

УДК 543.632.9

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА Е (АЦЕТАТА $\alpha$ -ТОКОФЕРОЛА) НА ПОВЕРХНОСТИ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ИК-ФУРЬЕ СПЕКТРОМЕТРИИ И ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ АСПЕКТОВ ЕГО ТРАНСДЕРМАЛЬНОГО ПЕРЕНОСА

© 2021 г. И. Н. Фадейкина<sup>а</sup>, \*, Е. С. Пеункова<sup>а</sup>, Б. К. Зуев<sup>б</sup>

<sup>а</sup>Государственный университет “Дубна”

ул. Университетская, 19, Дубна, Московская обл., 141980 Россия

<sup>б</sup>Институт геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского Российской академии наук  
ул. Косыгина, 19, Москва, 119991 Россия

\*e-mail: i.fadeikina@yandex.ru

Поступила в редакцию 25.05.2020 г.

После доработки 22.07.2020 г.

Принята к публикации 18.08.2020 г.

Рассмотрены возможности применения метода ИК-Фурье спектроскопии для определения органических веществ на поверхности кожи человека и изучения некоторых аспектов трансдермального переноса косметических активов с поверхности во внутренние слои кожи. В качестве исследуемого косметического актива выбран витамин Е в форме ацетата альфа-токоферола. Предложена методика определения изменения концентрации витамина Е с течением времени, использован проботбор с применением стандартных таблеток бромиды калия, получена зависимость, иллюстрирующая уменьшение концентрации косметического актива во времени. Показано, что ИК-Фурье спектроскопию можно применять как простой и экспрессный метод исследования механизмов переноса веществ и изучения трансдермальных свойств кожи.

**Ключевые слова:** ИК-Фурье спектроскопия, косметический актив, витамин Е, трансдермальные свойства.

**DOI:** 10.31857/S0044450221020080

Появление и внедрение новых активных компонентов косметических средств требует исследования их свойств, знания эффективной концентрации на поверхности кожи и их действия на кожу человека. Для этого необходимы новые методы обнаружения таких сложных компонентов, как гиалуроновая кислота, пептиды, витамины и т.п., а также разработка способов определения их концентрации и изучения особенностей проникновения в кожу (трансдермальные свойства кожи).

Трансдермальные свойства кожи — один из главных вопросов в косметологии и дерматологии. Подобные исследования нужны для определения характеристик и показателей кожи при выборе стратегии лечения и косметических средств; для изучения механизмов и кинетических параметров переноса активных веществ, нанесенных на кожу; для расчета нормы ввода активных компонентов в состав лекарственных и косметических средств и времени их воздействия. На сегодня разработаны и охарактеризованы методы определения основных характеристик кожи: pH, жирности (липидный баланс), увлажненности

(сухость), пигментации, механических свойств, микроциркуляции и внутренних структур кожи; определен и описан химический состав гидролипидной мантии и естественных увлажняющих компонентов на поверхности кожи; описано несколько математических моделей, рассматривающих перенос веществ через кожу как через мембрану и как через диффузионную ячейку для некоторых лекарственных препаратов [1–3]. Существующие методы изучения процессов взаимодействия лекарственных и косметических препаратов с кожей являются, как правило, трудоемкими и дорогостоящими. Данные по эффективности проникновения наночастиц серебра через кожу человека, полученные с использованием методов UV-Vis спектроскопии и сканирующей просвечивающей электронной микроскопии, описаны в работе [4]. Методом ВЭЖХ–масс-спектрометрии исследована [5] доставка ацетилсалициловой кислоты в глубокие слои кожи в течение 24 ч и получены данные о динамике диффузии *in vitro*. Атомно-абсорбционную спектроскопию применили [6] в исследованиях кожи для определения остаточных

концентраций металлов, поступивших из внешней среды. Для определения гиалуроновой кислоты на поверхности кожи человека и получения зависимости проникновения гиалуроновой кислоты в кожу человека от времени использовали метод окситермографии [7–9]. Методика определения поверхностной концентрации гиалуроновой кислоты основана на контроле переноса органического вещества с поверхности кожи на чистую шероховатую поверхность кварцевого пробоотборника. Органическое вещество на поверхности пробоотборника определяли методом окситермографии с использованием воздуха в качестве окислительной среды.

В работе [10] рассмотрены модели человеческой кожи с использованием прототипов в виде целлофановой пленки и кожного покрова уха свиньи. Следует отметить, что в исследовании участвовали липосомальная и микроэмульсионная формы альфа-токоферола.

Классическим методом определения органических веществ является ИК-Фурье спектроскопия [11]. Однако имеется ряд вопросов, связанных с возможностью применения данного метода к такому сложному биологическому объекту, как кожа, со способами пробоотбора органического вещества с поверхности кожи, а также с решением проблем определения низких концентраций веществ. Дополнительные затруднения возникают при учете индивидуального состава смеси веществ на поверхности кожи и индивидуального распределения зон с повышенным содержанием веществ у каждого человека, сложного и меняющегося во времени состава этой смеси, различных механизмов переноса для гидрофильных и липофильных веществ, сложности пробоотбора и разделения компонентов смеси.

Цель данной работы – разработка методики определения косметического вещества (на примере витамина Е), нанесенного в виде тонкой пленки на поверхность кожи человека, с использованием метода ИК-Фурье спектроскопии и построение зависимости изменения концентрации косметического препарата на поверхности кожи человека от времени для характеристики особенностей его трансдермального переноса.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Методика определения косметических веществ на поверхности кожи человека для изучения их трансдермального переноса включала следующие этапы:

1) Выбор на поверхности кожи человека однородного участка (без повреждений и избыточного волосяного покрова).

2) Подготовка поверхности кожи перед нанесением косметического актива (очистение и обезжиривание).

3) Равномерное нанесение на поверхность кожи косметического актива в исследуемой форме.

4) Пробоотбор нанесенного органического вещества через определенные промежутки времени с различных участков поверхности кожи.

5) Определение органического вещества на поверхности пробоотборника с использованием метода ИК-Фурье спектроскопии.

6) Построение и анализ зависимости изменения концентрации косметического вещества на поверхности кожи человека от времени.

Данную методику опробовали при изучении трансдермального переноса витамина Е в форме альфа-токоферола ацетата. Витамин Е относится к малоопасным веществам (4 класс опасности согласно ГОСТ 12.1.007-76), поэтому предварительных исследований на животных и модельных объектах не требовалось. Целевая группа исследования: девушки от 18 до 24 лет (живые люди). Область исследования: кожа рук на внутренней поверхности локтевого сустава.

Перед нанесением косметического актива поверхность кожи очищали и обезжиривали 85%ным раствором этанола и высушивали. В качестве пробоотборника использовали стандартные таблетки из кристаллического КВг (для ИК-спектроскопии; Shimadzu, Япония). Таблетки диаметром 1 см, толщиной 2 мм, массой 200 мг готовили прессованием с использованием гидравлического пресса со специальной пресс-формой при давлении 7 атм. Для отбора пробы таблетку прикладывали к анализируемой поверхности в течение фиксированного промежутка времени. Каждый раз для анализа нового участка поверхности кожи использовали новую таблетку КВг.

Органические вещества, перенесенные на поверхность таблетки КВг, определяли с помощью ИК-спектрометра с Фурье-преобразованием IRAffinity-1s (Shimadzu, Япония) в режиме пропускания со специальным держателем для таблеток. Прибор дает возможность получать ИК-спектры в диапазоне  $650\text{--}4000\text{ см}^{-1}$ . Программное обеспечение IRSolution и LabSolution позволяет регистрировать спектры в режимах пропускания и поглощения с представлением суммарной интенсивности как в процентах, так и в единицах энергии. Кроме того, имеется возможность использовать стандартные подходы при обработке спектров – проводить нормализацию, строить базовую линию, работать с интегральным спектром или с отдельным характеристическим пиком.

Для выбора аналитических линий получили ИК-спектр витамина Е (рис. 1). Наиболее удобными для обработки оказались характеристиче-

ские линии в спектральных диапазонах 3200–2700  $\text{см}^{-1}$ , 1800–1700  $\text{см}^{-1}$ , а также набор полос в области 1500–1000  $\text{см}^{-1}$ .

Строили градуировочную зависимость аналитического сигнала от концентрации альфа-токоферола. Градуировочные растворы готовили из жидкого альфа-токоферола ацетата (Тульская фармацевтическая фабрика) разбавлением, в качестве растворителя использовали  $\text{CCl}_4$  (чистый для ИК- и УФ-спектрометрии; Вектон, Россия). Исследуемые растворы готовили непосредственно перед проведением измерений. Аликвоты отбирали при помощи набора микропипеток серии "LENPIPET" (диапазоны объемов 5–50, 100–1000 и 1000–10000 мкл, точность отбора аликвоты  $\pm 1.5\%$ ).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве аналитической полосы выбрали спектральный диапазон 1800–1700  $\text{см}^{-1}$  с основным пиком, соответствующим колебаниям связи  $\text{C}=\text{O}$  в исследуемом веществе. Данный диапазон содержит характеристическую полосу поглощения, которая не перекрывается с полосами, соответствующими колебаниям других групп, и позволяет установить четкую зависимость площади или высоты пика от количества вещества на поверхности таблетки КВг. При исследовании кинетики трансдермального переноса рассматривали также характеристические полосы при 2800  $\text{см}^{-1}$ , соответствующие валентным колебаниям связи  $\text{C}-\text{H}$ , и при 1200  $\text{см}^{-1}$ , соответствующие колебаниям группы  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ , обладающие высокой интенсивностью.

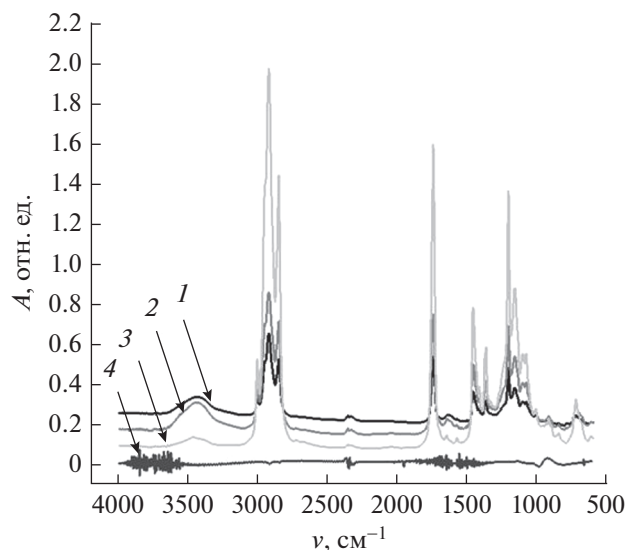
Для количественного определения содержания витамина Е на поверхности таблетки-пробоотборника приготовили шесть градуировочных растворов в  $\text{CCl}_4$  с концентрацией витамина Е от 75 до 1.25 мкл/мл. На поверхность таблеток КВг равномерно наносили 20 мкл приготовленного градуировочного раствора. Для получения градуировочной зависимости рассчитанную концентрацию на поверхности пробоотборника сопоставляли с интенсивностью выбранного характеристического пика при 1750  $\text{см}^{-1}$  (табл. 1). В качестве базовой линии рассматривали спектр поглощения пустой таблетки КВг (рис. 1).

Уравнение полученной градуировочной зависимости имеет вид:

$$y = 1.5117x - 0.1102, \quad R^2 = 0.9923, \quad (1)$$

где  $y$  – интенсивность линии при 1750  $\text{см}^{-1}$ , отн. ед.;  $x$  – концентрация витамина Е на поверхности таблетки КВг, мкл/см<sup>2</sup>.

Для определения предела обнаружения витамина Е на поверхности пробоотборника КВг в со-



**Рис. 1.** ИК-спектры витамина Е на поверхности пробоотборника, использованные для построения градуировочной зависимости. Концентрация витамина Е, мкл/см<sup>2</sup>: 1 – 1.49, 2 – 0.42, 3 – 0.21, 4 – пустая таблетка КВг.

ответствии с рекомендациями [12] использовали 3 $\sigma$ -критерий и коэффициент чувствительности из уравнения (1). Значение предела обнаружения витамина Е на поверхности таблетки КВг составило 0.033 мкл/см<sup>2</sup>.

Для реализации предложенного способа определения витамина Е на поверхности кожи исследовали полноту переноса вещества на поверхность пробоотборника. На зависимость концентрации вещества на поверхности кожи человека от времени влияют трансдермальные свойства кожи и испарение в атмосферу нанесенного вещества с ее поверхности. Для изучения влияния этих факторов провели две серии экспериментов с использованием инертной невпитывающей по-

**Таблица 1.** Зависимость высоты ИК-пика от поверхностной концентрации витамина Е на таблетке КВг при 1750  $\text{см}^{-1}$

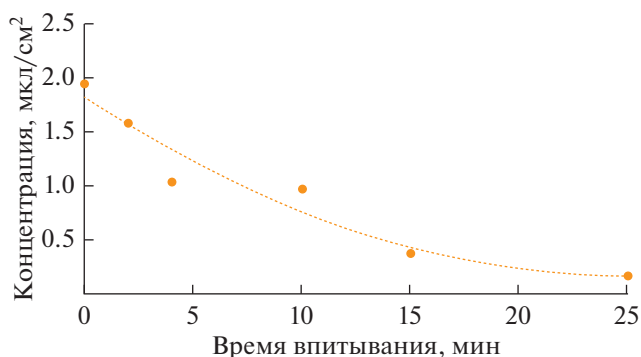
Концентрация витамина Е в приготовленных растворах, мкл/мл	Концентрация витамина Е на поверхности таблетки КВг, мкл/см <sup>2</sup>	Высота пика, отн. ед.
1.25	0.01	0.000 $\pm$ 0.012
7.5	0.10	0.016 $\pm$ 0.012
10	0.14	0.035 $\pm$ 0.012
15	0.21	0.220 $\pm$ 0.011
30	0.42	0.514 $\pm$ 0.026
75	1.49	1.49 $\pm$ 0.07

**Таблица 2.** Результаты эксперимента по переносу витамина Е с полиэтиленовой пленки на таблетку КВг для различных способов пробоотбора

Способ пробоотбора	Высота пика (1750 $\text{cm}^{-1}$ ), отн. ед.	Концентрация, $\text{мкл}/\text{см}^2$
Пробоотбор витамина Е сразу после нанесения на ПЭ-пленку (поверхностная концентрация 1.53 $\text{мкл}/\text{см}^2$ )	$1.03 \pm 0.05$	$1.45 \pm 0.07$
Повторный пробоотбор витамина Е с участков поверхности ПЭ-пленки, с которых ранее был выполнен пробоотбор	$0.085 \pm 0.004$	$0.018 \pm 0.001$
Пробоотбор витамина Е через 20 мин после нанесения пленки витамина Е на ПЭ-пленку (начальная поверхностная концентрация 1.53 $\text{мкл}/\text{см}^2$ )	$1.04 \pm 0.05$	$1.45 \pm 0.07$
Пробоотбор витамина Е сразу после нанесения на ПЭ-пленку (поверхностная концентрация 0.92 $\text{мкл}/\text{см}^2$ )	$0.59 \pm 0.03$	$0.79 \pm 0.04$

лиэтиленовой пленки (ПЭ), закрепленной на упругой поверхности, имитирующей кожу. 200  $\text{мкл}$  раствора витамина Е в  $\text{CCl}_4$ , содержащего 75  $\text{мкл}$  витамина в пересчете на чистое вещество, равномерно наносили на подготовленные поверхности площадью 49 и 81  $\text{см}^2$ . При этом поверхностная концентрация витамина составила соответственно 1.53 и 0.92  $\text{мкл}/\text{см}^2$ . Пробоотбор на таблетку КВг проводили с поверхности ПЭ сразу после нанесения пленки витамина Е, а также через 20 мин после первого пробоотбора с нового участка поверхности с нанесенным витамином Е. Кроме того, отбирали пробу повторно с участка поверхности ПЭ, с которого уже проводили пробоотбор ранее.

С помощью ИК-Фурье спектрометра регистрировали ИК-спектры витамина Е, перенесенного на таблетку КВг при различных условиях пробоотбора. Результаты эксперимента по пробоотбору витамина Е с поверхности полиэтиленовой пленки с указанием расширенной неопределенности представлены в табл. 2. Как видно, на чистую поверхность таблетки КВг может переходить практически весь нанесенный на кожу витамин Е в точке пробоотбора.

**Рис. 2.** Зависимость поверхностной концентрации витамина Е на коже человека от времени, полученная путем измерения высоты характеристического пика при 1750  $\text{cm}^{-1}$ .

Используя предложенный прием пробоотбора, можно контролировать изменения концентрации витамина на поверхности кожи человека. Как видно, в течение 20 мин после нанесения концентрация витамина Е на невпитывающей поверхности не изменяется, т.е. не происходит его интенсивное испарение в атмосферу. Можно предположить, что основным процессом, определяющим изменение концентрации витамина Е на поверхности кожи, является трансдермальный перенос вещества.

Для изучения скорости изменения поверхностной концентрации витамина Е на коже человека на предварительно обезжиренную путем спиртовой обработки кожу рук на внутренней поверхности локтевого сустава дозатором наносили 200  $\text{мкл}$  витамина Е и распределяли равномерно на доступной поверхности кожи, насколько это было возможно в условиях эксперимента. Далее при помощи таблеток КВг с поверхности кожи отбирали витамин Е через определенные промежутки времени и определяли его поверхностную концентрацию методом ИК-Фурье спектрометрии. Таблетки КВг прикладывали к коже на 20 с. С помощью программного обеспечения прибора Igraffinity-1s рассчитывали высоты пиков и строили график зависимости высоты пика, соотносящейся с количеством отобранного вещества, от времени впитывания витамина Е в кожу. На рис. 2 в качестве примера представлена зависимость поверхностной концентрации витамина Е на коже человека от времени для одного из участников исследования. Зависимости для других участников исследования аналогичны. Вопрос о возможности объединения результатов для разных людей пока остается открытым, поскольку предварительно следует оценить влияние увлажненности кожи, типа кожи и других факторов на результаты исследования.

Из зависимости поверхностной концентрации косметического актива от времени видно, что на

разных участках скорость трансдермального переноса витамина Е различается, что соответствует различному порядку переноса и другим кинетическим параметрам процесса. Исследование данных вопросов позволит прояснить механизм впитывания витамина Е и других косметических активов. Оценить погрешность определения поверхностной концентрации витамина Е можно, исходя из экспериментов по пробоотбору с поверхности ПЭ-пленки. Для исследуемых поверхностных концентраций относительная стандартная неопределенность составляет около 0.05.

При определении косметических активов на поверхности кожи следует рассмотреть вопрос влияния органических компонентов себума. В работах [13, 14], например, установлено влияние глицеридов жирных кислот на определение альфа-токоферола. Однако авторы отмечают, что предварительное обезжиривание кожи спиртовым раствором позволяет исключить данный фактор, что подтверждается отсутствием дополнительных полос поглощения в ИК-спектрах проб после отбора с поверхности кожи.

Предложенная методика, по мнению авторов, может быть применена для изучения трансдермального переноса других косметических активов, имеющих характеристические колебательные полосы в приведенном диапазоне волновых чисел и низкую летучесть, таких как пептиды, витамины, некоторые поверхностно-активные вещества, гиалуроновая кислота и т.д. При выбранном подходе ИК-Фурье спектроскопия имеет существенные преимущества по сравнению с хроматографическими методиками количественного определения веществ на поверхности кожи и аппаратными методами, дающими скорее качественные, нежели количественные характеристики. Предложенный авторами подход позволяет быстро описать качественный и количественный состав косметического актива. Однако при использовании пробоотборника на основе КВг могут возникнуть трудности, если косметический актив содержится в водной среде. В случае исследования водных растворов и эмульсий возможен вариант применения приставки нарушенного полного внутреннего отражения.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Задымова Н.М.* Жидкофазные дисперсные системы как основа микрогетерогенных полимерных матриц для трансдермальной доставки лекарств. Дис. ... докт. хим. наук. М.: Моск. гос. ун-т им. М.В. Ломоносова, 2014. 273 с.
2. *Рыжикова В.А.* Трансдермальная терапевтическая система бромокаинана основе биосовместимой микроэмульсионной композиции. Дис. ... канд. биол. наук. М.: Федер. науч. центр трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова, 2015. 106 с.
3. *Flynn G.L.* Physiochemical determinants of skin absorption / Principles of Route-to-route Extrapolation for Risk Assessment / Eds. Gerity T.R., Henry C.J. Amsterdam: Elsevier Science Publishing Co. Inc., 1990. P. 93.
4. *Domeradzka-Gajda K., Nocun M., Roszak J., Janasik B., Quarles C.D., Wasowicz W.* A study on the in vitro percutaneous absorption of silver nanoparticles in combination with aluminum chloride, methyl paraben or di-n-butyl phthalate // *Toxicol. Lett.* 2017. V. 272. P. 38.
5. *Duracher L., Visdal-Johnsen L., Mavon A.* In vitro and in vivo dermal absorption assessment of acetyl aspartic acid: a compartmental study // *Int. J. Cosmetic Sci.* 2015. V. 37. P. 34.
6. *Zeiner M., Cindric I.J., Kandler W., Stinger G.* Trace determination of skin-irritating metals in tea tree oil by GFAAS // *Microchem. J.* 2018. V. 136. P. 101.
7. *Зуев Б.К., Филоненко В.Г., Нестерович Д.С., Поликарпова П.Д.* Определение гиалуроновой кислоты в водных растворах с использованием воздуха как окислителя // *Журн. аналит. химии.* 2018. Т. 73. № 10. С. 763.
8. *Пеункова Е.С., Зуев Б.К., Моржухина С.В.* Изучение распределения органических веществ на поверхности лица методом окситермографии / Семьдесят первая всероссийская научно-техническая конференция студентов, магистрантов и аспирантов высших учебных заведений с международным участием / Под ред. Канакотиной М.А. Ярославль: Издательский дом ЯГТУ, 2018. Ч. 1. С. 253.
9. *Зуев Б.К., Филоненко В.Г., Коротков А.С., Сараева А.Е., Поликарпова П.Д.* Пробоотбор и определение гиалуроновой кислоты на имитаторе кожи человека методом окситермографии // *Журн. аналит. химии.* 2019. Т. 74. № 4. С. 315. (*Zuev B.K., Filonenko V.G., Korotkov A.S., Saraeva A.E., Polikarpova P.D.* Sampling and determination of hyaluronic acid on a human skin imitator by oxithermography // *J. Analyt. Chem.* 2019. V. 74. № 4. P. 410.)
10. *Karunaratne D.N., Dassanayake A.C., Geethi K Paminuwa K.M., Karunaratne V.* Improved skin permeability of D1- $\alpha$ -tocopherol in topical macroemulsions // *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 2014. V. 6. № 6. P. 53.
11. *Преч Э., Бюльман Ф., Аффольтер К.* Определение органических соединений / Пер. с англ. Тарасевич Б.Н. М.: Мир; Бином. Лаборатория знаний, 2006. С. 438.
12. *Основы аналитической химии.* В 2-х тт. Т. 1. Учеб. для студ. учреждений высш. проф. образования / Под ред. Золотова Ю.А. М.: Академия, 2012. С. 384.
13. *Valasi L., Arvanitaki D., Mitropoulou A., Georgiadou M., Pappas Ch.* Study of the quality parameters and the anti-oxidant capacity for the FTIR-chemometric differentiation of Pistacia Vera oils // *Molecules.* 2020. V. 25. P. 1614.
14. *Silva S.D., Rosa N.F., Ferreira A.E., Boas L.V., Bronze M.R.* Rapid determination of  $\alpha$ -tocopherol in vegetable oils by fourier transform infrared spectroscopy // *Food Anal. Methods.* 2009. V. 2. P. 120.