

Ekstrakcja i chromatografia w analityce

W03CHE-SM1008L

Ćwiczenie 7. Oznaczenie substancji promieniochronnych stosowanych w kremach przeciwsłonecznych.

Cel ćwiczenia: Zastosowanie ekstrakcji wspomaganą ultradźwiękami do ilościowego oznaczenia substancji promieniochronnych (tzw.: filtrów ochronnych) stosowanych w kosmetykach do ochrony przed promieniowaniem słonecznym.

Wprowadzenie

na podstawie [1, 2, 3]

Promieniowanie słoneczne jest promieniowaniem elektromagnetycznym, mieszczącym się w zakresie od 290 do 400 nm. Składa się z trzech rodzajów promieniowania: promieniowania podczerwonego, światła widzialnego oraz promieniowania ultrafioletowego. Największy wpływ na ludzką skórę ma promieniowanie ultrafioletowe. Ze względu na długość fali promieniowanie ultrafioletowe dzieli się na trzy zakresy :

1. UVC (100 – 290 nm) - najbardziej niebezpieczne dla ludzkiego organizmu; jest niemal całkowicie zatrzymywane przez warstwę ozonową i prawie w ogóle nie dociera do powierzchni ziemi;
2. UVB (290 – 320 nm) - penetruje naskórek oraz skórę właściwą; w wyniku działania tego promieniowania powstaje opalenizna oraz poparzenia słoneczne (opóźnione oparzenia słoneczne, tj. rumień występujący w ciągu 12-24 godzin po ekspozycji); absorbowane jest głównie przez wierzchnią warstwę naskórka; promieniowanie UVB stanowi jedynie około 5% promieniowania ultrafioletowego docierającego do powierzchni Ziemi, pozostałe 95% to promieniowanie UVA.
3. UVA (320 – 400 nm) - natężenie tego rodzaju promieniowania utrzymuje się na stałym poziomie przez cały dzień, niezależnie od pogody i pory roku; promieniowanie o tej długości fali wnika do tkanki podskórnej powodując natychmiastowe poparzenie słoneczne, które maleje w ciągu 2 godzin po ekspozycji; właśnie promieniowanie UVA jest odpowiedzialne za niszczenie kolagenu w skórze, plamy pigmentacyjne, przedwczesne starzenie oraz zmiany nowotworowe.

Aby nie narażać ludzkiej skóry na szkodliwe działanie promieniowania słonecznego produkowane są kremy zawierające tzw. filtry przeciwsłoneczne. Filtry przeciwsłoneczne UV to związki chemiczne, wykorzystywane w kosmetykach, których podstawowym zadaniem jest ochrona skóry przed szkodliwym działaniem promieniowania słonecznego. Właściwości ochronne kremów przeciwsłonecznych zależą od ich składu. W dostępnych w sprzedaży kosmetykach stosowane są dwa rodzaje filtrów przeciwsłonecznych.

Pierwszy rodzaj stanowią tzw. filtry chemiczne, czyli syntetyczne związki chemiczne pochłaniające energię niesioną przez promieniowanie słoneczne. Należą do nich: oktokrylen (UVB), silatrisol (trisiloxan drometrisolu, ochrona przed UVA i UVB), avobenzon (metoksydibenzoilometanobutyl, UVA), tinosorb M (filtr nowej generacji, chroni przed UVB i UVA).

Do drugiej grupy należą tzw. filtry mineralne (fizyczne, naturalne), będące substancjami odbijającymi lub rozpraszającymi promieniowanie słoneczne. Najczęściej stosowane są: dwutlenek tytanu oraz tlenek cynku. Obydwa chronią przed UVB oraz częściowo przed promieniami UVA.

Wskaźnik SPF - współczynnik ochrony przeciwsłonecznej (ang. *Sun Protection Factor*) - jest miarą skuteczności kosmetyku w przeciwdziałaniu oparzeniom słonecznym, będących skutkiem ekspozycji skóry na promieniowanie ultrafioletowe z zakresu UVB. Wskaźnik ten określa, o ile czasu dłużej możemy przebywać na słońcu - po zastosowaniu danego preparatu - do momentu wystąpienia rumienia skóry, w porównaniu czasu wystąpienia na skrze rumienia podczas pobytu na słońcu bez ochrony skóry.

SPF określa stopień ochrony skóry jedynie przed promieniowaniem UVB, co oznacza, że nawet wysoki faktor chroniący przed UVB (np. SPF 30) może wcale nie osłaniać przed promieniami UVA, które wnikają głęboko w skórę i odpowiadają za jej fotostarzenie.

Laboratoryjna metoda oznaczania wartości współczynnika SPF w ogólnym zarysie polega na tym, że na skórę jednego z ochotników aplikuje się krem z filtrem. Zawsze nakłada się krem w ilości 2 mg na każdy cm² skóry. Następnie naświetla się ten fragment skóry lampą emitującą promieniowanie UV, aż do momentu pojawienia się zaczerwienienia skóry. Taki test powtarza się, ale już bez użycia kremu ochronnego.

W praktyce wskaźnik ochrony przeciwsłonecznej można oszacować z pomiarów absorpcji, jako odwrotność efektywnej transmisji promieniowania UV przez środek przeciwsłoneczny [4, 5, 6]

Zakładając, że użytkownik zastosował na skórę środek przeciwsłoneczny o SPF równym 2, to może pozostawać na słońcu dwa razy dłużej niż gdyby tego środka nie użył. Ilość promieniowania przechodząca przez warstwę środka przeciwsłonecznego rozproszoną na skórze będzie połową ilości, która działałaby na skórę, gdyby filtru przeciwsłonecznego nie zastosowano. Jeżeli przyjmiemy, że I_0 będzie intensywnością światła docierającego do powierzchni skóry niechronionej, zaś I będzie oznaczało intensywność światła docierającego do skóry poprzez warstwę środka przeciwsłonecznego, wtedy absorbancja (A):

$$A = -\log_{10}(I/I_0) = -\log_{10}(0,5) = 0,3 \quad (1)$$

Zależność pomiędzy absorbancją i SPF powinna być wyrażona przez równanie:

$$A = -\log_{10}(1/SPF) = \log_{10}SPF \quad (2)$$

Należy jednak pamiętać, że obecnie stosowane laboratoryjne testy kremów zawierających filtry przeciwsłoneczne oparte na pomiarach absorpcji rozcieńczonych roztworów obarczone są znacznymi błędami wynikającymi z braku ilościowej ekstrakcji poszczególnych składników kremów oraz interferencjami (np. odbiciem i rozproszeniem promieniowania) wynikającymi z obecności dodatkowych składników kremów.

WYKONANIE ĆWICZENIA

Wybrać do analizy 4-5 próbek kremów (najlepiej: jednej marki) różniących się wartością SPF (deklarowaną przez producenta).

Procedura ekstrakcji wspomaganej ultradźwiękami

W plastikowej probówce wirówkowej o pojemności 30 cm³ umieścić, za pomocą bagietki szklanej lub szpatułki, około 0,0500 g kremu przeciwsłonecznego starając się by krem umieścić jak najbliżej dna próbówki. Aby uniknąć zanieczyszczenia kolejnych próbek kremu, po każdym użyciu bagietkę należy przetrzeć izopropanolem. W ten sam sposób przygotować przynajmniej jeszcze jedną odważkę kremu (próbki równoległe).

Postępując analogicznie przygotować po minimum dwie odważki pozostałych kremów.

Następnie, do każdej z próbek z odważonym kremem, dodać po 5,00 ml izopropanolu i dokładnie wymieszać (przez delikatne wstrząsanie, nie wytrząsanie). Probówki wraz z zawartością należy umieścić w myjce ultradźwiękowej, w kąpeli wodnej o temperaturze 45 – 50 °C. Zawartość próbek poddawać działaniu ultradźwięków przez 15 minut. Uwaga! Podczas procesu ekstrakcji próbki powinny być otwarte. Po upływie 15 minut zawartość próbek należy schłodzić do temperatury pokojowej, a następnie odwirować (6 minut, 7500 obr./min.). Do pomiaru należy pozostawić klarowną ciecz zebraną z nad osadu (ekstrakt zawiera aktywne składniki kremów).

Procedura ekstrakcji bez wspomaganie

W celu porównania wydajności ekstrakcji wspomaganej ultradźwiękami i ekstrakcji prowadzonej bez wspomaganie należy, z zestawu kremów do analizy, wybrać jeden preparat i dla niego przygotować dodatkowe próbki do analizy.

W plastikowej probówce wirówkowej o pojemności 30 cm³ umieścić, podobnie jak w przypadku procedury opisanej powyżej, około 0,0500 g kremu przeciwsłonecznego. Do każdej z próbek z odważonym kremem, dodać po 5,00 ml izopropanolu i dokładnie wymieszać (przez delikatne wstrząsanie, nie wytrząsanie). Probówki wraz z zawartością należy umieścić w kąpeli wodnej o temperaturze 45 – 50 °C, w wytrząsarce. Zawartość próbek wytrząsać przez 15 minut. Po upływie 15 minut zawartość próbek należy schłodzić do temperatury pokojowej, a następnie odwirować (6 minut, 7500 obr./min.). Do pomiaru należy pobrać z nad osadu klarowną ciecz.

Przygotowanie roztworów do pomiarów absorbancji - rozcieńczenia

W celu przygotowania próbek do pomiarów spektrofotometrycznych roztwór zawierający aktywne składniki kremów należy dwudziestokrotnie (20 x) rozcieńczyć 2-propanolem. Następnie z każdej rozcieńczonej próbki należy przygotować roztwór do pomiaru przenosząc 1,00 cm³ roztworu do kolbki o pojemności 10,00 cm³ i uzupełnić izopropanolem do kreski.

Wykonanie pomiarów; sporządzenie widm absorpcyjnych

Przy wykorzystaniu spektrofotometru Genesis 10 UV/VIS (Thermo Scientific) wykonać pomiar widm absorpcyjnych w zakresie 200 – 450 nm (krok: co 2-5 nm) dla każdej z badanych próbek względem 2-propanolu jako roztworu odniesienia. Pomiar absorbancji należy przeprowadzić w kuwetach kwarcowych pamiętając, aby kuwetę, przed umieszczeniem w niej próbki, przepłukiwać roztworem odniesienia (izopropanol), jednocześnie pamiętając by nie rozcieńczyć próbki.

Sprawozdanie

W sprawozdaniu trzeba zamieścić widma absorpcyjne dla uzyskane dla roztworów różnych kremów przeciwsłonecznych. Na podstawie uzyskanych widm wyznaczyć długości fali odpowiadające maksimum absorpcji w poszczególnych zakresach: UVA, UVB, UVC. Należy również wyznaczyć maksymalną absorbancję w zakresie UVB, dla każdego z badanych roztworów, przy jednej, wybranej długości fali.

Maksymalną absorbcję, wyznaczoną dla jednej długości fali z zakresu UVB, należy skorygować do standardowej masy odważki kremu wynoszącej 0,0500 przez podzielenie jej przez faktyczną masę i pomnożenie przez standardowe 0,0500. Na podstawie skorygowanych wartości absorbcji obliczyć SPF analizowanych kremów (wzór (2), zamieszczony na drugiej stronie instrukcji).

Posługując się skorygowanymi wartościami absorbcji proszę sporządzić wykres zależności $A = f(\log_{10}SPF)$ dla uprzednio wybranej długości fali z zakresu UVB dla wszystkich roztworów środków przeciwsłonecznych. Proszę również, na podstawie równania prostej (uzyskanej dla wykresu zależności $A = f(\log_{10}SPF)$), obliczyć wyznaczone eksperymentalnie wartości SPF analizowanych preparatów.

Sformułować wnioski, z uwzględnieniem wydajności procedury ekstrakcji prowadzonej bez wspomagania.

Literatura

1. Nole G., Johnson A.W., An analysis of cumulative lifetime solar ultraviolet radiation exposure and benefits of daily sun protection, *Dermatologic Therapy*, 17, 57, 2004;
2. <http://mediweb.pl>
3. <http://www.przegląd-tygodnik.pl>
4. Walters C. et al, The Spectrophotometric Analysis and Modeling of Sunscreens, *Journal of Chemical Education*, 74, 99, 1997;
5. Dutra E.A. et al., Determination of sun protection factor (SPF) of sunscreens by ultraviolet spectrophotometry, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 40 (3), 381, 2004;
6. Marczenko Z., Balcerzak M., *Spektrofotometryczne metody w analizie nieorganicznej*, PWN, Warszawa 1998;