Ekstrakcja i chromatografia w analityce, 03CHE1-25S302O04840L

Ćwiczenie 7. Oznaczanie substancji promieniochronnych stosowanych w kremach przeciwsłonecznych.

Cel ćwiczenia: Celem ćwiczenia jest zastosowanie ekstrakcji wspomaganej ultradźwiękami do ekstrakcji substancji absorbujących promieniowanie UV, w tym organicznych filtrów UV, z kremów przeciwsłonecznych oraz ich ocena spektrofotometryczna w zakresie UV. Na podstawie widm absorpcyjnych zostanie przeprowadzona porównawcza ocena właściwości badanych preparatów oraz oszacowanie wartości SPF w uproszczonym modelu spektrofotometrycznym. Dla jednego wybranego kremu zostanie również porównana względna efektywność ekstrakcji wspomaganej ultradźwiękami z ekstrakcją prowadzoną w łaźni wodnej.

WPROWADZENIE

na podstawie [1, 2, 3]

Promieniowanie słoneczne obejmuje szeroki zakres promieniowania elektromagnetycznego, w tym promieniowanie ultrafioletowe (UV), światło widzialne i promieniowanie podczerwone. Promieniowanie UV obejmuje zakres długości fali 100–400 nm i ze względu na długość fali dzieli się na UVA, UVB i UVC [1]:

1. UVC (100–280 nm) – wysokoenergetyczne, mogące powodować silne uszkodzenia biologiczne; jest wysokoenergetyczne, lecz promieniowanie słoneczne z tego zakresu jest praktycznie całkowicie pochłaniane przez atmosferę i nie dociera do powierzchni Ziemi;

2. UVB (280–315 nm) - działa przede wszystkim w powierzchownych warstwach skóry; odpowiada w dużym stopniu za rumień i oparzenia słoneczne oraz uczestniczy w procesach fotokarcynogenezy;

3. UVA (315–400 nm) - stanowi większość promieniowania UV docierającego do powierzchni Ziemi; penetruje skórę głębiej niż UVB i ma znaczenie m.in. w procesach fotostarzenia i uszkodzeniach komórkowych; promieniowanie UVA przyczynia się m.in. do degradacji składników macierzy skóry, powstawania przebarwień, fotostarzenia oraz uszkodzeń związanych z procesem fotokarcynogenezy.

Do powierzchni Ziemi dociera przede wszystkim promieniowanie UVA oraz mniejsza część UVB. UVC jest pochłaniane przez atmosferę [1]. Nadmierna ekspozycja na promieniowanie UV może powodować ostre i przewlekłe skutki biologiczne, dlatego w produktach przeznaczonych do ochrony skóry stosuje się substancje promieniochronne, określane także jako filtry UV.

W kosmetykach stosuje się organiczne i nieorganiczne filtry UV. Organiczne filtry UV są związkami absorbującymi promieniowanie w określonych zakresach długości fali. Do stosowanych substancji należą m.in. oktokrylen i avobenzon. Nieorganiczne filtry UV, takie jak TiO_2 i ZnO, ograniczają przenikanie promieniowania poprzez jego absorpcję oraz, w zależności od właściwości cząstek, także rozpraszanie. Wykaz substancji dopuszczonych jako filtry UV w produktach kosmetycznych określa załącznik VI do rozporządzenia (WE) nr 1223/2009 z późniejszymi zmianami [2]. Zastosowana w ćwiczeniu procedura ekstrakcji i pomiaru spektrofotometrycznego służy przede wszystkim ocenie składników rozpuszczalnych w izopropanolu i absorbujących promieniowanie UV; nie stanowi oznaczenia ilościowego nieorganicznych filtrów UV.

Wskaźnik SPF

SPF (ang. Sun Protection Factor) jest miarą zdolności produktu przeciwsłonecznego do ograniczania działania promieniowania wywołującego rumień, przede wszystkim z zakresu UVB. Klasyczne oznaczanie SPF in vivo jest prowadzone według znormalizowanych procedur, m.in. ISO 24444 [3]. Wartość SPF nie stanowi pełnej miary ochrony przed UVA.

Na potrzeby niniejszego ćwiczenia stosuje się uproszczony model spektrofotometryczny, w którym transmisję promieniowania przez warstwę środka przeciwsłonecznego przybliża się zależnością $T \approx 1/SPF$. Ponieważ absorbancja $A = -\log_{10}(T)$, otrzymuje się zależność:

$$A \approx - \log_{10}(1/SPF) = \log_{10}SPF$$

Zależność ta jest modelem dydaktycznym i nie jest równoważna normatywnemu oznaczeniu SPF produktu. Na wynik wpływają m.in. niepełna ekstrakcja składników kremu, obecność kilku substancji absorbujących, rozpraszanie promieniowania oraz skład matrycy kosmetycznej [4, 5]. Dlatego wartości uzyskane w ćwiczeniu należy interpretować jako spektrofotometryczne oszacowanie SPF w przyjętych warunkach pomiarowych, a nie jako certyfikowaną wartość SPF produktu.

Ogólny schemat wykonania ćwiczenia

1. Przygotować po dwie równoległe naważki każdego badanego kremu.
2. Przeprowadzić ekstrakcję wspomaganą ultradźwiękami.
3. Dla jednego wybranego kremu przeprowadzić równolegle ekstrakcję w łaźni wodnej bez ultradźwięków.
4. Odwirować próbki i przygotować ekstrakty do pomiaru spektrofotometrycznego.
5. Zarejestrować widma absorpcyjne w zakresie 200–450 nm.
6. Porównać widma badanych preparatów i wartości absorbancji w wybranym zakresie UV.
7. Porównać względną efektywność obu sposobów ekstrakcji dla wybranego kremu.
8. Oszacować SPF badanych preparatów w uproszczonym modelu spektrofotometrycznym i porównać z deklaracją producenta.

Odczynniki i wyposażenie

– izopropanol (2-propanol),
– badane kremy przeciwsłoneczne o różnych deklarowanych wartościach SPF,
– waga analityczna,
– probówki z tworzywa sztucznego,
– bagietki szklane,
– myjka ultradźwiękowa z możliwością utrzymania temperatury 45–50 °C,
– łaźnia wodna o temperaturze 45–50 °C,
– wirówka laboratoryjna,
– kolby miarowe, pipety i inne szkło miarowe,
– spektrofotometr UV-Vis oraz kuwety kwarcowe.

Procedura ekstrakcji wspomaganej ultradźwiękami

Dla każdego badanego kremu przygotować dwie równoległe próbki. Do plastikowej probówki przenieść za pomocą bagietki szklanej około 0,0500 g kremu przeciwsłonecznego i dokładnie

zważyć próbkę. Zanotować rzeczywistą masę każdej odważki. Po przygotowaniu każdej próbki bagietkę dokładnie oczyścić izopropanolem i osuszyć przed pobraniem kolejnego kremu.

Do każdej probówki dodać 5,00 cm³ izopropanolu i dokładnie wymieszać przez wstrząsanie. Probówki umieścić w myjce ultradźwiękowej, w której temperatura kąpieli wynosi 45–50 °C, i poddawać działaniu ultradźwięków przez 15 min. Ekstrakcję należy prowadzić w naczyniach odpowiednich do stosowania z izopropanolem, zgodnie z instrukcją użytkowania myjki ultradźwiękowej oraz zasadami bezpiecznej pracy z rozpuszczalnikami łatwopalnymi. Sposób umieszczenia i zamknięcia naczyń określa procedura obowiązująca na pracowni.

Po zakończeniu ekstrakcji próbki schłodzić do temperatury pokojowej, a następnie odwirować przez 6 min przy prędkości obrotowej 7500 obr./min. Klarowna ciecz nadosadowa zawiera związki wyekstrahowane z kremu, w tym rozpuszczalne w izopropanolu organiczne filtry UV.

Porównanie względnej efektywności ekstrakcji wspomaganej ultradźwiękami i ekstrakcji w łaźni wodnej

Dla jednego wybranego kremu przeciwsłonecznego należy porównać względną efektywność ekstrakcji prowadzonej z zastosowaniem ultradźwięków z ekstrakcją prowadzoną w łaźni wodnej bez działania ultradźwięków.

Do porównania wykorzystać dwie równoległe próbki wybranego kremu, przygotowane wcześniej do ekstrakcji wspomaganej ultradźwiękami (wariant A). Dodatkowo przygotować dwie równoległe naważki tego samego kremu, każda o masie około 0,0500 g, do ekstrakcji w łaźni wodnej bez działania ultradźwięków (wariant B). Zanotować rzeczywistą masę każdej odważki.

Wariant A – ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami: do próbki dodać 5,00 cm³ izopropanolu, dokładnie wymieszać i prowadzić ekstrakcję w myjce ultradźwiękowej przez 15 min w temperaturze 45–50 °C.

Wariant B – ekstrakcja w łaźni wodnej: do próbki dodać 5,00 cm³ izopropanolu, dokładnie wymieszać i prowadzić ekstrakcję przez 15 min w łaźni wodnej o temperaturze 45–50 °C, bez działania ultradźwięków.

Poza zastosowaniem ultradźwięków warunki obu ekstrakcji, tj: masa próbki, objętość rozpuszczalnika, temperatura, czas oraz sposób wstępnego wymieszania, powinny być jednakowe. Po zakończeniu ekstrakcji próbki schłodzić do temperatury pokojowej i odwirować przez 6 min przy 7500 obr./min. Roztwór znad osadu przygotować do pomiaru w taki sam sposób dla obu wariantów.

UWAGA: W ćwiczeniu nie jest wyznaczana bezwzględna wydajność ekstrakcji poszczególnych filtrów UV, ponieważ nie wykonuje się ich indywidualnego oznaczenia ilościowego z zastosowaniem odpowiednich wzorców. Porównywana jest względna efektywność obu sposobów ekstrakcji, oceniana na podstawie odpowiedzi spektrofotometrycznej ekstraktów przygotowanych w jednakowych warunkach.

Przygotowanie roztworów do pomiaru

Otrzymany ekstrakt należy rozcieńczyć 200-krotnie izopropanolem. W zależności od dostępnego wyposażenia można zastosować jeden z dwóch równoważnych wariantów:

a) w przypadku stosowania pipety automatycznej pobrać 125 µl ekstraktu do kolby miarowej o pojemności 25,00 cm³ i uzupełnić izopropanolem do kreski;

b) w przypadku stosowania klasycznego szkła miarowego ekstrakt najpierw rozcieńczyć 20-krotnie izopropanolem, a następnie pobrać 1,00 cm^3 otrzymanego roztworu do kolby miarowej o pojemności 10,00 cm^3 i uzupełnić izopropanolem do kreski.

W obu wariantach całkowity współczynnik rozcieńczenia ekstraktu wynosi 200. Wszystkie próbki przeznaczone do bezpośredniego porównania należy rozcieńczać według tego samego wariantu.

Wykonanie pomiarów i sporządzenie widm absorpcyjnych

Przy użyciu spektrofotometru UV-Vis wykonać pomiar widm absorpcyjnych w zakresie 200–450 nm dla każdej z badanych próbek, stosując izopropanol jako roztwór odniesienia. Pomiary wykonywać w kuwetach kwarcowych.

Przed pomiarem kuwetę przepłukać niewielką porcją roztworu, którego absorbancja ma być w niej mierzona. Należy zwrócić uwagę na prawidłowe ustawienie kuwety oraz czystość jej powierzchni optycznych.

Opracowanie wyników

1. Korekta absorbancji względem masy naważki

W celu porównania próbek o nieznacznie różniących się masach naważek wartość absorbancji przy wybranej długości fali należy skorygować do standardowej masy 0,0500 g:

$$A_k = A \cdot 0{,}0500 / m$$

gdzie: A_k - absorbancja skorygowana do masy 0,0500 g; A - zmierzona absorbancja; m - rzeczywista masa odważki kremu [g].

2. Ocena względnej efektywności ekstrakcji

Dla wybranego kremu porównać średnie wartości absorbancji skorygowanej otrzymane po obu sposobach ekstrakcji przy tej samej długości fali. Względną efektywność ekstrakcji wspomaganej ultradźwiękami w odniesieniu do ekstrakcji w łaźni wodnej można obliczyć ze wzoru:
$E_{rel} = (A_k,UAE / A_k,WB) \cdot 100\%$
gdzie: A_k,UAE – średnia absorbancja skorygowana po ekstrakcji wspomaganej ultradźwiękami; A_k,WB – średnia absorbancja skorygowana po ekstrakcji w łaźni wodnej.
Wartość około 100% oznacza porównywalną odpowiedź spektrofotometryczną obu ekstraktów. Wartość większa niż 100% wskazuje na większą absorbancję ekstraktu uzyskanego z zastosowaniem ultradźwięków, natomiast wartość mniejsza niż 100% – na większą absorbancję ekstraktu otrzymanego metodą ekstrakcji w łaźni wodnej. Porównanie jest uzasadnione przy założeniu, że pomiary wykonywane są w zakresie liniowej zależności absorbancji od stężenia, przy jednakowym współczynniku rozcieńczenia.

3. Spektrofotometryczne oszacowanie SPF

Dla wszystkich badanych kremów wybrać jedną wspólną długość fali z zakresu UVB, przy której porównywane będą wartości absorbancji. Korzystając ze skorygowanych wartości absorbancji sporządzić wykres zależności:

$A_k = f(\log_{10} SPF_{nom})$,

gdzie SPF_{nom} oznacza nominalną wartość SPF podaną przez producenta.

Wyznaczyć równanie prostej oraz współczynnik determinacji (R^2). Na podstawie równania prostej obliczyć dla każdego badanego preparatu wartość SPF oszacowaną spektrofotometrycznie.

Otrzymane wartości SPF porównać z wartościami deklarowanymi przez producentów. Jednocześnie, na podstawie przebiegu zależności $A_k=f(\log_{10} SPF_{nom})$ oraz wartości R^2, ocenić, czy w warunkach przeprowadzonego doświadczenia wzrostowi deklarowanej wartości SPF towarzyszy wzrost absorbancji ekstraktu w wybranym zakresie UVB.

UWAGA: Obliczone wartości SPF mają charakter orientacyjny i odnoszą się wyłącznie do warunków zastosowanej procedury ekstrakcji i pomiaru spektrofotometrycznego. Nie są równoważne wartościom SPF wyznaczanym zgodnie ze znormalizowanymi metodami oceny ochrony przeciwsłonecznej. Na zgodność wyników z deklaracją producenta mogą wpływać m.in. niepełna ekstrakcja składników kremu, obecność kilku substancji absorbujących promieniowanie UV, skład matrycy kosmetycznej oraz rozpraszanie promieniowania.

SPRAWOZDANIE

1. krótkie wprowadzenie zawierające cel ćwiczenia oraz zasadę ekstrakcji wspomaganej ultradźwiękami i pomiaru UV-Vis;

2. tabelę zawierającą nazwy badanych preparatów, deklarowane wartości SPF, rzeczywiste masy naważek oraz zastosowane rozcieńczenia;

3. widma absorpcyjne uzyskane dla roztworów wszystkich badanych kremów;

4. wyznaczone długości fali odpowiadające charakterystycznym maksimom absorpcji w zakresie UVB i UVA oraz krótki komentarz do kształtu widm;

5. wartości absorbancji przy jednej, wspólnie wybranej długości fali z zakresu UVB oraz wartości absorbancji skorygowane względem masy naważki;

6. dla wybranego kremu – porównanie wyników uzyskanych po ekstrakcji wspomaganej ultradźwiękami i po ekstrakcji w łaźni wodnej oraz obliczoną względną efektywność ekstrakcji wspomaganej ultradźwiękami;

7. wykres zależności $A_k=f(\log_{10} SPF_{nom})$, równanie prostej, wartość R^2 oraz spektrofotometrycznie oszacowane wartości SPF badanych preparatów;

8. porównanie oszacowanych wartości SPF z wartościami deklarowanymi przez producentów oraz ocenę zależności między absorbancją ekstraktów a deklarowanym SPF; ewentualne rozbieżności należy omówić z uwzględnieniem ograniczeń zastosowanej procedury ekstrakcji i modelu spektrofotometrycznego;

9. wnioski, w tym ocenę wpływu ultradźwięków na względną efektywność ekstrakcji w warunkach przeprowadzonego doświadczenia.

Zakres zagadnień obowiązujących do ćwiczenia

1. Zakresy UVA, UVB i UVC oraz ich znaczenie biologiczne.

2. Organiczne i nieorganiczne filtry UV oraz podstawowe mechanizmy ich działania.

3. Znaczenie wskaźnika SPF i ograniczenia jego interpretacji.

4. Podstawy spektrofotometrii UV-Vis: transmitancja, absorbancja i prawo Lamberta-Beera.

5. Ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami – zasada działania i czynniki wpływające na efektywność ekstrakcji.

6. Wpływ temperatury, czasu, rodzaju rozpuszczalnika i mieszania na proces ekstrakcji.

7. Porównanie ekstrakcji wspomaganej ultradźwiękami z ekstrakcją w łaźni wodnej.

8. Znaczenie rozcieńczeń i korekty wyniku względem masy próbki.

9. Ograniczenia spektrofotometrycznego oszacowania SPF dla wieloskładnikowej matrycy kosmetycznej.

LITERATURA

1. World Health Organization, Ultraviolet radiation, materiały informacyjne WHO dotyczące promieniowania UV i jego podziału na UVA, UVB i UVC.

2. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1223/2009 z dnia 30 listopada 2009 r. dotyczące produktów kosmetycznych, z późniejszymi zmianami, załącznik VI – wykaz filtrów UV dozwolonych w produktach kosmetycznych.

3. ISO 24444:2019, Cosmetics — Sun protection test methods — In vivo determination of the sun protection factor (SPF), wraz z późniejszymi zmianami.

4. Walters C., Keeney A., Wigal C.T., Johnston C.R., Cornelius R.D., The Spectrophotometric Analysis and Modeling of Sunscreens, Journal of Chemical Education 74 (1997) 99.

5. Dutra E.A., Oliveira D.A.G.C., Kedor-Hackmann E.R.M., Santoro M.I.R.M., Determination of sun protection factor (SPF) of sunscreens by ultraviolet spectrophotometry, Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences 40(3) (2004) 381–385.

6. Marczenko Z., Balcerzak M., Spektrofotometryczne metody w analizie nieorganicznej, PWN, Warszawa 1998.