA TEWL

Iz rezultatov smo ugotovili, da je v povprečju TEWL pri formulacijah DCM in MeOH manjši kot pri placebo. Značilno manjši TEWL pri DCM je lahko posledica lipofilnih snovi, pretežno prisotnih (npr. β -sitosterol in stigmaterol) v DCM izvlečku žajblja, ki imajo dokazan fiziološki učinek, hkrati pa tudi fizikalni učinek (Šmid-Korbar in Kristl, 1998). Lipofilne snovi imajo skupno to lastnost, da podporno delujejo na lipidno bariero (pregrado) kože (nadomeščajo naravno prisotne lipide v *stratum corneum*) in jo površinsko zaščitijo pred vplivom zunanjih dejavnikov – na površini kože tvorijo barierno plast (delujejo pokrovno), ki preprečuje izgubo vode z izhlapevanjem (zmanjša se TEWL). Torej lipofilne snovi kože ne vlažijo na način, da črpajo vodo iz globlje ležečih plasti kože (dober vir fiziološko prisotne vode) ali zunanjega okolja, ampak podporno delujejo na lipidno bariero kože in s tem vzpostavljajo ravnovesje vlage v koži (vlažilni učinek). Lipofilne snovi kožo tudi mehčajo, gladijo (emolientni učinek) in blažijo manjše gubice (Bolko, 2012; Lautenschläger, 2004). Zaradi emolientnega učinka kožo tudi pomirjajo in preprečujejo njeno srbenje (simptom suhe kože je lahko tudi srbenje), ki prizadeto osebo sili k praskanju in poškodbi kože (Ahlin Grabnar, 2011; Proksch in Lachapelle, 2005). Značilno manjši TEWL po nanosu MeOH je lahko posledica prisotnosti hidrofobnih fenolnih diterpenov (npr. karnozol in karnozolna kislina), za katere domnevamo, da se nahajajo v MeOH izvlečku žajblja in bi lahko zadrževali vlago v koži (Leskovar, 2007; Lovrec, 2009).

Ugotovili smo, da imajo vse prostovoljke zdravo (TEWL vrednost 10 – 15) oziroma zelo zdravo kožno bariero (TEWL vrednost 0 – 10).

Variabilnosti v bazalnem TEWL med prostovoljkami in glede na mesto nanosa so posledica nehomogene (neenakomerne) kože oseb. Spremenljivke kot anatomsko mesto (preiskovana površina), starost, temperatura kože, prehranske navade prostovoljk, okolja (temperatura, relativna vlažnost, kroženje zraka) imajo velik vpliv na bazalni TEWL. Večji bazalni TEWL pri placebo je posledica meritev, ki so bile izmerjene vedno na istem anatomskem mestu, zelo blizu zapestja. Za to mesto je značilno, da ima koža manjši obseg podkožnega tkiva, površina kože ima manj hidrolipofilnega sloja, koža je tanjša in bolj občutljiva. To je razlog, da je na tem mestu izguba vode kože večja (večji TEWL).

Ugotovili smo, da se v povprečju TEWL po nanosu formulacij v času 30 in 60 minut mejno spremeni. Kaže se trend linearnega zmanjšanja TEWL s časom po nanosu formulacij.

Ugotovili smo, da obstaja značilna razlika v povprečju TEWL med D in L roko. V povprečju je TEWL večji na desni roki.

5.3 SPREMEMBA HIDRATACIJE KOŽE

Ugotovili smo, da formulaciji DCM in MeOH značilno zmanjšata TEWL, pozitivne rezultate smo pričakovali tudi pri meritvah hidratacije kože. Rezultat je presenetljiv, saj k ustrezni kožni barieri največ prispeva ustrezna hidratacija kože (Zvonar, 2013a) in izvlečka žajblja vsebujeta številne hidrofilne in lipofilne snovi, ki bi lahko imele vlažilni učinek. Statistično neznačilne spremembe v povečani hidrataciji kože zaradi aplikacije formulacij z DCM ali MeOH izvlečkom žajblja so lahko posledica izgube aktivne sestavine skozi proces ekstrakcije, neenakomernega vpivanja formulacij v kožo, izvedbe in razmer testiranja, kot je okolje (temperatura, relativna vlažnost, kroženje zraka), napake meritve (nemirne roke prostovoljca in izvajalca meritve) in spremenljivk povezanih z instrumentom. Ugotovimo, podobno kot v predhodni študiji Gobec (2014), da hidratacija ni edini dejavnik, ki vpliva na barierno funkcijo kože.

Ugotovili smo, da je povprečna bazalna hidratacija kože prostovoljk zelo majhna in kaže na zelo suho stanje kože (arbitrarne vrednosti manjše od 30). Razlog za slabo hidratirano kožo prostovoljk je lahko sezonski vpliv, saj smo meritve izvajali v zimskem obdobju, ko je značilna nizka zračna vlaga in hladno vreme. Zimsko obdobje že dolgo časa povezujejo z zmanjšano hidratacijo kože.

Opazne razlike v bazalnih vrednostih hidratacije kože med prostovoljkami so posledica endogenih dejavnikov (temperatura kože, starost, prehranske navade, anatomsko mesto (preiskovana površina), dejavnikov okolja (temperatura, relativna vlažnost, kroženje zraka) in same izvedbe meritev (nemirne roke prostovoljca in merilca).

Ugotovili smo, da se v povprečju hidratacija kože po nanosu formulacij s časom (30 in 60 minut) linearno povečuje.

5.4 SPREMEMBA pH KOŽE

Nepomembne spremembe v pH vrednosti kože prostovoljk po nanosu formulacije MeOH lahko pripišemo antioksidativnemu (npr. rožmarinska kislina), protivnetnemu (npr. ursolna kislina in oleanolna kislina) in protimikrobnemu (npr. karnozol in karnozolna kislina) delovanju aktivne sestavine, ki dokazano preprečuje oksidativno degradacijo kože z lovljenjem prostih radikalov in ohranja normalno celovitost človeške kože. Značilne spremembe v pH kože prostovoljk po nanosu formulacije DCM lahko pripišemo vplivu podlage. Ne glede na to smo ugotovili, da se v povprečju pH kože pri vseh obravnavanih giblje znotraj sprejemljivih (normalnih) pH vrednosti človeške kože. Vrednost pH človeške kože, ki jo štejemo za normalno niha med 4,5 in 6,5, zato je pomembno, da kozmetični izdelki za nego kože ohranjajo pH kože znotraj tega območja. Rahlo kisel do nevtralen pH kože ohranja fiziološko pregrado (bariero) kože in zavira rast bakterij na njeni površini. Pogosta in dolgotrajna uporaba kozmetičnih izdelkov, ki vodijo pH kože izven rahlo

kislega območja, povzroča oslABLJENO kožno bariero, povečanje TEWL, poškodbe kože in njeno prezgodnje staranje (Zvonar, 2013b). Formulaciji DCM in MeOH ohranjata rahlo kisel do nevtralen pH kože prostovoljk in sta primerni za dermalno uporabo.

Jasne razlike v bazalnih pH vrednostih kože med prostovoljkami so posledica spremenljivk kot je starost, prehranske navade, temperatura kože, okolje (temperatura, relativna vlažnost, kroženje zraka) in anatomsko mesto (preiskovana površina).

Ugotovili smo, da se v povprečju pH po nanosu formulacij DCM in placeba v prvih 30 minutah povečuje, v zadnjih 30 minutah nismo opazili sprememb. V povprečju se pH po nanosu MeOH ne spreminja oz. se spreminja minimalno. V nadaljnjih analizah zato predlagamo meritev le v času 30 minut.

Variabilnost nekaterih rezultatov klinične študije je velika, tako pri meritvah TEWL in hidratacije kože kot pri meritvah pH kože. Na to je lahko vplivalo več dejavnikov, kot so razmere v laboratoriju (temperatura, relativna vlažnost, kroženje zraka) in način izvajanja meritev, kot so nemirne roke prostovoljca in izvajalca meritve. V laboratoriju smo poskusili zagotoviti čim bolj optimalne pogoje, temperaturo 22 – 24 °C in relativno vlažnost 40 – 60 %, vendar se motečim dejavnikom nismo uspeli popolnoma izogniti, saj sta npr. temperatura in vlažnost zraka odvisni tudi od dnevnega vremena. Poleg tega so v laboratoriju nameščene tudi druge aparature, zato je občasno vstopalo tudi drugo osebje in izvajalo določene meritve. Na rezultate TEWL, hidratacije in pH kože je lahko vplivalo tudi neenakomerno vpijanje formulacij v kožo, čeprav smo uporabili vedno enak način za njihov nanos. Možen vzrok je tudi odstranjevanje formulacij, s katerim smo lahko povzročili poškodbo povrhnjice ali pa je del formulacije ostal na preiskovani površini. Kot je bilo že povedano, ne moremo izvzeti niti inter- in intraindividualne variabilnosti (temperatura kože, starost), anatomskega mesta, spremenljivk povezanih z instrumentom (temperatura senzorja, teža merilne celice) in formulacij. V nadaljnjih analizah je smiselno, da se klinična študija izvede na večjem številu prostovoljcev z večjim številom meritev. Večji vzorec bi vsekakor izboljšal zanesljivost dobljenih rezultatov.

6 SKLEPI

Formulaciji DCM in MeOH z 2,5 % izvlečkom žajblja imata poltrdno konsistenco, sta svetlo zelene in imata rahel vonj po žajblju. To potrjuje sprejemljivost formulacij za uporabnike.

Formulaciji z DCM in MeOH izvlečkom žajblja statistično značilno zmanjšata TEWL kože, vendar se v povprečju ne razlikujeta med seboj. Hipoteza, da izvleček žajblja zmanjša transepidermalno izgubo vode (TEWL) je bila s tem potrjena, pri tem pa ni pomembno ali uporabimo DCM ali MeOH izvleček žajblja.

Obstaja statistično značilna razlika v povprečnem TEWL med D in L roko. V povprečju je TEWL večji na desni roki. Za nadaljnje analize je pomembno, da meritve izvajamo vedno na isti roki (D roki ali L roki).

Formulaciji z DCM in MeOH izvlečkom žajblja statistično značilno ne povečata hidracije kože. Vendar je v povprečju hidracija večja pri MeOH kot pri DCM. Hipoteza, da izvleček žajblja izboljša hidracijo kože s tem še ni bila potrjena. Predlagamo nadaljnje analize.

TEWL in hidracija kože nista neposredno povezana, čeprav je znano, da k zdravi kožni barieri največ prispeva hidracija, imajo pa vpliv še drugi dejavniki.

V povprečju formulacija DCM statistično značilno poveča pH kože glede na formulaciji MeOH in placebo. Statistično značilne spremembe v povprečju pH kože pri formulaciji MeOH nismo opazili. Sicer nobena uporabljena formulacija ni povzročila tako velikih sprememb pH kože prostovoljk, ki bi vodile izven sprejemljivih pH vrednosti človeške kože. Hipoteza, da izvleček žajblja ohranja rahlo kisel do nevtralen pH človeške kože je bila s tem potrjena.

V povprečju se hidracija in pH kože po nanosu formulacij s časom statistično značilno povečujeta, povprečni TEWL se s časom minimalno zmanjšuje.

Bazalne vrednosti TEWL, hidracije in pH kože so zaradi nehomogene kože oseb med prostovoljkami in glede na preiskovano površino (mesto nanosa vzorcev) zelo različne.

Kozmetično vrednost izvlečka žajblja je treba nadalje raziskovati z uporabo različnih topil in z različnimi vrstami formulacij. Zanesljivost dobljenih rezultatov pa je mogoče izboljšati z načrtovanim poskusom po principu slučajnosti za poskusno zasnov, večjim številom meritev in ne nazadnje večjim številom prostovoljcev.

Razvoj znanosti nam je šele v zadnjih letih omogočil uporabo močnih raziskovalnih orodij, zato smo lahko prepričani, da so pred nami še pomembna odkritja delovanja pripravkov z izvlečkom žajblja na kožo.

Pomembnost zdravilnih rastlin v kozmetičnih izdelkih (pripravkih) vztrajno raste. Za izbrano zdravilno rastlino, ki jo želimo vključiti v kozmetični pripravek je pomembno, da podpira in ohranja fiziološko delovanje kože.

7 POVZETEK

Suha koža je le stanje kože, ki se pojavi in zopet lahko izzveni ob ustrezni negi. Način s katerim lahko ustrezno negujemo in ohranjamo normalno stanje kože je tudi uporaba negovalnih kozmetičnih izdelkov.

Namen magistrske naloge je bil oblikovati in kozmetično vrednotiti kozmetični pripravek za vlaženje kože, s katerim želimo zmanjšati izhlapevanje vlage iz kože in izboljšati njeno hidracijo. V pripravek smo dodali izvleček žajblja (*Salvia officinalis* L.) kot kozmetično aktivno sestavino, za katero je znano, da ima pozitivne učinke na kožo.

Razvoj našega izdelka se je v prvi vrsti pričel z izdelavo suhega izvlečka žajblja (*Salvia officinalis* L.) po Soxhletovem postopku, z dvema različnima organskima topiloma, diklormetanom (DCM) za ekstrakcijo bolj lipofilnih spojin in metanolom (MeOH) za ekstrakcijo bolj hidrofilnih spojin. Delo je potekalo na Oddelku za agronomijo na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani, v laboratorijih Katedre za aplikativno botaniko, ekologijo, fiziologijo rastlin in informatiko.

Iz laboratorijev Biotehniške fakultete smo izvlečka žajblja nato prenesli na Fakulteto za farmacijo, kjer smo ju vgradili v ustrezno podlago. Za vrednotenje kozmetične učinkovitosti smo izdelali tri različne vzorce. Prva dva vzorca sta vsebovala različna izvlečka žajblja, ki sta se razlikovala glede na uporabljeno topilo pri ekstrakciji, tretji vzorec je predstavljal placebo. Vzorci so bili podvrženi kozmetičnim testom učinkovitosti na 12-tih prostovoljkah. Rezultati teh testov so nam podali vrednosti o učinkovitosti izdelkov glede na TEWL, hidracijo in pH kože. Rezultati testiranj so temeljili na meritvah s pomočjo Tewameter® TM 300, Corneometer® CM 825 in Skin-pH-Metera®

Tewameter® TM 300 meri izgubo vode skozi roženo plast kože. Corneometer® CM 825 meri hidracijo površine kože oz. rožene plasti (15 μm). Skin-pH-Meter® meri pH vodne raztopine na površini kože, ki jo tvori koža s svojimi izločki in vsebnostjo vlage.

Rezultati analize variance so pokazali, da se TEWL po nanosu formulacij DCM (95 % interval zaupanja od 0,58 do 1,18 $\text{g m}^{-2} \text{h}^{-1}$) in MeOH (95 % interval zaupanja od 0,52 do 1,11 $\text{g m}^{-2} \text{h}^{-1}$) statistično značilno zmanjša. Hipoteza, da izvleček žajblja vpliva na zmanjšano transepidermalno izgubo vode (TEWL) je bila s tem potrjena. Formulaciji z DCM in MeOH izvlečkom žajblja statistično značilno ne povečata hidracije kože. Hipoteza, da izvleček žajblja izboljša hidracijo kože s tem še ni bila potrjena. Rezultati statistične analize so potrdili še tretjo hipotezo, in sicer da izvlečka žajblja ohranjata rahlo kisel do nevtralen pH (4,5 – 6,5) človeške kože.

Kozmetično vrednost izvlečka žajblja je treba nadalje raziskovati z uporabo različnih topil in različnimi vrstami formulacij.

Razvoj znanosti nam je šele v zadnjih letih omogočil uporabo močnih raziskovalnih orodij, zato smo lahko prepričani, da so pred nami še pomembna odkritja delovanja pripravkov z izvlečkom žajblja na kožo.

8 VIRI

- Abu-Darwish M. S., Cabral C., Ferreira I. V., Gonçalves M. J., Cavaleiro C., Cruz M.T., Al-bdour T. H., Salgueiro L.. 2013. Essential oil of common sage (*Salvia officinalis* L.) from Jordan: assessment of safety in mammalian cells and its antifungal and anti-inflammatory potential. BioMed Research International, 2013: 538940, doi: 10.1155/2013/538940: 9 str.
- Ahlin Grabnar P. 2011. Lipofilne setavine kozmetičnih izdelkov. Kozmetični izdelki I. Študijsko gradivo za Kozmetologijo. Ljubljana, Fakulteta za farmacijo: 40 str. (gradivo razdeljeno na predavanjih)
- Ahlin Grabnar P. 2012. Učinkovitost kozmetičnih izdelkov. Uvod v kozmetologijo. Študijsko gradivo za Kozmetologijo. Ljubljana, Fakulteta za farmacijo: 39 str. (gradivo razdeljeno na predavanjih)
- Alonso J. 2004. Tratado de Fitofarmacos y Nutraceuticos. Barcelona, Asunto Impreso: 1350 str.
- Anthoine P., Aubert L. 1990. Vegetable extract-based cosmetic or pharmaceutical composition which acts on capillary brittleness. US 4942033 A. Paris, L'oreal: 5 str. <http://www.google.com/patents/US4942033> (9.9.2014)
- Baričevič D. 1996. Rastlinske droge in njihovi sekundarni metaboliti – surovina rastlinskih zdravilnih pripravkov. 1. izd. Ljubljana, samozaložba: 81 str.
- Baričevic D., Sosa S., Della Loggia R., Tubaro A., Simonovska B., Krasna A., Zupancic A., 2001. Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. Journal of Ethnopharmacology, 75, 2-3: 125–132
- Barbinta-Patrascu M. E., Bunghez I. R., Iordache S. M., Badea N., Fierascu R. C., Ion R. M. 2013. Antioxidant properties of biohybrids based on liposomes and sage silver nanoparticles. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 13, 3: 2051–2060
- Barel A. O., Paye M., Maibach H. I. 2006. Handbook of Cosmetic Science and Technology. 3rd ed. New York, Informa Healthcare: 869 str.
- Bartenijev I., Rogl Butina M. 2011. Zgradba in funkcije kože. V: Kozmetologija I. Trendi na področju kozmetičnih izdelkov: učinkovitost in varnost sestavin. Kočever Glavač N., Zvonar A. (ur.). Ljubljana, Fakulteta za farmacijo: 1-5 str.
- Baumgartner S., Zvonar A. 2013. Kozmetični izdelki I: Vaje in teoretične osnove. Ljubljana, Fakulteta za farmacijo: 148 str.
- Benaiges A., Guillen P. 2007. Botanical extracts. V: Analysis of Cosmetic Products. Salvador A., Chisvert A. (eds.). 1st ed. London, Elsevier: 345–363
- BHMA: British Herbal Medicine Association. British Herbal Compendium. 2006. Sage Leaf – *Salvia officinalis* folium. V: British Herbal Compendium, a handbook of scientific information on widely used plant drugs. Companion to the British Herbal

- Pharmacopoeia. Bradley P. (ed.). Bournemouth, British Herbal Medicine Association, 2: 339–344
- Bolko K. 2012. Kozmetični izdelki za aktivno vlaženje kože: mehanizem delovanja, učinkovitost in varnost. V: Kozmetologija II. Koža in sonce: kozmetično aktivne setavine. Izdelki za zaščito in aktivno nego kože. Kočevar Glavač N., Zvonar A. (ur.). Ljubljana, Fakulteta za farmacijo Fakulteta za farmacijo: 49–59
- Celi Garcia C. S., Roesch E. M., Adelfo Wasum R., de Antoni Zoppa B. C.; Wollheim C., Neves G. Â., Angeli V. W., Borges de Souza K. C. 2012. Assessment of *Salvia officinalis* (L.) hydroalcoholic extract for possible use in cosmetic formulation as inhibitor of pathogens in the skin. Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences, 33, 4: 509-514
- Courage + Khazaka. 2003a. Information operating instruction for the Tewameter® TM 300 Stand-alone and with software. Koln, CK electronic GmbH: 38 str.
- Courage + Khazaka. 2003b. Information operating instruction for the Corneometer® CM 825 Stand-alone and with software. Koln, CK electronic GmbH: 34 str.
- Courage + Khazaka. 2003c. Skin-pH-Meter®. V: Information operating instruction for the derma unit SSC 3. Sebumeter®, Corneometer®, Skin-pH-Meter® and the Skin-pH-Meter® PH 905 Stand-alone and with software. Koln, CK electronic GmbH: 15-43
- Cuvelier M. E., Berset C., Richard H. 1994. Antioxidant constituents in sage (*Salvia officinalis*). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42, 3: 665–669
- Ehrnhöfer-Ressler M. M., Fricke K., Pignitter M., Walker J. M., Walker J., Rychlik M., Somoza V. 2013. Identification of 1,8-cineole, borneol, camphor, and thujone as anti-inflammatory compounds in a *Salvia officinalis* L. infusion using human gingival fibroblasts. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61, 14: 3451–3459
- EMA: European Medicines Agency: Assessment report on *Salvia officinalis* L., folium and *Salvia officinalis* L., aetheroleum. 2010. London, European Medicines Agency: 39 str.
- Flavex Natur. 2013. Sage leaf CO2-extract with 5% ursolic/oleanolic acid - an anti-aging ingredient to treat stressed skin conditions. Rehlingen, Flavex Naturextrakte GmbH: 2 str.
<http://www.newsletter-manager.de/data/flavexcms1105/newsletter/1esage.pdf>.
(26.1.2013)
- Formularium Slovenicum. 2011. Formularium Slovenicum 3.0: slovenski dodatek k Evropski farmakopeji = Slovenian national formulary to the European pharmacopoeia - FS 3.0. Tekavčič Glover T. (ur.). 3rd ed. Ljubljana, Javna agencija Republike Slovenije za zdravila in medicinske pripomočke: 86–93, 534 str.
- Gäspérin M. 2001. Nega starejše in izsušene kože. Herbika, 2, 5: 40–41

- Gerard D, Quirin K-W, Schwarz E. 1995. CO₂-Extracts from rosemary and sage– effective natural anti-oxidants. *International Food Marketing and Technology*, 9: 46-55
- Gediya S. K., Mistry R. B., Patel U. K., Blessy M., Jain H. N. 2011. Herbal plants: used as a cosmetics. *Journal of Natural Product and Plant Resource*, 1, 1: 24–32
- Gobec P. 2014. Vpliv različnih vlažilnih krem na hidratacijo kože in transepidermalno izgubo vode. Ljubljana, Gobec P.: 37 str.
- Kennedy D. O., Scholey A. B. 2006. The psychopharmacology of European herbs with cognition-enhancing properties. *Current Pharmaceutical Design*, 12: 4613–4623
- Kokalj M. 2013. Žajbelj (*Salvia officinalis* L.).
<http://www2.arnes.si/~mborion4/fkg/seminar/salvia.htm#li> (17.9.2013)
- Koračin B. J. 2015. Koža.
<http://www.prvalekarna.com/clanki/koza> (18.6.2015)
- Kristl J. 2015. Koža – zgradba in dogajanja v njej. Ljubljana, Fakulteta za farmacijo: 17 str.
http://studentski.net/gradivo/ulj_ffa_kz1_ki1_sno_koza_03__zgradba_in_dogajanja_v_njej?r=1 (25.4.2015)
- Lautenschläger H. 2004. Whitening – Heller Teint erwünscht. *Kosmetik International*, 4: 45–47
- Lee C. J., Chen L. G., Chang T. L., Ke W. M., Lo W. I., Wang C. C.. 2011. The correlation between skin-care effects and phytochemical contents in Lamiaceae plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 124, 3: 833–841
- Lexobaza: Lexobaza hydrophobe basiscreme. 2015. Lexobaza hydrophobe basiscreme. Povzetek glavnih značilnosti. Koper, Lex d.o.o.: 2 str.
http://lexarna.si/media/uploads/public/_custom/SMPC_Lexobaza_Hbaq_-_tisk.pdf. (2.12.2014)
- Lackovič M. 2015. Dejstva o koži.
<http://www.vitafit.si/wp-content/uploads/2013/01/ko%C5%BEEa.jpg> (25.5.2015)
- Leskovar D. 2007. Segmentiranje uporabnic medicinske kozmetike. Magistrsko delo. Maribor, Novo mesto; Leskovar D.: 112 str.
- Lovrec M. 2009. Razvoj in validacija HPLC-UV metode za sočasno določanje izbranih hidroksicimetnih kislin v vzorcu vina. Maribor, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 64 str.
- Machado M, Bronze M. R., Ribeiro H. 2007. New cosmetic emulsions for dry skin. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 6: 239 – 242
- Madhuri Reddy P., Gobinath M., Mallikarjuna R. K., Venugopalaiah P., Reena N. 2011. A review on importance of herbal drugs in cosmetics. *International Journal of Advances in Pharmacy and Nanotechnology*, 1, 3: 121–139

- Masuda T., Inaba Y., Maekawa T., Takeda Y., Tamura H., Yamaguchi H. 2002. Recovery mechanism of the antioxidant activity from carnosic acid quinone, an oxidized sage and rosemary antioxidant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 50, 21: 5863–5869
- Nickvar B., Kamalinejad M., Izadpanah H. 2007. In vitro free radical scavenging activity of five *Salvia* species. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 20, 4: 291-294
- Offord E. A., Gautier J. C., Avanti O., Scaleta C., Runge F., Kramer K., Applegate L. A. 2002. Photoprotective potential of lycopene, β -carotene, vitamin E, vitamin C and carnosic acid in UVA-irradiated human skin fibroblasts. *Free Radical Biology Medicine*, 32, 12: 1293–1303
- Oyediji F. O. in Okeke I. E. 2010. Comparative analysis of moisturising creams from vegetable oils and paraffin oil. *Research Journal of Applied Sciences*, 5,3: 157–160
- Oliveira K. B., Palú É., Weffort-Santos A. M., Oliveira B. H. 2012. Influence of rosmarinic acid and *Salvia officinalis* extracts on melanogenesis of B16F10 cells. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23, 2: 249-258
- Ph. Eur.: European Pharmacopoeia. 2008. European Pharmacopoeia. 6th ed. Strasbourg, Council of Europe: 5037 str.
- Proksch E., Lachapelle J.M. 2005. The management of dry skin with topical emollients – recent perspectives. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 3: 768–774
- Ramasamy I. 2011. Herbs for beauty care. Lawrence, AgriInfoTech: 3 str.
<http://www.agriinfotech.com/htmls/PDF-Files/HERBS/Cosmetic%20Herbs.pdf> (15. 5.2015)
- Rajkot G. 2010. A review on herbs: as therapeutics and cosmetics. *International Journal of Pharmacy and Life Sciences*, 1, 4: 197-202
- R Core Team. 2015. R Core Team computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. R: A language and environment for statistical URL <http://www.R-project.org/>.
- Reuter J., Jocher A., Hornstein S., Schulte-Mönting J., Schempp C.M. 2007. Sage extract rich in phenolic diterpenes inhibits ultraviolet-induced erythema *in vivo*. *Planta Medica*, 73, 11: 1190–1191
- Rogiers V. 2001. Guidance for the assessment of transepidermal water loss in cosmetic science. *Skin Pharmacology Applied Skin Physiology*, 14, 2: 117-128
- Rozman B., Gašperlin M. 2009. Vitamin C in njegovi derivati v farmacevtskih in kozmetičnih izdelkih. V: Prehranska dopolnila I. Minerali in Vitamini. Podiplomsko izobraževanje. Vovk T., Obreza A. (ur.). Ljubljana, Fakulteta za farmacijo: 77–82
- Sage. 2006. Sage. Barcelona, Provital Group: 5 str.
<http://www.centerchem.com/Products/DownloadFile.aspx?FileID=6925> (17.3.2015)

- Sage extract. 2013. Sage extract H.GL.-M.S. Barcelona, Provital Group.
<http://www.innovadex.com/PersonalCare/Detail/3914/71614/Sage-Extract-HGL-MS>
(9.12.2013)
- Soxhlet extractor. 2015. Soxhlet extractor. Wikipedia.
https://en.wikipedia.org/wiki/Soxhlet_extractor (20.5.2015)
- Strzalka M., Chwedoruk D., Halas L., Janeczko Z. 2011. Chemical composition of essential oils found in selected *Salvia* species. SOFW Journal. International Journal for Applied Science, 8: 18–29
- Svobodova A., Psotova J., Walterova D., 2003. Natural phenolics in the prevention of UV–induced skin damage. Biomedical Papers, 147, 2: 137–145
- Šmid-Korbar J., Kristl J. 1998. Kritičen pregled na naravne kozmetične izdelke. Farmacevtski vestnik., 49: 3–7
- Tlaker Žunter V. 2015. Nega suhe in občutljive kože. Ljubljana, Univerzitetni klinični center.
http://hisa-zdravja.si/clanki_in_nasveti/nega_koze/ (10.2.2015)
- Vovk T. 2012. Antioksidanti in vitamini v izdelkih za nego kože, izpostavljene ultravijoličnim žarkom. V: Kozmetologija II. Koža in sonce: kozmetično aktivne setavine. Izdelki za zaščito in aktivno nego kože. Strokovno izobraževanje. Kočever Glavač N., Zvonar A. (ur.). Ljubljana, Fakulteta za farmacijo: 61–72
- Zakon o kozmetičnih proizvodih. 2013. Ur.l. RS, št. 91/03.
<http://www.pisrs.si/Pis.web/pregledPredpisa?id=ZAKO1378> (19.5.2015)
- Zvonar A. 2013a. Hidracija kože in TEWL. Vsebina predavanj predmeta Vrednotenje kozmetičnih izdelkov. Kozmetologija. Ljubljana, Fakulteta za farmacijo: 59 str. (gradivo razdeljeno na predavanjih)
- Zvonar A. 2013b. Pomen in vrednotenje pH in površinskih lipidov kože. Vsebina predavanj predmeta Vrednotenje kozmetičnih izdelkov. Študijsko gradivo za program Kozmetologija. Ljubljana, Fakulteta za farmacijo: 31 str. (gradivo razdeljeno na predavanjih)
- Wagner T. 1980. Pridelovanje zdravilnih rastlin. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 169 str.
- Weckesser S., Engel K., Simon-Haarhaus B., Wittmer A., Pelz K., Schempp CM. 2007. Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. Phytomedicine, 14, 7–8: 508–516

ZAHVALA

Na tej strani bi se zahvalila mentorici prof. dr. Dei BARIČEVIČ in somentorici prof. dr. Mirjam GAŠPERLIN, ki sta kljub svojemu polnemu urniku priskočili na pomoč in mi pomagali pri izdelavi tega magistrskega dela.

Zahvala tudi recenzentki prof. dr. Zlati LUTHAR, dr. Karmen STOPAR, ter predsedniku komisije prof. dr. Gregorju OSTERCU, ki so delo natančneje pregledali.

Za svetovanje in pomoč pri statistični obdelavi podatkov se zahvaljujem docentki dr. Damijani KASTELIC.

Posebna zahvala pa seveda staršem, fantu, sestri in bratu, ki so mi vedno stali ob strani in mi omogočili brezskrbni študij.

Hvala tudi vsem sošolcem in prijateljem, ki so pripomogli k temu, da bodo moja študentska leta ostala v lepem spominu.

Priloga A

Podatki klinične študije meritev TEWL, hidratacije in pH kože

Oseba	Roka	Krema	Mesto	Čas meritve	Tewl	Hidratacija	pH
1056	L	DMC	1	0	6	32,1	4,95
1056	L	MeOH	2	0	6,2	37,75	4,75
1056	L	placebo	3	0	7	35	4,5
1056	L	DMC	1	30	5,7	24,3	4,9
1056	L	MeOH	2	30	6,6	26,13	4,74
1056	L	placebo	3	30	6,4	26,15	4,99
1056	L	DMC	1	60	6	38,2	4,94
1056	L	MeOH	2	60	6,2	41,3	4,83
1056	L	placebo	3	60	7,2	43,3	5,07
1056	D	DMC	4	0	6,5	24,4	5,57
1056	D	MeOH	5	0	9,5	22,25	5,49
1056	D	placebo	6	0	9,5	26,45	3,98
1056	D	DMC	4	30	6,9	30,45	5,34
1056	D	MeOH	5	30	7,4	33,75	5,11
1056	D	placebo	6	30	8,7	33,9	5,46
1056	D	DMC	4	60	7,9	33,05	5,26
1056	D	MeOH	5	60	7,5	33,4	5,02
1056	D	placebo	6	60	8,8	33,45	5,22
1057	L	DMC	7	0	6,3	26,1	5,38
1057	L	MeOH	8	0	7,5	22,65	5,58
1057	L	placebo	9	0	7,7	23,45	5,61
1057	L	DMC	7	30	5,1	31	5,11
1057	L	MeOH	8	30	7,7	28,97	5,01
1057	L	placebo	9	30	8,1	29,1	5,66
1057	L	DMC	7	60	6,2	30,8	5,29
1057	L	MeOH	8	60	5,6	29	4,92
1057	L	placebo	9	60	8	28,85	5,24
1057	D	DMC	10	0	7	23,05	5,79
1057	D	MeOH	11	0	6,9	22,4	5,77
1057	D	placebo	12	0	9,4	25,35	5,81
1057	D	DMC	10	30	7	25,9	5,63
1057	D	MeOH	11	30	7,5	26	5,04
1057	D	placebo	12	30	8,1	19,47	5,54
1057	D	DMC	10	60	6,2	29,6	5,88
1057	D	MeOH	11	60	6,6	29,45	5,3
1057	D	placebo	12	60	8,4	30,05	5,7
1058	L	DMC	13	0	6,1	22,18	5,08
1058	L	MeOH	14	0	5,4	24,43	5,27

1058	L	placebo	15	0	7	22,7	5,09
1058	L	DMC	13	30	5,3	30,95	5,25
1058	L	MeOH	14	30	5,6	29,3	5,01
1058	L	placebo	15	30	5,9	29,95	5,42
1058	L	DMC	13	60	6,2	28,83	5,3
1058	L	MeOH	14	60	5,9	27,95	5,06
1058	L	placebo	15	60	6,9	18,97	5,54
1058	D	DMC	16	0	7,2	21,85	5,05
1058	D	MeOH	17	0	6,7	26,4	4,89
1058	D	placebo	18	0	7,2	28,2	4,62
1058	D	DMC	16	30	6,8	29,7	5,38
1058	D	MeOH	17	30	6,7	32,15	5,11
1058	D	placebo	18	30	6,3	30,4	4,94
1058	D	DMC	16	60	6,1	30,5	5,48
1058	D	MeOH	17	60	6,2	34	5,02
1058	D	placebo	18	60	7,3	31,95	5,15
1059	L	DMC	19	0	8,3	20,1	5,8
1059	L	MeOH	20	0	7,3	20,47	5,67
1059	L	placebo	21	0	7,2	23,65	5,47
1059	L	DMC	19	30	7,4	24,7	5,79
1059	L	MeOH	20	30	7,9	26	5,38
1059	L	placebo	21	30	7,6	27	5,71
1059	L	DMC	19	60	7,7	26,05	5,8
1059	L	MeOH	20	60	7,9	25,5	5,58
1059	L	placebo	21	60	7,3	26,6	5,71
1059	D	DMC	22	0	6	23,9	5,54
1059	D	MeOH	23	0	7,4	24,75	5,6
1059	D	placebo	24	0	7,4	24,75	5,67
1059	D	DMC	22	30	7,3	26,35	5,77
1059	D	MeOH	23	30	6,7	28,35	5,29
1059	D	placebo	24	30	8,1	33,3	5,8
1059	D	DMC	22	60	7,5	28,83	5,69
1059	D	MeOH	23	60	6,4	28,25	5,47
1059	D	placebo	24	60	7,4	28,15	5,66
1060	L	DMC	25	0	6,8	30,5	4,82
1060	L	MeOH	26	0	8,5	33,45	4,51
1060	L	placebo	27	0	8,1	33,5	4,72
1060	L	DMC	25	30	8,4	23,75	5,2
1060	L	MeOH	26	30	6,9	38,3	4,95
1060	L	placebo	27	30	8,9	40,4	4,98
1060	L	DMC	25	60	7,8	41,7	5,19
1060	L	MeOH	26	60	8,4	40,6	4,88

1060	L	placebo	27	60	8,4	39,85	4,81
1060	D	DMC	28	0	9,1	30,85	4,75
1060	D	MeOH	29	0	7,1	31,5	4,71
1060	D	placebo	30	0	7,1	30,35	4,67
1060	D	DMC	28	30	8,2	31,55	5,14
1060	D	MeOH	29	30	7,2	33,55	4,91
1060	D	placebo	30	30	8,3	38,65	5,17
1060	D	DMC	28	60	9,1	35,6	4,92
1060	D	MeOH	29	60	8,5	35,7	4,92
1060	D	placebo	30	60	10,2	34,15	4,93
1061	L	DMC	31	0	8,4	46,05	5,34
1061	L	MeOH	32	0	6	44,1	5,01
1061	L	placebo	33	0	8	41,65	4,76
1061	L	DMC	31	30	8,5	29,95	5,58
1061	L	MeOH	32	30	7,7	35,2	5,08
1061	L	placebo	33	30	8,2	36,2	5,08
1061	L	DMC	31	60	7,6	39,8	5,72
1061	L	MeOH	32	60	6,5	36,43	5,46
1061	L	placebo	33	60	8,1	35,1	5,12
1061	D	DMC	34	0	7,5	42,8	4,75
1061	D	MeOH	35	0	6,7	42,35	4,72
1061	D	placebo	36	0	7,2	47,05	4,72
1061	D	DMC	34	30	6,5	34,3	4,94
1061	D	MeOH	35	30	8,3	33,3	4,82
1061	D	placebo	36	30	8,4	35,63	5,12
1061	D	DMC	34	60	8,3	45,87	5,13
1061	D	MeOH	35	60	7,7	46,1	5
1061	D	placebo	36	60	8,3	46,4	5,13
1062	L	DMC	37	0	5,40	23,00	5,30
1062	L	MeOH	38	0	5,7	29,15	5,21
1062	L	placebo	39	0	5,80	25,95	4,87
1062	L	DMC	37	30	5,60	30,80	5,51
1062	L	MeOH	38	30	5,10	33,20	5,20
1062	L	placebo	39	30	6,40	30,50	5,25
1062	L	DMC	37	60	5,60	27,95	5,75
1062	L	MeOH	38	60	6,00	28,80	5,33
1062	L	placebo	39	60	5,20	30,70	5,46
1062	D	DMC	40	0	5,80	21,90	5,01
1062	D	MeOH	41	0	5,80	24,80	4,95
1062	D	placebo	42	0	6,60	23,05	4,83
1062	D	DMC	40	30	5,60	28,50	5,35
1062	D	MeOH	41	30	6,40	28,85	5,04

1062	D	placebo	42	30	6,40	29,55	5,28
1062	D	DMC	40	60	6,50	24,05	5,29
1062	D	MeOH	41	60	6,20	25,90	5,13
1062	D	placebo	42	60	6,80	29,77	
1063	L	DMC	43	0	8,2	24,2	5,31
1063	L	MeOH	44	0	8,40	32,1	5,01
1063	L	placebo	45	0	8,8	36,4	4,95
1063	L	DMC	43	30	7,50	26,1	5,47
1063	L	MeOH	44	30	7,90	27,8	5,22
1063	L	placebo	45	30	8,50	36,6	5,47
1063	L	DMC	43	60	7,10	32	5,60
1063	L	MeOH	44	60	6,70	35,35	5,25
1063	L	placebo	45	60	7,90	39	5,30
1063	D	DMC	46	0	8,10	32,85	5,04
1063	D	MeOH	47	0	8,00	32,75	5,03
1063	D	placebo	48	0	10,30	30,10	5,00
1063	D	DMC	46	30	7,40	22,65	5,42
1063	D	MeOH	47	30	8,00	26,1	5,14
1063	D	placebo	48	30	9,20	30,7	5,39
1063	D	DMC	46	60	7,80	36,8	5,48
1063	D	MeOH	47	60	6,90	35,65	5,04
1063	D	placebo	48	60	8,70	37,3	
1064	L	DMC	49	0	8,2	33,25	5,00
1064	L	MeOH	50	0	9,2	32,40	4,38
1064	L	placebo	51	0	10,4	33,38	4,20
1064	L	DMC	49	30	7	31,15	5,49
1064	L	MeOH	50	30	8,4	37,75	4,91
1064	L	placebo	51	30	10,1	35,35	4,75
1064	L	DMC	49	60	8,6	29,75	5,50
1064	L	MeOH	50	60	7,9	35,80	4,92
1064	L	placebo	51	60	8,8	36,17	4,82
1064	D	DMC	52	0	7,5	28,15	4,19
1064	D	MeOH	53	0	9,8	29,90	4,21
1064	D	placebo	54	0	11,4	31,85	3,98
1064	D	DMC	52	30	7	29,95	4,87
1064	D	MeOH	53	30	6,7		4,59
1064	D	placebo	54	30	9,4	39,70	4,52
1064	D	DMC	52	60	9,6	37,86	4,71
1064	D	MeOH	53	60	6,4	36,60	4,64
1064	D	placebo	54	60	8,9	35,80	4,75
1065	L	DMC	55	0	5,00	28,70	4,95
1065	L	MeOH	56	0	5,00	26,90	4,79

1065	L	placebo	57	0	7,60	24,47	4,81
1065	L	DMC	55	30	5,50	31,80	
1065	L	MeOH	56	30	7,50	37,90	
1065	L	placebo	57	30	7,40	37,50	
1065	L	DMC	55	60	5,60	32,10	5,37
1065	L	MeOH	56	60	5,70	35,25	5,14
1065	L	placebo	57	60	5,20	35,25	5,45
1065	D	DMC	58	0	7,80	32,25	4,83
1065	D	MeOH	59	0	8,00	32,65	4,67
1065	D	placebo	60	0	8,80	29,75	4,88
1065	D	DMC	58	30	7,30	34,40	
1065	D	MeOH	59	30	8,00	35,00	
1065	D	placebo	60	30	7,70	32,90	
1065	D	DMC	58	60	6,70	36,40	5,04
1065	D	MeOH	59	60	6,90	38,70	4,86
1065	D	placebo	60	60	7,20	34,50	4,94
1066	L	DMC	61	0	6,40	25,10	
1066	L	MeOH	62	0	6,10	27,80	
1066	L	placebo	63	0	6,60	32,85	
1066	L	DMC	61	30	6,60	37,30	
1066	L	MeOH	62	30	5,50	34,95	
1066	L	placebo	63	30	6,80	39,15	
1066	L	DMC	61	60	5,40	35,40	
1066	L	MeOH	62	60	5,70	37,85	
1066	L	placebo	63	60	6,60	41,10	
1066	D	DMC	64	0	6,00	27,80	5,05
1066	D	MeOH	65	0	5,40	27,95	5,01
1066	D	placebo	66	0	7,00	34,55	4,98
1066	D	DMC	64	30	6,00	37,95	
1066	D	MeOH	65	30	6,60	37,85	
1066	D	placebo	66	30	7,50	42,90	
1066	D	DMC	64	60	5,60	38,00	5,19
1066	D	MeOH	65	60	6,40	37,55	5,14
1066	D	placebo	66	60	6,70	39,40	5,44
1067	L	DMC	67	0	5,90	15,75	5,23
1067	L	MeOH	68	0	5,40	16,45	5,02
1067	L	placebo	69	0	6,60	17,80	4,88
1067	L	DMC	67	30	5,60	21,95	
1067	L	MeOH	68	30	6,80	22,90	
1067	L	placebo	69	30	5,90	24,45	
1067	L	DMC	67	60	5,10	22,25	5,51
1067	L	MeOH	68	60	5,70	23,60	5,04

1067	L	placebo	69	60	7,50	24,55	5,32
1067	D	DMC	70	0	6,80	15,65	4,85
1067	D	MeOH	71	0	6,50	16,15	4,83
1067	D	placebo	72	0	6,00	19,15	4,88
1067	D	DMC	70	30	6,80	20,95	
1067	D	MeOH	71	30	6,90	24,35	
1067	D	placebo	72	30	6,60	26,60	
1067	D	DMC	70	60	5,10	20,70	5,33
1067	D	MeOH	71	60	4,90	23,90	5,27
1067	D	placebo	72	60	6,60	26,95	5,59