

LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
MEDICĪNAS FAKULTĀTE  
FARMĀCIJAS BAKALaura STUDIJU PROGRAMMA

**VITAMĪNU KONCENTRĀCIJAS UN ANTIOKSIDANTU  
AKTIVITĀTES IZMAIŅAS KOSMĒTISKAJĀ LOSJONĀ**

BAKALaura DARBS

Autore: **Elīna Siliņa**

Studentu apliecība: et10030

Darba vadītāja:

Dr. hab. biol., prof. Ruta Muceniece

RĪGA 2015

## ANOTĀCIJA

Pētījumā par Saules aptiekā pagatavotā „Micelārā losjona” sastāva izmaiņām lietošanas laikā, izmantojot fluorescences, absorbcijas un stabilā brīvā radikāļa DPPH mērījumu metodes, parādījām, ka losjonam nepiemīt antioksidantu aktivitāte, C un B6 vitamīnu saturs losjonā samazinās. C vitamīna koncentrācijas samazinājums novērojams pēc 7 dienām, B6 vitamīnam pēc 4 mēnešiem. Šo vitamīnu koncentrācijas turpina samazināties un pēc 6 mēnešiem C vitamīna koncentrācija ir tikai 50% no receptē pievienotā un B6 vitamīnam apmēram trešā daļa. Tas liecina, ka 6 mēnešu derīguma termiņš ir neatbilstošs, kā arī noskaidrojām, ka autofluorescences metode E un B1 vitamīnu satura mērīšanai losjonā nav piemērota.

Losjona krāsas izmaiņa liecina par sastāva izmaiņām. Tomēr aptaujas un kosmetologa novērojami apstiprina losjona labvēlīgu ietekmi uz ādu.

**Atslēgvārdi:** antioksidanti, C vitamīns, E vitamīns, B grupas vitamīni.

## **ABSTRACT**

The changes of the content of "micellar lotion" prepared in pharmacy Saules aptieka were studied by fluorescence, absorption and measurement of a stable free radical DPPH concentration methods. Obtained results showed that the lotion does not have antioxidant activity whereas vitamin C and B6 content decreases gradually with the time. Reduction of vitamin C level was recorded after 7 days, of vitamin B6 after 4 months. The vitamins concentration continued to decline and after 6 months the vitamin C concentration was only 50% but vitamin B6 content was about a third of the added in the lotion. Conclusion is that 6-month usage period of the lotion is inadequate, as well as that autofluorescence assay for the detection of E and B1 vitamin content is not suitable in the given formulation. The lotion color was changed indicating chemically modified substances. However, interviews of the users and cosmetologist confirm observed beneficial effects of the lotion on the skin.

**Key words:** antioxidant, vitamin C, vitamin E, group of vitamins B

# SATURS

APZĪMĒJUMI .....	5
IEVADS .....	6
1. LITERATŪRAS APSKATS .....	8
1.1. Micellas, liposomas un nanodaļiņas .....	8
1.2. C un E vitamīnu un antioksidantu nozīme kosmētisko līdzekļu izmantošanā.....	10
1.3. B1 un B6 vitamīni .....	12
1.4. Hialuronskābe un tās sāļi .....	12
2. MATERIĀLI UN METODEDES.....	14
2.1. Izmantotie reaģenti un iekārtas .....	14
2.2. Datu aprēķināšana .....	15
2.3. Metodes.....	15
2.3.1. DPPH tests .....	15
2.3.2. C vitamīna koncentrācijas mērīšana.....	16
2.3.3. E vitamīna koncentrācijas mērīšana.....	17
2.3.4. B1 vitamīna koncentrācijas mērīšana.....	17
2.3.5. B6 vitamīna koncentrācijas mērīšana.....	18
3. REZULTĀTI .....	20
3.1. Losjona antioksidantu aktivitāte DPPH testā.....	20
3.2. C vitamīna koncentrācijas izmaiņas losjonā.....	21
3.3. E vitamīna koncentrācijas izmaiņas losjonā .....	21
3.4. B1 vitamīna satura izmaiņas losjonā .....	23
3.5. B6 vitamīna satura izmaiņas losjonā .....	23
3.6. Losjona kvalitatīvo izmaiņu noteikšana ar organoleptisko metodi un pH mērījumi .....	24
3.7. Losjona lietotāju aptauja .....	26
DISKUSIJA .....	27
SECINĀJUMI .....	30
PATEICĪBA .....	31
IZMANTOTĀ LITERATŪRA .....	32
PIELIKUMI.....	36
Atļauja publicēt recepti “Micelārajam losjonam” .....	36

## APZĪMĒJUMI

DHAA- dehidroaskorbīnskābe

DNS- Dezoksiribonukleīnskābe

DPPH- 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikālis

In vitro- pētījums, ko veic mākslīgā barotnē

Lys hiroksilāze- ferments, kas šķeļ aminoskābi lizīnu

MAP- magnija askorbilsteāta fosfāts

MMP - matricas metaloproteināze

Per os- zāļu iekšķīgs lietošanas veids, caur muti

Pro hiroksilāze- ferments, kas šķeļ aminoskābi prolīnu

ROS- reaktīvā skābekļa substrāti

UVA- ultravioletie A stari

UVB- ultravioletie B stari

UV- ultravioletie stari

## IEVADS

Mūsdienās farmaceitiskie preparāti tiek izmantoti kosmētikā. Tāda veida kosmētika tiek izgatavota arī aptiekā kā individuālais pagatavojums. Tiek izmantotas tādas substances kā antioksidanti, C un E vitamīni, kā arī citi vitamīni, piemēram, B grupas vitamīni. Kosmētikā micelārais ūdens un losjoni ir nesen ieviests jaunums. Micellas ir molekulas klastera veids, kurā katrai molekulai ir hidrofila daļa un otra ir hidrofoba. Ūdens šķīdumā micellas sagraupējas, lai veidotu sfērisku formu ar hidrofilo galu uz ārpusi un hidrofobo uz iekšieni. Kad losjonu uzklāj uz virsmas, piemēram, ādas, micellas sfēras sadalās un atveras pret šo virsmu. Spiediena rezultātā pret ādu klastera molekula atkal aizveras un šajā procesā ievieļ sevī citas - ne ūdens molekulas, no ādas virsmas. Tā izskaidro losjonu spēju attīrīt ādu.

Micelāro ūdeni iegūst, iestrādājot tajā sīku pilienu veidā ēteriskās un tauku eļļas, un tas var saturēt arī augu ekstraktu vai vitamīnu piedevas. Tādā kosmētikas produktā nav sārmu un citu virspusēji aktīvo vielu, tomēr uzklājot uz sejas, tas labi noņem netīrumus un taukus, nebojājot epidermu. Sākotnēji micelārais ūdens tika radīts lietošanai maziem bērniem un cilvēkiem, kas cieš no psoriāzes, dermatīta un citām ādas slimībām. Tomēr drīz vien šī ūdens lieliskā iedarbība uz ādu tika pamanīta un uz tā bāzes mūsdienās ir izstrādāti daudzi kosmētiskie un ārstnieciskās kosmētikas produkti. Mūsdienās attīstoties nanomedicīnai tiek pētītas iespējas micellās ieslēgt zāles. Piemēram, ir radīts micelārais losjons ar estradiolu kā transdermālā estradiola zāļu forma.

Šajā darbā noskaidrojām Saules aptiekas radītā „Micelārā losjona”, turpmāk tekstā saukts vienkārši par losjonu, vitamīnu koncentrācijas izmaiņas no tā izgatavošanas brīža līdz derīguma termiņa beigām, kas ir 6 mēneši. Vitamīnu saturu un antioksidantu aktivitāti mērījām, pielietojot fluorescences, absorbcijas un DPPH radikāļa „ķeršanas” (*radical scavenging*) metodes. Losjona sastāvā ir substances, kas piesaista ūdeni, baro ādu un palīdz bojātas ādas reģenerācijai.

Aptiekās gatavotās zāles un citi līdzekļi parasti ir ar īsu derīguma termiņu, jo nesatur konservantus. Pētījumā izmantotais losjons ir paredzēts 6 mēnešu lietošanai un tiek fasēts 100 ml tilpumā. Pagatavotais losjons ir pildīts 100 ml baltā, necaurspīdīgā polimēra pudelē, kas pasargā no tiešas gaismas iedarbības. Losjons paredzēts lietošanai uz sejas ādas. Ir svarīgi noteikt, vai losjona lietošanas laikā notiek kādas sastāva izmaiņas, jo atverot 100 ml losjona fasējumu, kurš paredzēts lietošanai 6 mēnešus, nepārtraukti šķīdums tiek pakļauts temperatūras izmaiņām, skābekļa piekļuvei un arī mikroorganismu nokļūšanai tajā.

**Darba mērķis:**

Noskaidrot vitamīnu koncentrācijas un antioksidantu aktivitātes izmaiņas „Micelārajā losjonā” lietošanas laikā.

**Darba uzdevumi:**

1. Noskaidrot losjona antioksidantu aktivitāti un tās saglabāšanos lietošanas laikā.
2. Pētīt C, E un B grupas vitamīna satura izmaiņas losjonā laika gaitā.
3. Pētīt vitamīnu satura mērīšanas metožu atbilstību, salīdzinot izmērīto standartšķīdumus un losjonu paraugu koncentrāciju.
4. Salīdzināt losjona kvalitatīvās izmaiņas ar organoleptisku metodi un pētīt pH izmaiņas.
5. Veikt losjona lietotāju ekspresaptauju.

Pētījums veikts LU Medicīnas fakultātē, izmantojot Saules aptiekā pēc receptes pagatavoto „Micelāro losjonu”.

# 1. LITERATŪRAS APSKATS

## 1.1. Micellas, liposomas un nanodaļiņas

Koloidālās zāļu nesējsistēmas kā micelārie šķīdumi, šķīdinātāji, šķidro kristālu un nanodaļiņu disperģētās formas sastāv no 10-400 nm diametrā lielām daļiņām. Šīs tehnoloģijas izstrādājot, mērķis ir radīt zāļu „iepakošanas” un atbrīvošanās sistēmas, kas būtu netoksiskas vai ar zemu toksicitāti un kurām būtu ilgs derīguma termiņš. Tomēr koloidālās sistēmas prasa rūpīgus pētījumus, jo vielas var savstarpēji reaģēt un arī zālēm var būt ampifīlas īpašības. Piemēram, tādas ir nesteroīdajiem pretiekaisuma līdzekļiem [1].

Ampifīlas molekulas apvienojas klasteros veidojot micellas, kas rodas, ja pārsniedz kritisko micellu koncentrāciju savienojumā ar ūdens šķīdumu. Micelārie šķīdumi pastāv ne tikai ūdens, bet arī eļļu šķīdumos. Šajā gadījumā reversās micellas tiek veidotas ar virsmaktīvās vielas molekulas lipofīlo daļu pavērstu pret eļļainu nesēju un hidrofilo daļu uz iekšējo serdi. Plaši izmantots ir lecitīns, kas spēj veidot un mainīt micellas veidu dažādos šķīdinātājos. Normāli lecitīns nepastāv micellu veidā, tā vietā, kad fosfolipīdi tiek disperģēti, veidojas liposomas. Zāļu vielu molekulu disperģēšana iespējama arī parastās micellās, kas uzlabo zāļu biopieejamību, bet reversās nodrošina pakāpenisku zāļu atbrīvošanos. Pēc reversās micellas saskares ar ķermeņa ūdens šķīdumiem reversās micellas šķīdums pārvēršas šķidrā kristāliskā fāzē vai vezikulu dispersijas vidē, kas samazina izšķīdināto zāļu vielas atbrīvošanās ātrumu [1].

Šķidro kristālu fāze apvieno šķidro un cieto vielu īpašības. Šķidrums stāvoklis ir saistīts ar noplūšanas spēju, bet kristāliskā struktūra ir sakārtota kā cietvielām. Tāpēc šķidrās kristāliskās fāzes veido starposma stāvokli, ko sauc par mezofāzi. Mezofāze tiek sasniegta palielinot temperatūru vai pievienojot šķīdinātāju. Mikroskopā var redzēt ļoti dažādas formas kristālus. Dažām molekulām augsta koncentrācija noved pie slāņaina posma veidošanās, bet papildu mezofāzes neveidojas, ja koncentrācija ir samazināta. Slāņainā fāze tiek izklaidēta kā koncentrisku slāņainu daļiņu slānis šķīdinātāja pārkumā (ūdenī vai ūdens šķīdumos). To sauc par vezikulāro dispersiju. Bet, ja materiāls sastāv no fosfolipīdiem, vezikulāro dispersiju sauc par liposomu dispersiju. Principā liposomas var izšķīdināt arī eļļas šķīdumos. Tomēr par liposomām eļļas šķīdumos ir mazāka interese zāļu nesējsistēmu tehnoloģijā. Liposomas veidojas no daudziem, maz vai tikai no viena fosfolipīdu divslāņa. Tāpēc šķīdumos var atrast multilamelārus pūslīšus, oligolamelārus pūslīšus, mazus un lielus pūslīšus. Turklāt var veidoties multivezikulāras liposomas. Tomēr nomenklatūra nav konsekventa, proti, termins liposoma tiek lietots kā vispārējs termins, lai arī pūslīši būtu labāka izvēle.

Standarta ražošanas procedūra ir liposomu plēves veidojoša metode. Alternatīvas šķīdinātāja injekcijas un apgrieztās fāzes dialīze ir piemērotas procedūras, lai veidotos mazas un lielas vienslāņa vezikulas [1].

Nanodaļiņas ir maza izmēra amorfas vai kristāliskas vielas cietā stāvoklī. Tās tiek radītas ar zāļvielu absorbcijas vai iekapsulēšanas spēju, tādējādi aizsargājot zāles pret ķīmisko un enzimatisko degradāciju. Turklāt iekapsulētām zālēm var tikt novērsta kristalizācija, tādējādi veidojot stabilu šķīdumu. Tomēr ir pierādīts, ka zāļu vielas kā svešķermeņus tikai ierobežotā daudzumā var iekļaut nanodaļiņu kristāla režģī. Cieto lipīdu nanodaļiņu kapacitāte uzņemt zāļu vielu ir zemāka nekā tikpat koncentrētai nanoemulsijai. Kamēr zāļu formu pagatavošana pēc stingriem zāļu radīšanas noteikumiem attīstās lēni, visas šīs tehnoloģijas sekmīgi tiek izmantotas kosmētikas līdzekļu ražošanā [2]. Kosmētikā izmantotās vielas (*cosmeceuticals*) ir aktuāli produkti, kas nodrošina un uzlabo ādas kopšanu. Tie pārsniedz tradicionālo kosmētiku līdzekļu efektivitāti, kuri, kā zināms, galvenokārt mitrina un attīra ādu.

Termins *cosmeceuticals* tika ieviests vairāk nekā pirms 25 gadiem, lai apzīmētu produktus, kas nav uzskatāmi par zālēm vai vienkārši kosmētiku, bet ir ar aktīvām vielām, tostarp vitamīniem, peptīdiem, augšanas faktoriem un augu ekstraktiem.

Šie kosmētikas līdzekļi bieži satur vitamīnus lokālai lietošanai un vitamīniem ir ierādīta aizvien lielāka loma ādas kopšanai [3].

*Cosmeceuticals* nav tādas pašas normatīvās prasības kā recepšu ādas kopšanas produktiem un kopumā trūkst klīnisko pētījumu, lai pamatotu efektivitāti un iedarbības mehānismu. Tomēr tas ir visstraujāk augošais segments vairāku miljardu dolāru vai eiro ādas kopšanas līdzekļu tirgū.

Līdz šim liposomas izmantotas biežāk nekā micelārie šķīdumi. Kosmētikā micelārais ūdens un losjoni ir nesen ieviests jaunums. Kad losjonu uzklāj uz virsmas, piemēram, ādas, micellas sfēras sadalās un atveras pret šo virsmu. Spiediena pret ādu rezultātā klastera molekula atkal aizveras un šajā procesā ievēl sevī ne ūdens molekulas no ādas virsmas. Tā izskaidro losjonu spēju attīrīt ādu.

## 1.2. C un E vitamīnu un antioksidantu nozīme kosmētisko līdzekļu izmantošanā

Vitamīnus galvenokārt lieto iekšķīgi per os formā, tomēr arī ārīgi lietojamās zāļu formās netrūkst vitamīniem pielietojuma. Āda ir cilvēku lielākais orgāns un tās kopšana ir ārstnieciskās kosmētikas uzdevums. A, B, D vitamīna un taukskābju, kā arī šķidrums trūkums organismā rada ādas elastības problēmas. Brīvie radikāļi, kas veidojas ultravioleto staru, dūmu, putekļu, vēja, sala iedarbībā, izraisa ādas bojājumus, veicinot ādas elastības zudumu. Ilgstoša atrašanās saulē paātrina ādas novecošanos. Tie visi ir faktori, kas prasa zinātniskus pētījumus kā to ietekmi samazināt, lai pasargātu epidermu no ārējās vides nelabvēlīgajiem apstākļiem, kā, piemēram, no saules staru UV iedarbības, kā arī no fotonovecošanās un ādas vēža rašanās [4, 5].

In vitro pētījumi ir pierādījuši, ka ādā veidojas skābekļa reaktīvās formas (ROS), tādēļ antioksidantu lietošana ar kosmētikas palīdzību ir būtiska [5]. Oksidatīvās reakcijas ādā veicina novecošanos, grumbiņu veidošanos, ādas vēža veidošanos un izmaina lipīdu funkcijas. Dabiski organismam ir spēja cīnīties ar oksidatīvo stresu un atjaunot šūnas un to funkcijas, bet lai palīdzētu organismam to darīt lieto antioksidantus [4].

Antioksidanti ir dabīgi vai sintētiski ķīmiskie savienojumi, kuri aizkavē citu molekulu oksidēšanos, tātad pirmie oksidējas un izreaģē ar oksidētājiem. Visbiežāk ārīgajos līdzekļos izmanto A, E un C vitamīnu. Atrasts, ka tie kopā uzlabo kolagēna sintēzi ādā, mazina novecošanās procesus un paātrina dažādu brūču dzīšanu. Lai šādus efektus novērotu vitamīniem ir jābūt atbilstošā koncentrācijā, kas kosmētikas līdzekļos parasti ir no 1% līdz 2%. Daudzi kosmētisko līdzekļu formulējumi satur C vitamīnu un / vai E vitamīnu, ļoti maz ir tādu, kas būtu efektīvi lokālai lietošanai [6]. Pirmkārt, tāpēc, ka tajos ir zema koncentrācija, otrkārt, vitamīnu stabilitāte ir apdraudēta tiklīdz produkts tiek atvērts un saskaras ar gaisu un gaismu, un treškārt, molekulas forma (estera vai izomēru maisījums) nav efektīva absorbēta vai metabolizēta uz ādas. Tomēr, ja sastāvs ir izveidots stabils un nodrošina augstu neesterificētu antioksidanta optisko izomēru koncentrāciju, C un E vitamīni patiešām spēj nomākt akūtus ultravioleto staru (UV) bojājumus kā eritēmu, saules apdegumus, un sauļošanās izraisītu vai hronisku UV fotonovecošanos un samazina risku saslimt ar ādas vēzi. Abi vitamīni ir ļoti efektīvi depigmentācijas aģenti. C vitamīns palielina kolagēna sintēzi gan jaunos, gan vecos fibroblastos, jo C vitamīns atgriež oksidēto E vitamīnu aktīvā formā. Ir pierādīts, ka abu šo vitamīnu kombinācijai ir sinerģiska darbība - īpaši aizsardzībā pret UV stariem [6], askorbīnskābe pastiprina tokoferola darbību [5, 7].

C vitamīns (askorbīnskābe) - ūdenī šķīstošs vitamīns tika ieteikts kā pretcingas jeb skorbuta ārstēšanas līdzeklis vēl nezinot, kāpēc tas stabilizē zobu smaganu kolagēnu un novērš asiņošanu. In vitro pētījumos un klīniskajos pētījumos pierādīts, ka C vitamīns veicina kolagēna veidošanos.

Kolagēna biosintēzei būtiski ir divi enzīmi – Lys un Pro hidroksilāzes, kuru autoinhibīciju novērš C vitamīns [8]. C vitamīna darbības mehānismu skaidro ar tā spēju deponēt I tipa kolagēnu fibroblastos, tādējādi nodrošinot dermas biezumu un stiprinot kolagēnu tīklojumu.

C vitamīns saskaroties ar ROS oksidējas par dehidroaskorbātu un veido savienojumu, kas ir askorbāta brīvais radikālis. Šo īpašību dēļ tiek nodrošināta ādas stāvokļa uzlabošanās, gan ātrāka brūču dzīšana (akne gadījumā), gan atjaunošana pēc UV staru iedarbības [9].

E vitamīns (alfa-tokoferols) ir taukos šķīstošs vitamīns, pasargā ādu un šūnu membrānas no UV staru ietekmes, ja to lieto pirms došanās saulē (pierādīts in vitro pētījumos), regulē kolagēna un elastīna sadalījumu, veicot to caur matricas metaloproteināzi (MMP), kuras uzdevums ir arī veicināt šūnu diferenciāciju, apoptozi u.c. Galvenais E vitamīna uzdevums ir kavēt lipīdu peroksidāciju, tādā veidā pasargājot šūnu membrānas.

Reaktīvajām skābekļa sugām (ROS) ir izšķiroša loma novecošanās procesos. Dažādi in vitro un in vivo pētījumi ar dzīvniekiem ir pierādījuši, ka zemmolekulārie antioksidanti, īpaši vitamīni C un E (askorbāta un tokoferola formā), kā arī liposkābe, izrāda aizsargājošu iedarbību pret oksidatīvo stresu. Tomēr kontrolētu ilgtermiņa klīnisko pētījumu par mazmolekulāro antioksidantu iedarbību, lietojot tos profilaksei vai ādas novecošanās ārstēšanai cilvēkiem joprojām trūkst [10]. Pētot 2% tokoferola un 5% askorbīnskābes šķīdumu in vitro kā ādas UV staru aizsargfaktoru, šādu efektu tomēr nenovēroja [11]. Tomēr, dodot 5% askorbīnskābes šķīdumu per os dzīvniekiem 2 stundas pirms apstarošanas ar UVA un UVB stariem, novēroja mazākas ādas bojājuma pazīmes. Pētījumos tiek meklēts optimālākais veids kā iestrādāt askorbīnskābi, lai tā saglabātu gan savu stabilitāti, gan nonāktu pietiekamā daudzumā ādā. Pagaidām nav labākas alternatīvas, jo pati askorbīnskābe ir ar vismazākajiem blakus efektiem [5].

Savukārt E vitamīnam ir apmēram 8 stereoizomēri, ko ir iespējams atrast dažādos kosmētikas līdzekļos un iekšķīgai lietošanai paredzētos līdzekļos. Viens no izomēriem ir RRR-alfa-tokoferols, kas līdz ādai nonāk septiņās dienās pēc perorālas lietošanas, bet rac-all-alfa-tokoferols līdz ādai vispār nenonāk [5]. No tā var secināt, ka arī kosmētiskajā līdzeklī ir jāizvēlas noteikts E vitamīna izomērs, kas metabolizējas epidermā un ir spējīgs veikt antioksidanta darbību.

### 1.3. B1 un B6 vitamīni

B grupas vitamīnus lieto ādas kairinājuma, dermatītu, alerģiju samazināšanas gadījumā, matu un nagu struktūras uzlabošanai, tie arī atbild par nervu sistēmas labvēlīgu ietekmi u.c. organismam nepieciešamajām funkcijām. Tā kā tiek pētīts kosmētiskais līdzeklis, tad uzmanība vitamīnu nozīmei tiek vērsta uz to kā tas ietekmē ādu. B1 jeb tiamīns, ieteicamā diennakts deva 2-3 mg, tad tas labvēlīgi ietekmē garīgās spējas un nervu sistēmas darbību.

Zinātniskajā literatūrā netika atrasts šī vitamīna nozīmīgums ādas problēmu risināšanai, tādēļ pastāv jautājums, vai to vispār vajadzētu pievienot šim losjonam.

B6 vitamīns jeb piridoksīns, ieteicamā diennakts deva 1,5-3 mg. Nozīme ir pie dermatītiem un diatēzēm [12].

### 1.4. Hialuronskābe un tās sāļi

Hialuronskābe ir dabisks polimērs, kas kā hidrogēls atrodas arī kologēna, želatīna (skrimšļaudu) un celulozes sastāvā.

Hidrogēla īpašības ir spēja uzsūkt ļoti lielu ūdens daudzumu. Tas var pārsniegt pat pašas molekulas svaru un ir ādas, audu un ekstracelulārā matricas šķidrās vides pamatā. Jaunākās paaudzes hidrogēli ir izveidoti ar noteiktu pH, pievienotiem enzīmiem sastāvā, ar noteiktu elektrisko lādiņu un paredzēti izmantošanai gan kosmētikā, gan farmācijā, gan medicīnā. Hidrogēli saistās ar kovalentām saitēm, ūdeņraža saitēm un hidrofobām mijiedarbībām.

Hialuronskābe ir polisaharīds, kuram beta - 1,4 vietā piesaistīts N-acetil-D-glikozamīns un glukuronskābe. Hialuronskābe ir ādai svarīga, jo epidermā iesaistās šūnu proliferācijā, migrēšanā un dalīšanās procesā, bet ekstracelulārajā matricā tā piedalās fizioloģisko procesu regulācijā dermā. Hialuronskābe ir spējīga piesaistīt peptīdus, matricas proteīnus un augšanas faktorus. Skābes karboksilgrupa nosaka pKa 3-4 un spēju jonizēties pie pH=7. Tas ir svarīgi, lietojot šo skābi kosmētikā, jo ādas pH ir 5-6 un ādas pH balansu nedrīkst izjaukt. Ādas pH balansa zudums var izraisīt iekaisuma veidošanos. Tādēļ hialuronskābe ir piemērota un plaši lietota kosmētikā, veicinot dzīšanu pie ādas iekaisumiem, ir labs pret novecošanās un mitrināšanas līdzeklis, izplatīts filleris, ko lieto sejas grumbu aizpildīšanai ar injekciju palīdzību [13].

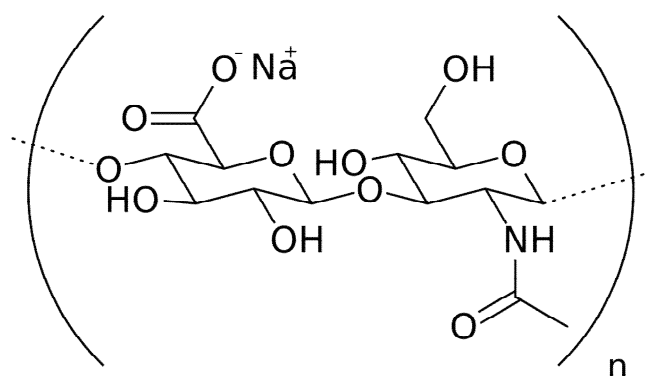
Hialuronskābei ir visaugstākā ūdens saistīšanas kapacitāte un viszemākā iztvaikošana no visiem hidrogēliem [13]. Ir aprēķināts, ka 60 kg cilvēka ķermenī satur ap 12 g hialuronskābes [14].

Hialuronskābi izmanto dažādos filleros, ko lieto injekciju veidā, ievadot sejas grumbiņās. Šādos filleros tiek pievienotas vēl citas sastāvdaļas kā šķidrās silikons, polimetilmetakrilāta mikrosfēras ar liellopu kolagēnu, akrila hidroģēla daļiņas u.c. vielas. Tas parāda to, ka gan kosmētikā, gan farmācijā hialuronskābe kalpo kā laba bāze citu vielu pārnesei ādā. Zinātnieki gan strīdas par to, vai hialuronskābe tiešām ir inerta, lai to izmantotu kā nesējvielu [15].

Hialuronskābe veicina barības vielu, metabolītu, hormonu izplatīšanu un papildus stimulē fibroblastu proliferāciju un kolagēna ražošanu. Hialuronskābes augstas koncentrācijas ir sastopamas embrija audos un onkoloģiskajos veidojumos. Skābei ir atrasta mijiedarbība ar receptoru CD44, tādēļ pastāv aizdomas, ka skābe piedalās arī ļaundabīgo veidojumu augšanas veicināšanā [15, 16].

Kosmētiskajos līdzekļos hialuronskābi izmanto kā spēcīgu mitrinātāju un ādas atjaunošanas sastāvdaļu [17].

Nātrija hialuronāts ir hialuronskābes sāls forma, kuram ķīmiskajā formulā H jona vietā ir Na jons (*1.4.1. att.*) [18].



*1.4.1. att. Nātrija hialuronāta formula.* Attēls pārveidots no [18]

Nātrija hialuronātam ir tās pašas funkcijas, kuras ir hialuronskābei, taču sāls forma ir labāk šķīstoša. Atšķirība ir arī molekulmasā, saistībā ar to, ka disaharīdu vienību skaits ir mainīgs [19].

## 2. MATERIĀLI UN METODEDES

### 2.1. Izmantotie reaģenti un iekārtas

*Pētījumam izmantotā losjona recepte:*

Rp. Natrii Hyaluronas 0,2

Thiamini hydrochloridi 0,25

Pyridoxini hydrochloridi 0,25

Acidi ascorbinici 0,25

Ol. Alfa-tocopherolum 0,25

Glycerini 1,5

Aqua Rosae 66,0

Aqua Destillatae ad 100,0

D.S Ārīgi

#### **Analīzēm izmantotie reaģenti un materiāli**

Reaģenti un standartvielas nopirkta no Sigma-Aldrich-Fluka kataloga un saņemti no izplatītājfirmas Latvijā SIA Labochemia.

#### **Standartvielas**

1. Askorbīnskābe
2. alfa-tokoferols
3. B1 vitamīns (Thiamine hydrochloride)
4. B6 vitamīns (Pyridoxine hydrochloride)

#### **Reaģenti**

Folina-Čikalteu reaģents

Destilēts ūdens

Stabilais radikālis DPPH pulveris (MW 394,32)

Metanols

Kālija heksacianoferāts (III) šķīdums 0,1 M

Sālsskābe 0,1M

Nātrija hidroksīds 0,1 M

#### **Materiāli**

1. Eendorfa mēģenes 2-5 ml
2. 96-lauciņu plate (vienkāršā)
3. Pipetes 20, 100, 200, 1000 µl tilpumam
4. Pipete 5-10ml (Pipet-boy)
5. Fluorescences mērīšanai baltā vai melnā plate

6. Pipešu uzgaļi
7. 15 ml mēģenes
8. Statīvi ependorfa mēģenēm

### **Instrumenti un iekārtas**

1. Maisītājs vortex
2. Analītiskie svāri
3. Spektrometrs (Tecan)

## **2.2. Datu aprēķināšana**

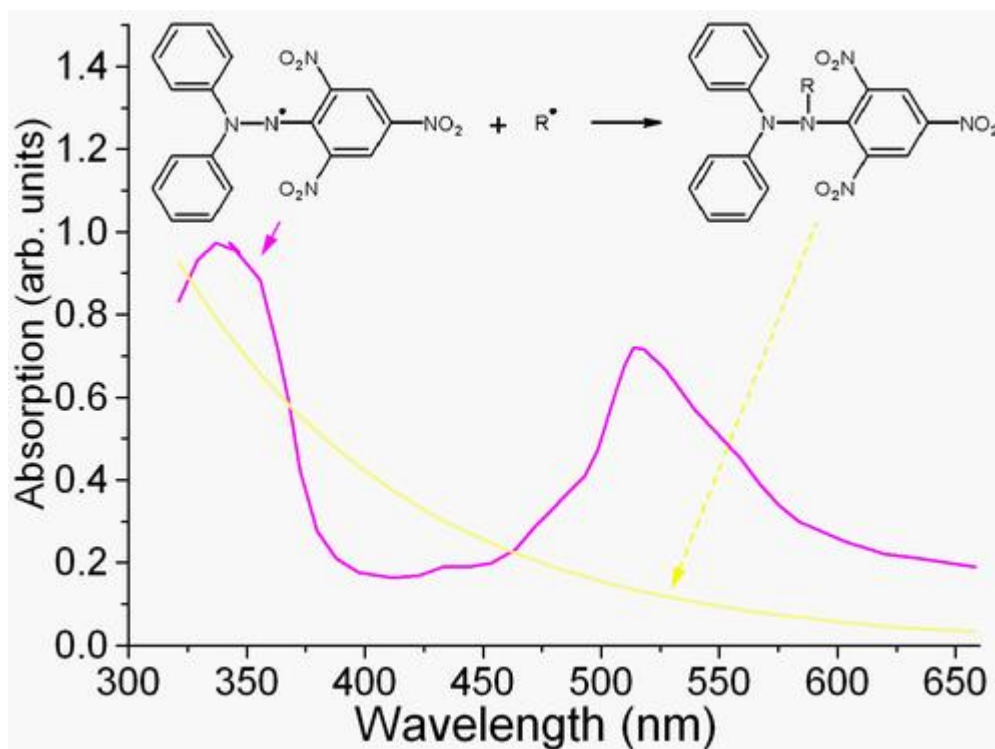
Kvantitatīvo rēķināšanu veicām pēc vitamīnu standartlīknēm ar zināmas koncentrācijas šķīdumiem. Mērījumi atkārtoti trīs reizes (trīs losjoniem) ar paralēliem mērījumiem. Dati parādīti kā vidējā vitamīna koncentrācija ar standartnovirzi. Statistiskā ticamība aprēķināta ar Stjudenta-t testu, izmantojot Microsoft excel. Statistiskā ticamība izteikta ar p vērtību  $\leq 0,05$ . Tiem vitamīniem, kuriem nebija iespējams uzzīmēt standartlīkni un aprēķināt koncentrāciju mg/ml, tiem aprēķins veikts pēc autofluorescences vai absorbcijas vienībām (RFV).

## **2.3. Metodes**

### **2.3.1. DPPH tests**

DPPH ir saīsinājums no 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikālis. DPPH ir tumšas krāsas kristālisks pulveris un ir stabila brīvā radikāļa molekula. Izmanto, lai noteiktu antioksidantu aktivitāti, kas izpaužas kā DPPH reducēšana un krāsas maiņa.

Kušanas temperatūra ir 130 ° C. Absorbcijas maksimumu DPPH uzrāda pie 517-520 nm. Izšķīdināts tas ir tumši violetā krāsā, bet neitralizējot paliek gaiši dzeltens vai bezkrāsains. Molmasa 394,32 g / mol. Nešķīst ūdenī (2.2.1.1.att.) [20].



2.2.1.1.att. **DPPH radikāļa reducēšana.** Attēls pārveidots no [20]

DPPH testā izmanto 50 līdz 300  $\mu\text{M}$  šķīdumus.

Nosver 3,94 mg un izšķīdina 1 ml metanola, iegūstot 10 mM šķīdumu. Krāsa tam ir violeti/purpursarkana. No šī 10 mM šķīduma paņem 15  $\mu\text{l}$  un pievieno pie 985  $\mu\text{l}$  metanola, iegūstot 150  $\mu\text{M}$  šķīdumu, ko izmantojām eksperimentā.

Mikroplatē iemēra pa 100  $\mu\text{l}$  analizējamā preparāta, pievieno 100  $\mu\text{l}$  metanola un 40  $\mu\text{l}$  DPPH šķīdumu, samaisa, tur 30 min ledusskapī 4° C. Mēra 3 paralēlos lauciņus.

DPPH aktivitāti ekstraktiem % aprēķina: (optiskais blīvums (OD) kontrolei ar DPPH šķ. bez metanola fona OD- OD paraugiem) / daļa ar OD kontrole un  $\times 100 = \%$   
 DPPH OD ir 100 % un samazinājums ir x %.

### 2.3.2. C vitamīna koncentrācijas mērīšana

Folīna-Čikalteu spektrofotometriskā metode parasti tiek izmantota polifenolu koncentrācijas mērīšanai, tomēr šo pašu metodi var izmantot askorbīnskābes satura mērīšanai [21]. Losjona analizējamās paraugus vispirms atšķaida, lai nepārsniegtu 50  $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ , receptē ir 2,5 mg askorbīnskābes 1ml. Ņem 100  $\mu\text{l}$  no pagatavotā pēc receptes šķīduma, pievieno 900  $\mu\text{l}$  ūdens, iegūstot 10 reizes vājāku askorbīnskābes koncentrācijas šķīdumu. Visus šķīdumus samaisa izmantojot vortex aparātu. 96-lauciņu platē no katra atšķaidījuma iemēra pa 200  $\mu\text{l}$  4 lauciņos. Reāģentu kontrolei aizpilda 2 lauciņus ar ūdeni.

Pagatavo Folina-Čikalteau reaģenta šķīdumu, ņemot no neatšķaidītā 150 µl un pievieno 1350 µl ūdeni, samaisa ar vortex aparātu, ar pipeti pievieno katrā plates lauciņā 20 µl. Pēc 10 minūtēm attīstās zils krāsojums, kas ir stabils 18h. Absorbciiju mēra pie 760 nm. C vitamīna koncentrāciju aprēķina pēc standartlīknes.

Askorbīnskābes standartlīknes iegūšanai vispirms pagatavo koncentrātu, 10 mg uz analītiskajiem svāriem nosvērtas askorbīnskābes šķīdinot 10 ml ūdens, tad koncentrācija ir 1000 µg askorbīnskābes 1 ml. Pēc literatūras datiem askorbīnskābes līkne ir lineāra intervālā no 1-50µg [22]. Izmēra optisko blīvumu atšķaidījumiem ar zināmu askorbīnskābes koncentrāciju.

Absorbciiju mēra ar spektrometru Tecan pie 760 nm.

### 2.3.3. E vitamīna koncentrācijas mērīšana

E vitamīnam piemīt autofluorescences īpašības, ko izmanto tā satura mērīšanai. Kā E vitamīna standarts tiek izmantots tīrs alfa-tokoferols eļļā un atšķaidīts ūdenī koncentrācijā 2,5 mg/ml, kas atbilst receptē norādītajai.

Platē iemēra noteiktu tilpumu zināmas koncentrācijas šķīduma 3 paralēlos lauciņos. Mēra fluorescenci standartlīknei. Uzbudinošie viļņu garumi lem 450 nm, fluorescence pie  $\lambda_{max}$  480 nm.

Pēc literatūras datiem alfa-tokoferolam autofluorescence novērota pie  $\lambda_{max}$  370 nm ar zaļu gaismas emisiju [23]. Izmēra losjona paraugu fluorescenci E vitamīnam koncentrāciju aprēķina pēc standartlīknes.

### 2.3.4. B1 vitamīna koncentrācijas mērīšana

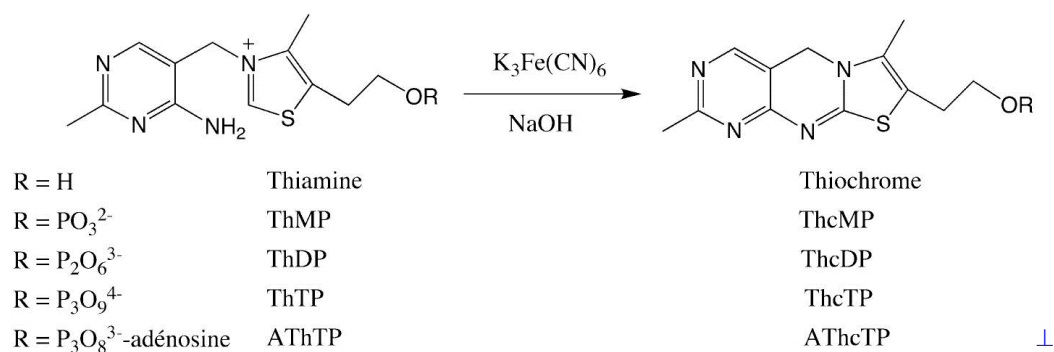
B1 vitamīnam nepiemīt autofluorescences īpašības, bet pēc literatūras datiem, lai tiamīns fluorescētu to nepieciešams oksidēt. Viens no tiamīna oksidētājiem ir kompleksais dzelzs sāls  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  [23]. Reakcijā tiek izmantots  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  0,1 M koncentrācijā.

Standarlīknes iegūšanai nosver 2,85 mg B1 vitamīna un izšķīdina 1 ml ūdens ependorfa mēģenē. Tur tumšā, vēsā vietā.

Tiamīna hidrohlorīds analizējamā losjonā ir 0,25 g 100ml šķīduma, tas ir 2,5 mg/ml. Platē ar pipeti iemēra 200 µl kontrolšķīdumu ūdeni divos paralēlos lauciņos.

Pagatavoto standartšķīdumu liek 3 paralēlos lauciņos pa 200 µl katrā lauciņā kontrolei bez oksidētāja un 3 paralēlos lauciņos pa 200 µl pievienojot  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  šķīduma 10 µl.

Analizējamo šķīdumu (losjonu) liek 3 paralēlos lauciņos tīrā veidā pa 200 µl un 3 paralēlos lauciņos pa 200 µl pievienojot  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  (2.2.4.1. att.) [24].



2.2.4.1. att. **Fluorescējoša tioroma veidošanās no B1 vitamīna.** Attēls pārveidots no [24]

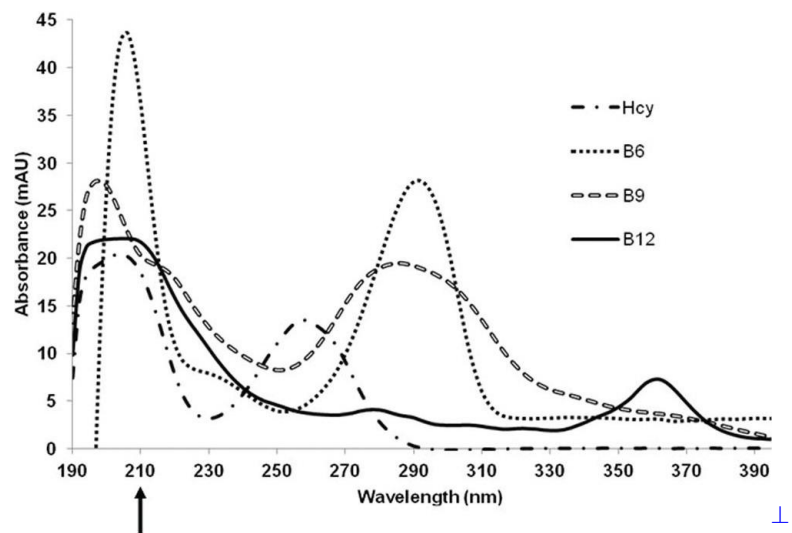
### 2.3.5. B6 vitamīna koncentrācijas mērīšana

Piridoksīna hidrohlorīdam skābā vidē ir dabīgā fluorescence. Tā fluorescēnce ir  $\lambda_{ex}$  350 nm un  $\lambda_{em}$  450 nm, bet multivitamīnu preparātos tā ir  $\lambda_{ex}$  293 nm un  $\lambda_{em}$  393 nm. Fluorescenci iegūst pievienojot 0,1 M HCl [23].

Pēc literatūras datiem fluorescence mērāma pie 290 nm ar uzbudinošiem viļņiem – 210 nm (2.2.5.1. att.) [25]. Standartšķīdumu pagatavo, nosverot 3,2 mg piridoksīna hidrohlorīda, un, ependorfa mēģenē atšķaidīt ar ūdeni, panāk 2,5 mg/ml koncentrāciju, kas atbilst receptei.

Piridoksīna hidrohlorīda standartšķīdumu liek 3 paralēlos plates lauciņos pa 200  $\mu$ l. Piridoksīna hidrohlorīdu ar 0,1M HCl liek 3 paralēlos plates lauciņos pa 200  $\mu$ l.

Analizējamo losjonu tīrā veidā liek 3 paralēlos plates lauciņos pa 200  $\mu$ l. Analizējamo losjonu, kam pievienota 0,1M HCl, liek 3 paralēlos lauciņos pa 200  $\mu$ l.



2.2.5.1. att. B6 vitamīna fluorescences vitamīnu maisījumā. Attēls pārveidots no [ 25]

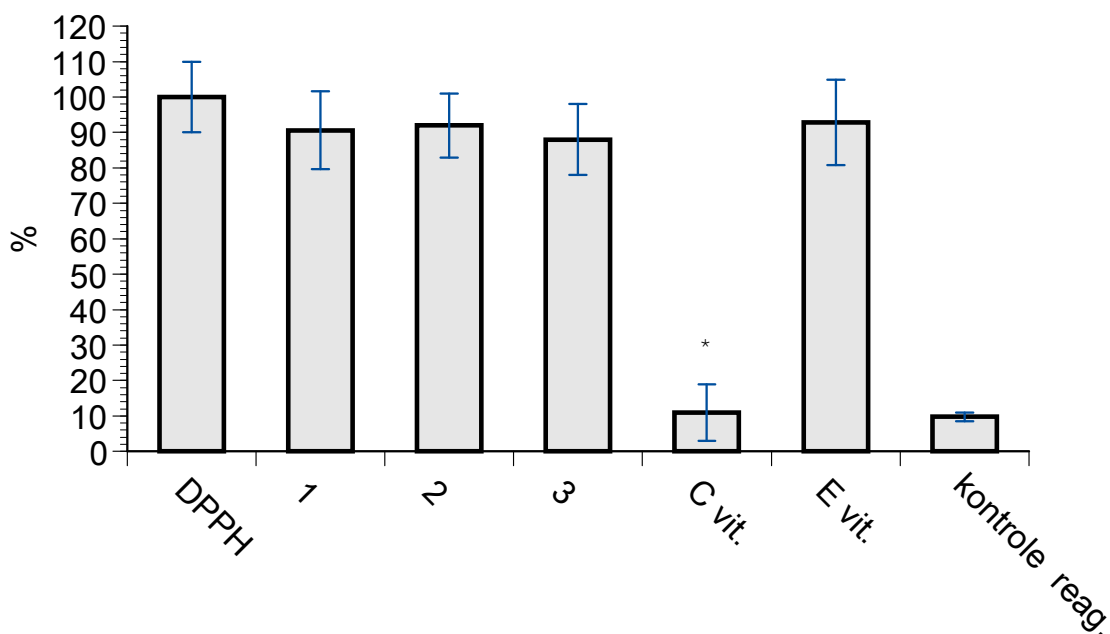
### 3. REZULTĀTI

#### 3.1. Losjona antioksidantu aktivitāte DPPH testā

Pētījumam pagatavojām trīs losjonus un tiem dažādos laikos mērījām antioksidantu aktivitāti.

DPPH radikāļa koncentrācija samazinās, ja uz to iedarbojas antioksidants. Salīdzinājumam eksperimentā pārbaudījām arī C vitamīna un E vitamīna šķīdumus receptei atbilstošā koncentrācijā 2,5 mg/ml.

Rezultāti liecina, ka pretēji gaidītajam, losjons neuzrādīja šajā testā radikāļa koncentrācijas samazinājumu (3.1.1.att.). Efekta nebija arī E vitamīnam, toties C vitamīns pilnīgi reducēja DPPH un DPPH šķīdums kļuva bezkrāsains. C vitamīna klātbūtnē mērījumi uzrādīja tikai fona (reāģentu kontroles) optisko blīvumu, kur DPPH koncentrācija ir 0.



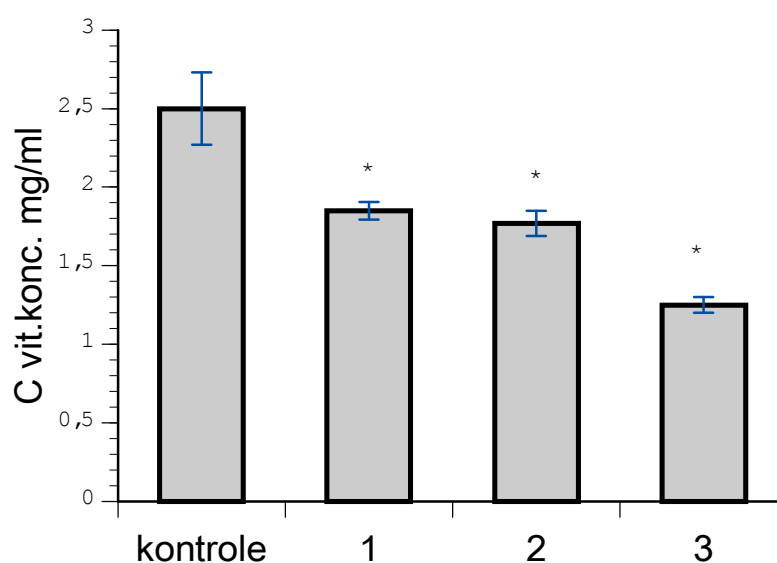
##### 3.1.1. att. DPPH koncentrācija %

1 – losjons 7 dienas pēc pagatavošanas; 2 – pēc 4 mēnešiem un 3 – pēc 6 mēnešiem. Dati iegūti, mērot 3 losjonu paraugus ar 3 paralēliem.

\*  $p \leq 0,05$  vs. DPPH.

### 3.2. C vitamīna koncentrācijas izmaiņas losjonā

Veicot mērījumus novērojām, ka askorbīnskābes koncentrācija ir samazinājusies losjonā jau pēc 7 dienām, salīdzinot ar teorētiski vajadzīgo pēc receptes svaigi pagatavotā losjonā (3.2.1.att.), kontrolē ir 2,5 mg/ml, pēc 7 dienām koncentrācija ir 1,85 mg/ml (standartnovirze +/- 0,05 mg/ml, p= 0,008). Pēc 4 mēnešiem C vitamīna koncentrācija ir apmēram tāda pati 1,77 mg/ml (standartnovirze +/- 0,08 mg/ml, p=0,006), bet pēc 6 mēnešiem sasniedz tikai apmēram 50% no sākotnējā kontroles koncentrācijas 1,25 mg/ml (standartnovirze 0,05 mg/ml, p=0,0008).



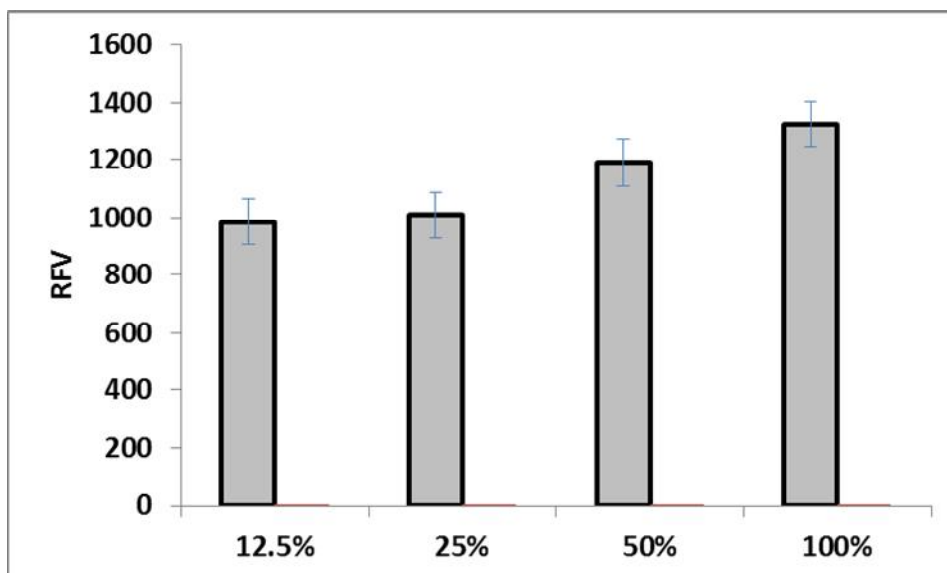
#### 3.2.1. att. C vitamīna koncentrācijas izmaiņas losjona lietošanas laikā

1 – losjons 7 dienas pēc pagatavošanas; 2 – pēc 4 mēnešiem un 3 – pēc 6 mēnešiem. Dati iegūti, mērot 3 losjonu paraugus ar 3 paralēliem.

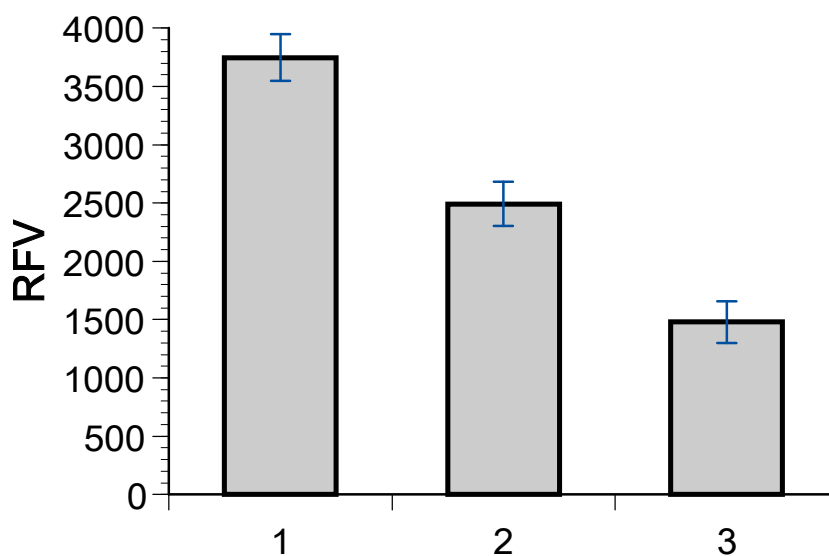
\*  $p \leq 0,05$  vs. kontrolē (C vit. koncentrācija losjona sastāvā)

### 3.3. E vitamīna koncentrācijas izmaiņas losjonā

E vitamīnam piemīt autofluorescence un šī spēja tiek izmantota kvantitatīvai noteikšanai. E vitamīna standarta mērījumi liecina, ka fluorescences relatīvajās vienībās (RFV) 100% E vitamīns eļļā uzrāda maksimālo fluorescenci -1324 RFV (3.3.1. att.), bet negaidīti losjona paraugi uzrāda par to augstāku fluorescenci, kura laika gaitā gan samazinās (3.3.2. att.).



3.3.1. att. E vitamīna standarta dažādā koncentrācijā (%) autofluorescence



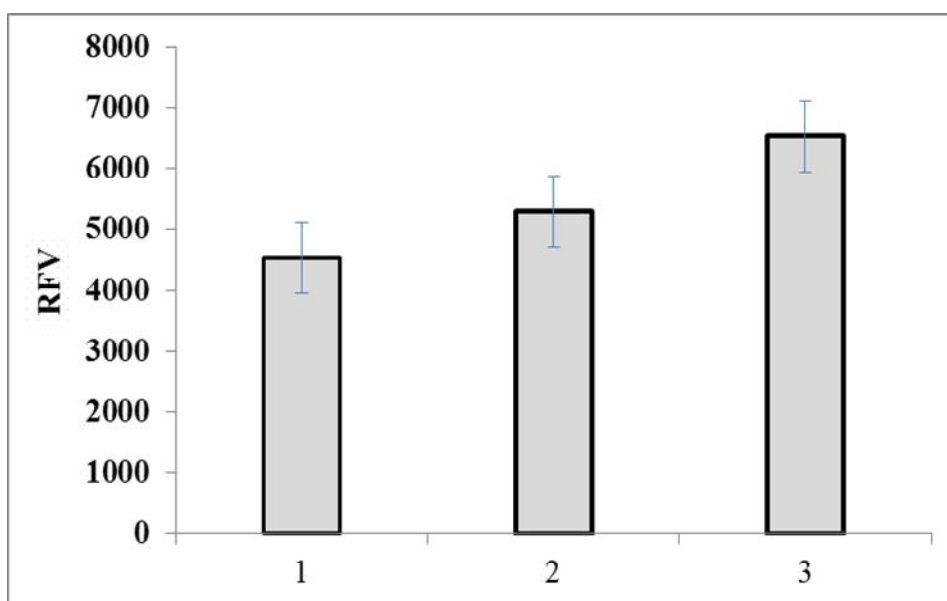
3.3.2. att. Losjona paraugu autofluorescence (RFV)

1 – losjons pēc pagatavošanas 7 dienas; 2 – pēc 4 mēnešiem un 3 – pēc 6 mēnešiem. Dati iegūti, mērot 3 losjonu paraugus ar 3 paralēliem

Iegūtie rezultāti neļauj spriest par E vitamīna koncentrāciju, bet parāda, ka laika gaitā samazinās losjonā esošo vielu dabīgā autofluorescence.

### 3.4. B1 vitamīna satura izmaiņas losjonā

Rezultāti parāda, ka standarta šķīdumi gan ar  $K_3[Fe(CN)_6]$ , gan bez šī reaģenta slikti fluorescē, tāpat slikti fluorescē analizējamais losjons ar reaģentu. Tomēr losjons labi fluorescē un var novērot izmaiņas analizējamajos losjona paraugos. Pēc iegūtajiem rezultātiem var secināt, ka losjonam, kam ir beidzies derīguma termiņš, ir vislielākā fluorescence (3.4.1. att.). Tas liek šaubīties, ka ir mērīta B 1 vitamīna koncentrācija. Varētu pieņemt, ka oksidētājs reaģē arī ar citiem savienojumiem losjona sastāvā un fluorescence summējas.



#### 3.4.1. att. Losjona paraugu autofluorescence (RFV)

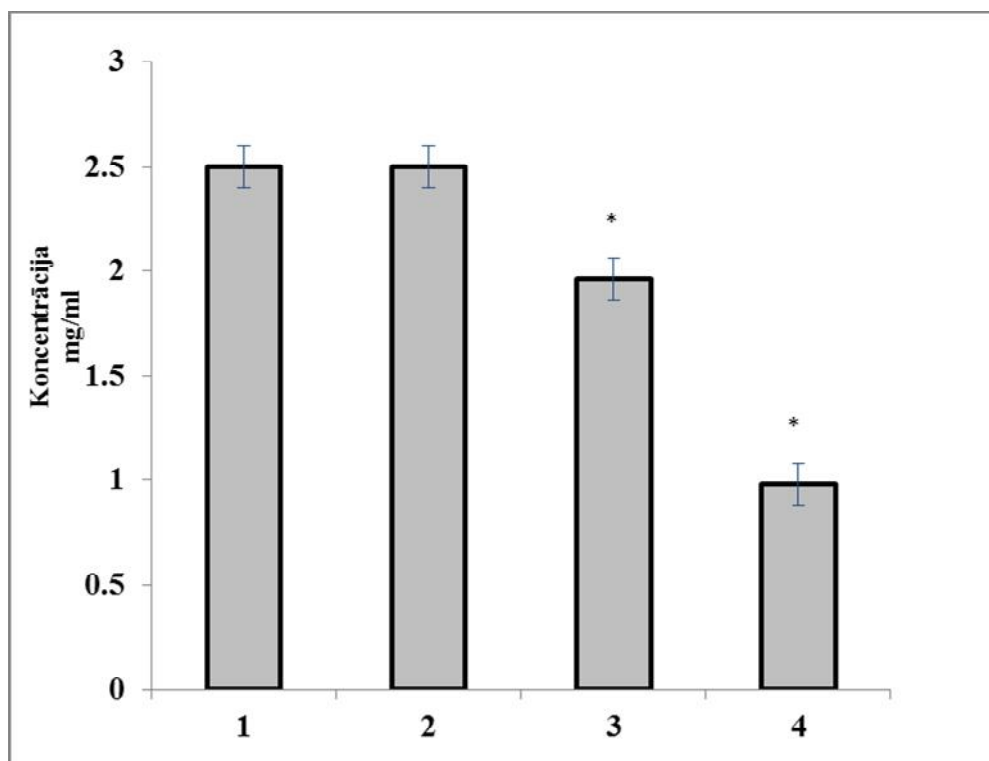
1 – losjons pēc 7 dienām; 2 – pēc 4 mēnešiem un 3 – pēc 6 mēnešiem. Dati iegūti, mērot 3 losjonu paraugus ar 3 paralēliem.

### 3.5. B6 vitamīna satura izmaiņas losjonā

Pagatavotie B6 vitamīna standartšķīdumi ūdenī labi fluorescē, bet sliktāk fluorescē standartšķīdums un analizējamie losjoni, kam pievienota 0,1 M HCl. Tas ir pretrunā ar ieteikumu mērīt B6 autofluorescenci skābā vidē.

Pēc iegūtajiem rezultātiem var secināt, ka B6 vitamīns intensīvāk fluorescē pagatavotajā losjonā, kontrole ir šķīduma koncentrācija 2,5 mg/ml, pēc 7 dienām koncentrācija ir nemainīga 2,5 mg/ml (standartnovirze +/- 0,23 mg/ml). Fluorescences intensitāte losjonam samazinās pēc 4 mēnešiem un koncentrācija ir 1,96 mg/ml (standartnovirze +/- 0,02 mg/ml,  $p=0,01$ ), bet losjonam ar beigušos derīguma termiņu pēc 6

mēnešiem intensitāte samazinās vēl vairāk un koncentrācijas ir 0,98 mg/ml (standartnovirze +/- 0,01 mg/ml,  $p=0,0003$ ) (3.5.1. att.)



### 3.5.1. att. B6 vitamīna koncentrācijas izmaiņas

1 – kontrole (standarts)

2 - losjons 7 dienas pēc pagatavošanas; 3 – pēc 4 mēnešiem un 4 – pēc 6 mēnešiem. Dati iegūti, mērot 3 losjonu paraugus ar 3 paralēliem.

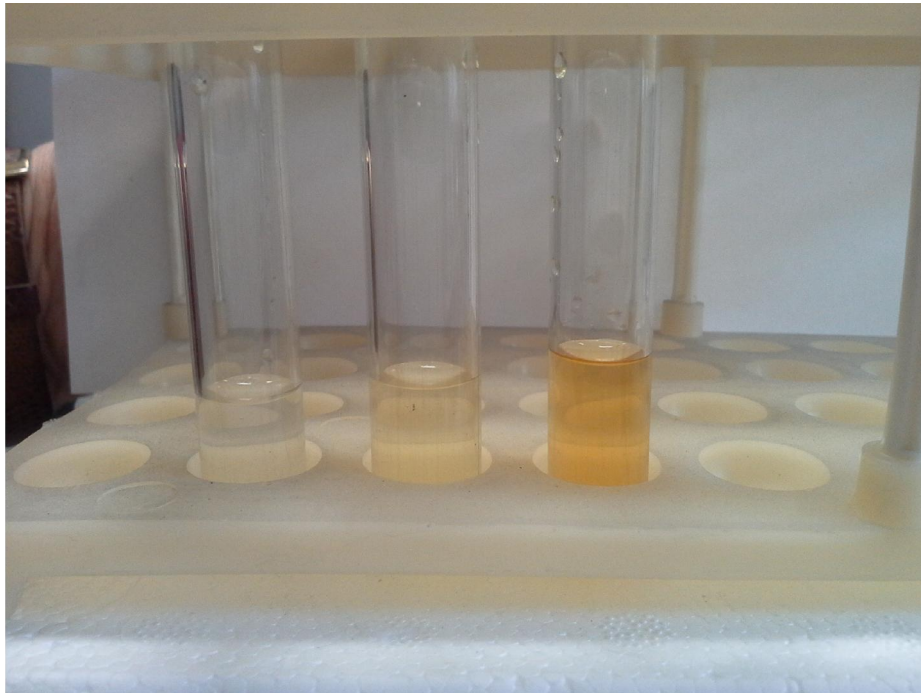
\*  $p \leq 0,05$  vs. kontrole (B6 vit. koncentrācija losjona sastāvā).

## 3.6. Losjona kvalitatīvo izmaiņu noteikšana ar organoleptisko metodi un pH mērījumi

Losjons tika vizuāli novērtēts, jo tajā varēja manīt krāsu un smaržas izmaiņas lietošanas laikā. Svaigi pagatavotam losjonam (7 dienas) ir patīkams vitamīnu aromāts un tam nav krāsas, tas ir caurspīdīgs (3.6.1.att.). Losjonam, kurš tiek lietots jau 4 mēnešus, ir vērojama krāsu maiņa uz dzeltenu toni (3.6.1.att.). Aromāts nedaudz izmainīts, salīdzinot ar losjonu, kurš ir 7 dienas lietots. Aromāts nav tik svaigs kā 7 dienu losjonam.

Losjonam, kuram ir beidzies derīguma termiņš - 6 mēneši, krāsa ir mainījusies uz tumšāk dzeltenu toni (3.6.1.att.). Aromāts ir nepatīkams, kuru varētu raksturot vai pielīdzināt bojātu citrusu augļu aromātam.

Visu losjonu pH = 5, tas ir neitrāls, mērīts ar universālindikatora papīrīti (3.6.2. att.)



**3.6.1. att. Losjona krāsas izmaiņas**

Bezkrāsains- losjons pēc 7 dienām, viegli dzeltens- pēc 4 mēnešiem, dzeltenbrūns - pēc 6 mēnešiem.



**3.6.2. att. Losjonu pH**

no kreisās puses 1. - losjons pēc 7 dienām, 2.- losjons pēc 4 mēnešiem, 3.- pēc 6 mēnešiem.

### 3.7. Losjona lietotāju aptauja

Losjona lietotāji tika novēroti un aptaujāti no 2014. gada augusta līdz 2015. gada martam. Klientu skaits, kas lieto losjonu un piedalījās aptaujā, bija 15 un tās bija sievietes.

Tā kā losjons tiek lietots ikdienā un tiek pielietots, darba autores, kosmētiķes praksē, veicām ekspress interviju 15 klientēm. Ekspress intervija sastāvēja no 4 jautājumiem -

1. Cik ilgi lietojat „Micelāro losjonu”?
2. Vai apmierina losjona aromāts?
3. Vai losjons sniedz svaiguma sajūtu?
4. Vai ievērojat ādas stāvokļa uzlabošanos (mitrinātāka, tonizētāka, gaišāka āda)?

Klientu atsauksmes ir pozitīvas, klientēm patīk svaiguma sajūta, kura rodas pēc losjona lietošanas. Spēcīgais vitamīnu aromāts ir patīkams un nešķiet traucējošs.

Autores, kā kosmetoloģes, novērojums ādas stāvokļa diagnostikā ir, ka uzsākot losjona lietošanu, klientēm pēc 2 mēnešiem novērojama tonizētāka un mitrinātāka āda, svaigs ādas tonis, ātrāka ādas bojājumu dzīšana pēc komedonu un citu iekaisīgu elementu likvidēšanas uz sejas ādas nekā tas ir bijis pirms tam.

Pēc šiem rezultātiem nevar pilnvērtīgi noteikt losjona iedarbīgumu, sajūtas ir subjektīvas un respondentu skaits nav pietiekams, lai veiktu statistisku rezultātu apkopošanu. Tomēr nevar pilnīgi izslēgt un noliegt šādus rezultātus, jo tie tomēr ir noteikti klientu grupai un tie ir vienādi un novēroti tieši losjona lietošanas laikā, nemainot un izslēdzot citus kosmētisko līdzekļus, kam varētu būt līdzīgs efekts.

Attiecīgie novērojumi rosina veikt plašāku pētījumu turpmāk, kas būtu ar lielāku respondentu skaitu un precīzāku novērošanu, jo ir vajadzīgs sadalījums grupās, lai varētu objektīvāk novērtēt losjona sniegto efektu ādai.

## DISKUSIJA

Antioksidantu un vitamīnu pievienošana kosmētiskajos līdzekļos ir svarīga, lai palīdzētu pasargāt cilvēka ādu no kaitīgo faktoru ietekmes, tādiem kā - UV stari, no kuriem veidojas ROS un bojājumi DNS struktūrā veidojot ciklobutāna dimērus [26]. Kaitīgo faktoru ietekmi saista ar novecošanās procesiem ādā, ko sauc par fotonovecošanu (photo aging) [27], hiperpigmentāciju [28], kā arī kancerogēnu šūnu veidošanos (melanoma u.c. ādas vēža formas) [29, 30].

C vitamīna pievienošana kosmētiskiem līdzekļiem ir viena no iespējām iedarboties uz ādu un novērst fotonovecošanos, jo tam ir spēcīgas antioksidanta īpašības. Cilvēki nespēj dabīgi sintezēt šo vitamīnu, jo tiem nav enzīma L-glikonskābes gamma laktona oksidāzes, līdz ar to tas jāuzņem per os vai caur kosmētikas līdzekļiem, uzklājot tos uz ādas. Jāņem vērā, ka arī biopieejamība C vitamīnam ir ierobežota, ja to uzņem per os, tādēļ lai efektīvāk iedarbotos uz epidermu ir nepieciešams lietot kosmētiskos līdzekļus ar atbilstošu C vitamīna saturu [30]. Mehānisms kā darbojas C vitamīns ir tāds, ka tas spēj darboties kā elektrona donors un saistīt brīvo radikāli, oksidējoties par dehidroaskorbīnskābi un atšķirībā no ievadītās formas oksidētā forma nav aktīva [31]. C vitamīns ir efektīvs aizsargs gan pret UVB (290-320 nm), gan UVA (320-400 nm) [32]. Antioksidantus C vitamīnu un E vitamīnu bieži lieto kopā, jo E vitamīns ir spējīgs palielināt C vitamīna antioksidantu aktivitāti līdz pat 8 reizēm atkarībā no koncentrācijas, kādā tas tiek pievienots kosmētiskajā līdzeklī. Piemēram, C vitamīns 15% un E vitamīns 1%, palielina C vitamīna antioksidantu aktivitāti 8 reizes [30]. Nav mazsvarīgi, ka šī vitamīnu kombinācija palīdz atjaunot kolagēna sintēzi ādā, ko pierāda klīniskie pētījumi [6, 33].

Uzskaitītie efekti, ko sniedz C vitamīna pievienošana kosmētiskajos līdzekļos, ir ļoti labvēlīgi ādas stāvokļa uzlabošanai.

Analizējamiem losjona paraugiem ar DPPH reaģentu netika novērota antioksidantu darbība un arī E vitamīnam nenovērojām šo aktivitāti. Tikai C vitamīna standartam novērojām DPPH aktivitāti. Antioksidantu efektu nosaka dažādos testos un šis negatīvais rezultāts neizslēdz varbūtību, ka citos testos to novērotu. Tomēr tas neizskaidro to, kāpēc C vitamīnam losjona sastāvā pazūd DPPH inhibējošais efekts.

Pētījumā par miscelārā losjona kvalitāti, novērojām, ka losjons lietošanas gaitā maina savu krāsu, no bezkrāsaina šķīduma paliekot par dzeltenu šķīdumu. Iespējams, ka krāsas maiņa ir izskaidrojama ar to, ka losjons satur aktīvo bezkrāsainu C vitamīna formu, bet tā ir nestabila un gaismas un skābekļa ietekmē oksidējas par dehidroaskorbīnskābi (DHAA)-dzeltenā krāsā [34]. Viens no trūkumiem, kas piemīt askorbīnskābei ir tās nestabilitāte, bet ir

arī atrastas stabilas formas kā, piemēram, MAP- magnija askorbilsteāra fosfāts, tas ir esteris. Savienojums ir lipofils, tādēļ viegli uzsūcas ādā. Citi savienojumi kā askorbil 6- palmitāts hidrolizējas līdz askorbīnskābei. Dinātrija izostearil 2-0 L-askorbilsteāra fosfāts ir stabils savienojums, kas satur askorbilatlikumu un viegli šķērso epidermālo barjeru [30].

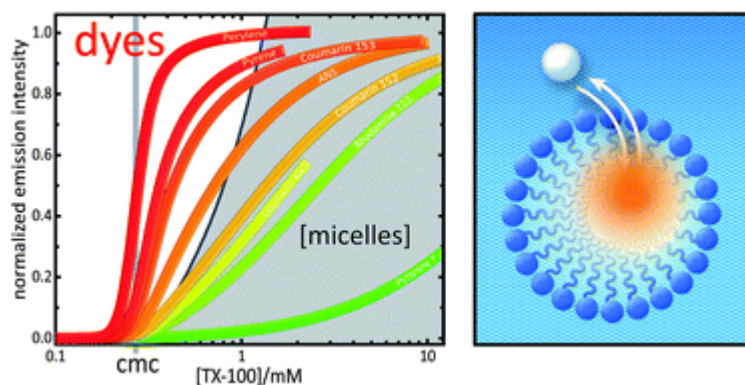
B1 jeb tiamīna hidrohlorīdu sejas kosmētiskajos līdzekļos iekļauj, lai atjaunotu epidermas slāņa biezumu, kas samazinās saistībā ar novecošanos un lēnākām šūnas reģenerācijas spējām. Tādā veidā izlīdzinot sīkās mīmikas grumbiņas to sākotnējā parādīšanās stadijā. Agrākos gados veiktie pētījumi ir pierādījuši, ka šis vitamīns ir spējīgs veicināt šūnu augšanu, līdz ar to atjaunošanos [35]. Tas darbojas arī kā koenzīms aminoskābju metabolismā, nodrošinot veselīgu ādu [36].

Pētījumos tiek norādīts, ka B6 vitamīnam jeb piridoksīna hidrohlorīdam piemīt fotosensitīvas īpašības. Pēc Morimoto apkopotajiem datiem un veiktajiem pētījumiem ir noteikts, ka gan lietojot per os, gan šķīdumos ar koncentrāciju 10 un 100 ng/ml šūnu kultūrām ir novērota stipra fotosensitivitāte un viegla fototoksicitāte [37]. Pēc literatūras datiem efektīvāk būtu pievienot B3 jeb nikotīnamīdu. Daudzos rakstos minēta šī vitamīna īpašība aizsargāt ādu no fotonovecošanas un kancerogēnēzes [38, 39]. Mūsu pētījumā noskaidrojām, ka vitamīnu satura mērīšana citu vielu maisījumā nav vienkārša. Autofluorescences metodes izmantošana izrādījās nepiemērota.

Pieaugoša interese par kosmētiskajiem ādas kopšanas līdzekļiem ar zinātnisku pamatojumu ir saistīta ar in vitro pieeju attīstīšanu, lai novērtēšanai ādas kopšanas līdzekļu receptes jeb formulējumus (formulations) ar mazāk laikietilpīgām, rentablākām metodēm un samazinātu vajadzību pēc brīvprātīgajiem. Šajā pētījumā izmēģinājām vairākus in vitro testus un neatradām pārliecinošus pierādījumus, ka receptē izmantotās vielas kopumā uzrādītu antioksidantu darbību DPPH testā. Antioksidantu efektus vajadzētu pārbaudīt vēl citos testos, jo teorētiski E vitamīna antioksidantu spēja ir lielāka nekā C vitamīnam un visām tokoferola formām ir DPPH radikāļa inhibīcijas spēja. Tomēr pēc dažu autoru publikācijām  $IC_{50}$  DPPH testā C vitamīnam ir bijusi mazāka (0,1228 mM) nekā alfa tokoferolam - 14,24 mM un tam nav atrasts skaidrojums [40, 41]. Mēs nevaram izskaidrot, ne kāpēc E vitamīnam eļļā, ne kāpēc losjonam nekonstatējām DPPH radikāļa inhibīciju. Toties C vitamīns tūrā veidā uzrādīja ļoti spēcīgu antioksidantu efektu.

Jāapšaubā 6 mēnešu derīguma termiņš, jo novērojām krāsas un smaržas izmaiņas. Vitamīna C koncentrācija laika gaitā samazinās losjonā. E un B1 vitamīnu koncentrācijas neizdevās izmērīt, bet novērojām losjona paraugu autofluorescences samazināšanos lietošanas laikā. Līdz ar to secinājām, ka dabīgās fluorescences metode nav piemērota vitamīnu analīzei

šādā sastāvā. Iespējams, ka traucē micelārais daļiņu stāvoklis, jo Lang (1990) ieteica izmantot fluorescences dzēšanas efektu (quenching effect) micellu lieluma mērīšanai [42]. Izmantojot virsmas deterģentu Triton X-100, ir parādīts kā nobīdās fluorescences intensitāte atkarībā no micellu koncentrācijas (4.1.att.) [43].



4.1.att. Fluorescences nobīde micellu šķīdumā [43]

Mikroviskozitāte ir viena no svarīgākajām micelāro šķīdumu iekšējām īpašībām un tā izraisa mainīgas fluorescences īpašības [44]. Tas gan ir pētīts attiecībā uz dažādām fluorescences zondēm, bet iespējams attiecināms arī uz dabīgo vielu fluorescenci.

B vitamīnu kvantitatīvā noteikšana izrādījās ļoti problemātiska šāda sastāva losjonā. Tai skaitā autofluorescences viļņu iespējamā pārklāšanās.

## SECINĀJUMI

1. Losjonam DPPH testā nenovēro antioksidantu efektu. Vienīgi C vitamīna standartam novēro DPPH inhibēšanas spēju. E vitamīna standartšķīdumam nenovēro DPPH testā antiradikālu efektu.
2. Vitamīnu koncentrācijas losjonā samazinās lietošanas laikā. C vitamīna koncentrācijas samazinājums novērojams jau pēc 7 dienām, B6 vitamīnam pēc 4 mēnešiem. Šo vitamīnu koncentrācijas turpina samazināties un pēc 6 mēnešiem C vitamīna koncentrācija ir tikai 50% no receptē pievienotā un B6 vitamīnam apmēram trešā daļa (0,39).
3. E vitamīna un B1 vitamīna koncentrācijas ar izmantotajām autofluorescences un oksidēšanas metodēm nevar izmērīt.
4. Losjona krāsas un pH izmaiņas liecina, ka 6 mēnešu derīguma termiņš nav noteikts atbilstoši losjona sastāva stabilitātei.
5. Aptaujas un kosmetologa novērojumi liecina par losjona labvēlīgu ietekmi uz ādu.

## **PATEICĪBA**

Lielu paldies vēlos izteikt sava darba vadītājai Dr. hab. biol., prof. Rutai Muceniecei par atbalstu, padomu sniegšanu, konsultācijām un palīdzību bakalaura darba izstrādē, par praktiskā darba materiālu nodrošinājumu un laboratorijas izmantošanu.

Paldies, pētniekam Kasparam Jēkabsonam par palīdzību un iespēju izmantot fluorescences aparatūru, padomiem un konsultāciju datu apstrādē un publicēšanā.

Paldies, „Saules aptiekas” vadītājai Anitai Pozņakai un aptiekas kolektīvam par iespēju mācīties aptiekas kosmētikas pagatavošanu un iespēju publicēt un pētīt „Micelāro losjonu.”

## IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. **Müller-Goymann C.C.** Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 58(2), 2004, pp. 343–356.
2. **Wissing S.A., Müller R.H.** Cosmetic applications for solid lipid nanoparticles (SLN). *International Journal of Pharmaceutics*. 254(1), 2003 , pp. 65–68.
3. **Manela-Azulay M., Bagatin E.** Cosmeceuticals vitamins. *Clinics in Dermatology* 27(5), 2009, pp. 469-474.
4. **Pinnell R.** Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 48(1), 2003, pp. 1-19.
5. **Zussman J., Ahdout J., Kim J.** Vitamins and photoaging: Do scientific data support their use? *Journal of the American Academy of Dermatology*. 63(3), 2010, pp. 507–525.
6. **Burke K.E.** Interaction of vitamins C and E as better cosmeceuticals. *Dermatologic Therapy*. 20(5), 2007, pp. 314-321.
7. **Freedberg I.M., Eisen A.Z., Wolff K., Austen K.F., Goldsmith L.A., Katz S.I.** Defense against oxidative stress. *Fitzpatrick's dermatology in general medicine*. Sixth edition. New York: McGraw Hill Book Co, 2008. pp. 138.
8. **Boyera N., Galey I., Bernard B.A.** Effect of vitamin C and its derivatives on collagen synthesis and cross-linking by normal human fibroblasts. *International Journal of Cosmetic Science*. 20(3), 1998, pp. 151-158.
9. **Maarini A.** Beauty from the inside: does it really work? [tiešsaiste]-[atsauce 2015. gada 27. februāris] Pieejams: <http://teknoscienze.mitric.net/Articles/Agro-FOOD-INDUSTRY-hi-tech-Beauty-from-the-inside-does-it-really-work-.aspx#VPG4n3ysWak>
10. **Podda M., Grundmann-Kollmann M.** Low molecular weight antioxidants and their role in skin ageing. *Clinical and Experimental Dermatology*. 26(7), 2001, pp. 578-82.
11. **Dreher F., Gabard B., Schwindt D.A., Maibach H.I.** Topical melatonin in combination with vitamins E and C protects skin from ultraviolet-induced erythema: a human study in vivo. *British Journal of Dermatology*. 139(2), 1998, pp. 332-339.
12. Ziņas. B grupas vitamīnu daudzveidība un nozīme. [tiešsaiste]-[atsauce 2015. gada 8. janvāris] Pieejams: [http://www.zalesinfo.lv/?urls=modules/news\\_result?next=134](http://www.zalesinfo.lv/?urls=modules/news_result?next=134)

13. **Kwon S.S., Kong B.J., Park S.N.** Physicochemical properties of pH-sensitive hydrogels based on hydroxyethyl cellulose-hyaluronic acid and for applications as transdermal delivery systems for skin lesions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 92, 2015, pp. 146-154.
14. **Matarasso S.L., Carruthers J.D., Jewell M.L.** Consensus recommendations for soft-tissue augmentation with nonanimal stabilized hyaluronic acid (Restylane). *Journal of the American Society of Plastic Surgeons*. 117(3), 2006, pp. 3S-34S.
15. **Stern R.** Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet? *Glycobiology*. 13(12), 2003, pp. 105R-115R
16. **Hill A., McFarlane S., Johnston P.G., Waugh D.J.** The emerging role of CD44 in regulating skeletal micrometastasis. *Cancer Letters*. 237(1), 2006, pp. 1-9.
17. **Edwards P.C., Fantasia J.E.** Review of long-term adverse effects associated with the use of chemically-modified animal and nonanimal source hyaluronic acid dermal fillers. *Clin Interv Aging*. 2(4), 2007, pp. 509–519.
18. Sodium hyaluronate. [tiešsaiste]-[atsauce 2015. gada 10. aprīlis] Pieejams: [http://en.wikipedia.org/wiki/Sodium\\_hyaluronate](http://en.wikipedia.org/wiki/Sodium_hyaluronate)
19. **Dehazya P., Lu C.** Sodium hyaluronate microspheres. US 6969531 B2, Nov 29, 2005.
20. **Cowie, J. M. G., Arrighi V.** *Polymers: Chemistry and Physics of Modern Materials*. Third edition. Scotland: CRC Press, 2008. ISBN 0-8493-9813-4
21. **Olgun F.A., Ozyurt D., Berker K.I., Demirata B., Apak R.** Folin-Ciocalteu spectrophotometric assay of ascorbic acid in pharmaceutical tablets and orange juice with pH adjustment and pre-extraction of lanthanum(III)–flavonoid complexes. *Journal of Science of Food and Agriculture*. 94(12), 2014, pp. 2401-2408.
22. **Jagota S.K., Dani H.M.** A New Colorimetric Technique for the Estimation of Vitamin C Using Folin Phenol Reagent. *Analytical biochemistry*. 127(1), 1982, pp. 178-182.
23. **Guilbault G.G.** *Practical Fluorescence. Assay of organic compounds*. Second edition. New York: CRC Press, 1990. pp. 335-339.
24. Lulubou. Thiochromes.jpg. [tiešsaiste]-[atsauce 2015. gada 8. aprīlis] Pieejams: <http://wikimediafoundation.org/wiki/File:Thiochromes.jpg>
25. **Gan S.H., Shaik M.M.** Rapid resolution liquid chromatography method development and validation for simultaneous determination of homocysteine, vitamins B 6 , B 9 , and B 12 in human serum. *Indian Journal of Pharmacology*. 45(2), 2013, pp. 159-167.

26. **Mallet J. D., Rochette P. J.** Ultraviolet Light-Induced Cyclobutane Pyrimidine Dimers in Rabbit Eyes. *Photochemistry and Photobiology.* 87(6), 2011, pp. 1363–1368.
27. **Fisher G. J., Kang S., Varani J., Bata-Csorgo Z., Wan Y., Datta S., Voorhees J.J.** Mechanisms of Photoaging and Chronological Skin Aging. *Jama Dermatology.*138(11), 2002, pp. 1462-1470.
28. **Nieuweboer-Krobotova L.** Hyperpigmentation: types, diagnostics and targeted treatment options. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology.* 27(1), 2013, pp. 2–4.
29. **Arora A., Attwood J.** Common skin cancers and their precursors. *Surgical Clinics North America.* 89(3), 2009, pp. 703-712.
30. **Traikovich S.S.** Use of Topical Ascorbic acid and its effects on Photo damaged skin topography. *Jama Otolaryngology-Head & Neck Surgery.* 125(10), 1999, pp. 1091–1098.
31. **Telang P.S.** Vitamin C in dermatology. *Indian Dermatology Online Journal.* 4(2), 2013, pp. 143-146.
32. **Matsuda S., Shibayama H., Hisama M., Ohtsuki M., Iwaki M.** Inhibitory effects of a novel ascorbic derivative, disodium isostearyl 2-O-L-Ascorbyl Phosphate on melanogenesis. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin.* 56(3), 2008, pp. 292–297.
33. **Draelos Z.D.** Skin lightening preparations and the hydroquinone controversy. *Dermatologic Therapy.* 20(5), 2007, pp. 308–313.
34. **Pinnell S.R., Huanshu Y., Omar M., Riviere N.M., Debuys H.V., Walker L.C., Wang Y., Levine M.** Topical L ascorbic acid: Percutaneous absorption studies. *Dermatologic Surgery.* 27(2), 2001, pp. 137–142.
35. **Gazzani G.** Cosmetic preparations for promoting trophism of the skin and of related hair follicles. US 5053230 A, Oct 1, 1991.
36. **Salvador A., Chisvert A.** Analysis of cosmetic products.B group vitamins. First edition. Italy, 2007. pp. 370.
37. **Morimoto K., Kawada A., Hiruma M., Ishibashi A.** Photosensitivity from pyridoxine hydrochloride (vitamin B6). *Journal of the American Academy of Dermatology.* 35(2), 1996, pp. 304-305.
38. **Surjana D., Halliday G.M., Damian D.L.** Nicotinamide enhances repair of ultraviolet radiation-induced DNA damage in human keratinocytes and ex vivo skin.

- Oxford Journals Medicine & Health & Science & Mathematics Carcinogenesis. 34(5), 2013, pp. 1144-1149.
39. **Surjana D., Halliday G.M., Damian D.L.** Role of nicotinamide in DNA damage, mutagenesis, and DNA repair. *Journal of nucleic acids*. Doi: 10.4061/2010/157591, 2010.
  40. **Acosta J.M., Apigo A.M., Borreo M.C.G., Gazelle J. N., Catli, Enriquez M. R. C., Fensantos R.A.D.** Determination of inhibitory activity of the antioxidants ascorbic acid and alpha tocopherol using DPPH assay. [tiešsaiste]-[atsauce 2015. gada 15.aprīlis] Pieejams: [www.academia.edu/](http://www.academia.edu/)
  41. **Mambro V.M., Azzolini A., Valim Y., Fonseca M.** Comparison of antioxidant activities of tocopherols alone and in pharmaceutical formulations *International Journal of Pharmaceutics*. 262, 2003, pp. 93–99.
  42. **Lang J.** The Time-Resolved Fluorescence Quenching Method for the Study of Micellar Systems and Microemulsions: Principle and Limitations of the Method. *The Structure, Dynamics and Equilibrium, Properties of Colloidal Systems NATO ASI Series*. 324, 1990, pp. 1-38.
  43. **Pineiro L., Freire S., Bordello J., Novo M., Al-Soufi W.** Dye exchange in micellar solutions. Quantitative analysis of bulk and single molecule fluorescence titrations. *Soft Matter*. 9, 2013, pp. 10779-10790.
  44. **Malliaris A.** Fluorescence probing in aqueous micellar systems: an overview *International Reviews in Physical Chemistry*. 7(2), 1988 pp. 95-121

## PIELIKUMI

1.pielikums

### Atļauja publicēt recepti “Micelārajam losjonam”

Saules aptiekas vadītājai,  
Anitai Pozņakai.  
LU Medicīnas fakultātes  
Farmācijas bakalaura studiju programmas  
studente Elīna Siliņa  
25048312726

iesniegums.

Lūdzu, atļaut publicēt manā bakalaura darbā, kurš tiek izstrādāts laika posmā no 2014. gada novembrim līdz 2015. gada maijam „Saules aptiekas” recepti, micelārajam losjonam, ar šādu sastāvu :

Rp. Natrii Hyaluronas 0,2  
Thiamini hydrochloridi 0,25  
Pyridoxini hydrochloridi 0,25  
Acidi ascorbinici 0,25  
Ol. Alfa-tocopherolum 0,25  
Glycerini 1,5  
Aqua Rosae 66,0  
Aqua Destillatae ad 100,0  
D.S Ārīgi

## DOKUMENTĀRĀ LAPA

Bakalaura darbs

” \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_” izstrādāts LU Medicīnas fakultātē.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autors: \_\_\_\_\_  
(vārds, uzvārds) (paraksts)

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītāja: Prof. Ruta Muceniece Dr.habil.biol. \_\_\_\_\_  
(amats, vārds, uzvārds, grāds) (paraksts) (datums)

Recenzents: \_\_\_\_\_  
(amats, vārds, uzvārds, grāds) (paraksts) (datums)

Darbs iesniegts LU Medicīnas fakultātē \_\_\_\_\_  
(datums)

Vecākā lietvede Juta Bārtule \_\_\_\_\_  
(paraksts)

Bakalaura darbs aizstāvēts bakalaura studiju programmas „Farmācija” Bakalaura gala pārbaudījuma komisijas sēdē \_\_\_\_\_ 2015., prot. Nr. \_\_\_\_\_.

Komisijas sekretāre: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
(amats, vārds, uzvārds, grāds) (paraksts)