

DEPARTAMENT QUÍMICA ANALÍTICA

DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA
ESTIMACIÓN DE LA SEGURIDAD Y EL CONTROL DE
CALIDAD DE LOS PRODUCTOS COSMÉTICOS

ÁNGEL BALAGUER TIMOR

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2008

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 19 de setembre de 2008 davant un tribunal format per:

- D^a. Carmen Camara Rico
- D^a. María Dolores Luque de Castro
- D. Antonio Canals Hernández
- D. Manuel Valiente Malmagro
- D^a. Pilar Campins Falcó

Va ser dirigida per:

D^a. Amparo Salvador Carreño

D. Alberto Chisvert Sanía

©Copyright: Servei de Publicacions
Ángel Balaguer Timor

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-7351-4

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Artes Gráficas, 13 bajo

46010 València

Spain

Telèfon: 963864115

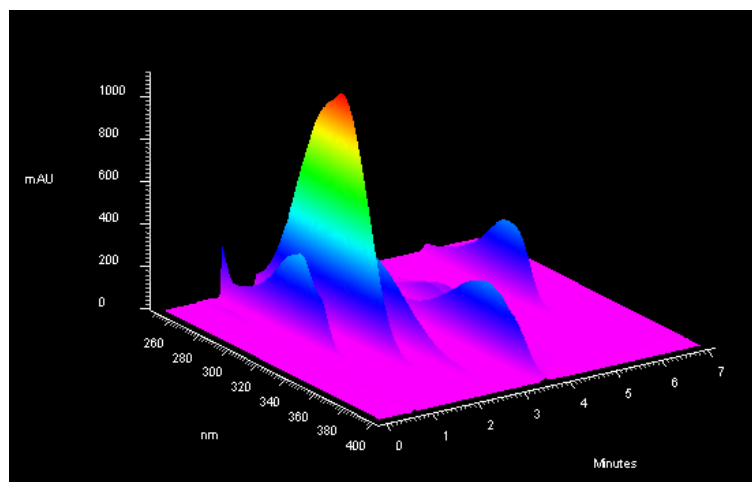
VNIVERSITAT ID VALÈNCIA



FACULTAD DE QUIMICA

DEPARTAMENTO DE QUIMICA ANALÍTICA

**DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS
PARA LA ESTIMACIÓN DE LA
SEGURIDAD Y EL CONTROL DE CALIDAD
DE LOS PRODUCTOS COSMÉTICOS**



**TESIS DOCTORAL
Ángel Balaguer Timor
Valencia, 2008**

UNIVERSIDAD DE VALENCIA
FACULTAD DE QUIMICA
DEPARTAMENTO DE QUIMICA ANALÍTICA



**DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS
PARA LA ESTIMACIÓN DE LA
SEGURIDAD Y EL CONTROL DE CALIDAD
DE LOS PRODUCTOS COSMÉTICOS**

**Memoria presentada por D. Ángel Balaguer Timor,
Licenciado en Química, para la obtención del
título de Doctor
Valencia, 2008**

Dr. D. Carlos Mongay Fernández, Catedrático de Universidad y Director del Departamento de Química Analítica de la Universitat de València,

INFORMA

Que la presente memoria, titulada "Desarrollo de métodos analíticos para la estimación de la seguridad y el control de calidad de los productos cosméticos", que presenta D. Ángel Balaguer Timor para optar al Grado de Doctor en Química, ha sido realizada bajo la dirección de la profesora Dra. D^a Amparo Salvador Carreño y el profesor Dr. D. Alberto Chisvert Sanía en el Departamento de Química analítica de la Universitat de València.

Y para que así conste, firmo el presente informe en Valencia, a 4 de Julio de 2008.

Fdo. C. Mongay

Dra. D^a Amparo Salvador Carreño, Catedrática de Universidad y Dr. D. Alberto Chisvert Sanía, Profesor Contratado Doctor del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Química de la Universitat de València, como Directores de la Tesis Doctoral presentada por D. Ángel Balaguer Timor, con el título “Desarrollo de métodos analíticos para la estimación de la seguridad y el control de calidad de los productos cosméticos”,

CERTIFICAN

Que la citada Tesis Doctoral se ha realizado en los laboratorios del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Química de la Universitat de València, y que, a su juicio, reúne los requisitos necesarios exigidos en este tipo de trabajos.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Valencia, a 4 de Julio de 2008.

Fdo. A. Salvador

Fdo. A. Chisvert

PUBLICACIONES

Los resultados recogidos en esta Tesis Doctoral han dado lugar a las siguientes publicaciones:

- ✚ A. Balaguer, A. Chisvert, A. Salvador (2006). “*Sequential injection determination of traces of disodium phenyl dibenzimidazole tetrasulphonate in urine from users of sunscreens by on-line phase extraction coupled with a fluorimetric detector*”. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 40:922-927.

- ✚ A. Balaguer, A. Salvador, A. Chisvert, M. Melia, M. Herráez, O. Díez (2006). “*A liquid chromatographic–fluorimetric method for the in vitro estimation of the skin penetration of disodium phenyldibenzimidazole tetrasulfonate from sunscreen formulations through human skin*”. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 385:1225-1232.

- ✚ A. Chisvert, A. Balaguer, A. Salvador (2007). “*Tanning and whitening agents in cosmetics. Regulatory Aspects and Analytical methods*” en *Analysis of cosmetic products*, A. Salvador, A. Chisvert (Editores), Editorial Elsevier, Amsterdam, 128-140.

- ✚ A. Balaguer, A. Chisvert, A. Salvador (2008). “*A rapid and reliable size-exclusion chromatographic method for determination of kojic dipalmitate in skin-whitening cosmetic products*”. *Talanta*, 75: 407-411.

- ✚ A. Balaguer, A. Chisvert, A. Salvador (2008). “*Environmentally friendly LC for the simultaneous determination of ascorbic acid and its derivatives in skin-whitening cosmetics*”. *Journal of separation science* 31:229-236.

/

VIII, / /

/

- ✚ A. Balaguer, A. Chisvert, A. Salvador, M Herraez , O Diez **(2008)**.
“A solid-phase extraction and size-exclusion liquid chromatographic method for polyethylene glycol 25 p-aminobenzoic acid determination in urine: Validation for urinary excretion studies of users of sunscreens”. *Analytica Chimica Acta*, 611: 220-225.

- ✚ A. Salvador, A. Balaguer, J. Sisternes, A. Chisvert **(2008)**
“Desarrollo de un método cromatográfico limpio para la determinación simultánea de ácido kójico y arbutina en productos cosméticos para el blanqueamiento de la piel”. *NCP-Boletín de la Sociedad Española de Químicos Cosméticos*, en prensa.

- ✚ A. Chisvert, J. Sisternes, A. Balaguer, A. Salvador **(2008)**
“Development and validation of a gas chromatography-mass spectrometry method to determine skin-whitening agents in cosmetic products: fraud detection”. *Analytica Chimica Acta*, enviado.

Esta Tesis Doctoral se enmarca dentro de los objetivos planteados en los siguientes proyectos:

- ✚ BQU 2003-00015: “Desarrollo de métodos analíticos para evaluar la eficacia y seguridad en los productos cosméticos para la protección solar”, Ministerio de Ciencia y Tecnología, duración desde 15/11/2003 hasta 14/11/2006. Investigadora principal: Amparo Salvador Carreño.

- ✚ Proyecto CTQ 2006-00296: “Desarrollo de métodos analíticos para el estudio in vitro de nuevas estrategias para la mejora de la seguridad de los productos cosméticos para la protección solar”, Ministerio de Educación y Ciencia, duración desde 01/10/2006 hasta 30/09/2009. Investigadora principal: Amparo Salvador Carreño.

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta Tesis Doctoral no hubiera sido posible sin la ayuda y la colaboración de muchas personas, organismos públicos y empresas. Por tanto, me gustaría agradecer:

Al Ministerio de Ciencia y Tecnología, por la beca predoctoral concedida.

A todo el Departamento de Química Analítica de la Universitat de València por darme la oportunidad de desarrollar este trabajo, y muy especialmente a mis Directores de Tesis, Amparo Salvador y Alberto Chisvert, por haberme formado como científico y haberme dado su apoyo, tanto a nivel profesional como personal. Gracias de todo corazón.

A los profesores Marina Herráez y Octavio Díez del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, por haberme acogido y enseñado una enorme cantidad de conocimientos desde su punto de vista farmacéutico, que me han sido de gran utilidad no solo para la realización de mi Tesis Doctoral sino también para entender la naturaleza multidisciplinar de la química analítica.

A Pascual Cuadrado, de la empresa RNB Cosméticos y a Ana Torrens, de Corporación Dermoestética, por haberme acercado a los problemas cotidianos del sector cosmético y asistirme en todas mis dudas.

A las empresas DKSH France y L'Oreal, por haberme enviado amablemente algunos patrones para poder realizar los estudios pertinentes.

A mi familia, en especial a mis padres y hermana, por haberme escuchado y ayudado en todo momento con infinita paciencia.

A mi novia Xelo por su comprensión, amor y apoyo incondicional. Sin ella todo hubiera sido mucho más difícil.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio, especialmente a Judit, por su ayuda y por los buenos momentos vividos.

A mis compañeros del departamento y de sobremesa, por compartir tantos momentos agradables, en especial a mi gran amigo José Ramón.

Y a todos los que de una forma u otra han colaborado en esta Tesis.

Gracias.

ÍNDICE GENERAL

JUSTIFICACIÓN GENERAL	13
PARTE 1. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA ESTIMACIÓN DE LOS NIVELES DE ABSORCIÓN PERCUTÁNEA Y EXCRECIÓN URINARIA DE FILTROS SOLARES	15
JUSTIFICACIÓN DE LA PRIMERA PARTE	17
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN DE LA PARTE 1	19
1.1. Interés del estudio de los procesos de absorción percutánea y excreción de los filtros UV	21
1.1.1. Necesidad del uso de productos cosméticos para la protección solar.....	21
1.1.2. Filtros UV. Clasificación y normativa actual.....	22
1.1.3. Ventajas e inconvenientes del uso de productos cosméticos para la protección solar.....	24
1.1.4. Necesidad de la estimación de los niveles de absorción percutánea de los filtros UV y de su excreción.....	26
1.2. Características de la piel. Mecanismos de la absorción de compuestos a través de la piel	27
1.2.1. Características de la piel.....	27
1.2.2. Mecanismos de la absorción percutánea.....	28
1.3. Antecedentes y estado actual de los métodos para la estimación de la absorción percutánea de los filtros UV y/o de su excreción	31
1.3.1. Métodos para el estudio de los procesos de absorción percutánea y excreción de las sustancias presentes en un vehículo o formulación dermatológica o cosmética.....	31
1.3.2. Antecedentes de estudios de absorción percutánea y excreción de filtros UV.....	35
CAPÍTULO 2. DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE FENIL DIBENCIMIDAZOL TETRASULFONATO DISÓDICO EN ORINA HUMANA MEDIANTE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA EN LÍNEA CON DETECCIÓN FLUORIMÉTRICA EMPLEANDO UN SISTEMA DE ANÁLISIS POR INYECCIÓN SECUENCIAL. ESTUDIO DE LA EXCRECIÓN URINARIA DE VOLUNTARIOS DESPUÉS DE LA APLICACIÓN TÓPICA	41
2.1. Introducción y objetivo del trabajo	43

2.2. Parte experimental	44
2.2.1. Metodología experimental.....	44
2.2.2. Aparatos y material.....	45
2.2.3. Reactivos.....	45
2.3. Resultados y discusión	46
2.3.1. Elección de las variables instrumentales.....	46
2.3.2. Extracción en fase sólida empleando una fase de intercambio aniónico fuerte. Elección de la disolución de elución.....	46
2.3.3. Detección de posible errores debidos a la matriz de la orina.....	48
2.3.4. Elección de la disolución de lavado.....	52
2.3.5. Preparación en línea del calibrado de adición estándar en el sistema SIA.....	56
2.3.6. Estudio de la estructura del sándwich.....	58
2.3.7. Preparación del calibrado de adición estándar en línea a partir de una sola disolución de patrón.....	58
2.3.8. Modificación de las condiciones de lavado y elución.....	59
2.3.9. Diseño de la preparación del calibrado de adición estándar para una extrapolación correcta.....	63
2.3.10. Estudio del sistema de filtración utilizado	64
2.3.11. Estudio de la influencia del pH en el resultado analítico	65
2.3.12. Estudio de la estabilidad de las muestras de orina con el tiempo.....	66
2.3.13. Método propuesto para la determinación de PDT en orina de usuarios de productos cosméticos para la protección solar.....	67
2.3.14. Parámetros analíticos del método.....	68
Estudio de la exactitud.....	68
Precisión.....	70
Parámetros instrumentales.....	70
Parámetros de calibración.....	71
2.3.15. Validación del método propuesto mediante el estudio de la excreción urinaria de PDT en usuarios de productos solares.....	71
2.4. Conclusiones	73
CAPÍTULO 3. DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE FENIL DIBENCIMIDAZOL TETRASULFONATO DISÓDICO EN ESTUDIOS BASADOS EN LA SIMULACIÓN <i>IN VITRO</i> DEL PROCESO DE ABSORCIÓN PERCUTÁNEA, EMPLEANDO CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CON DETECCIÓN FLUORIMÉTRICA	75
3.1. Introducción y objetivo del trabajo	77
3.2. Parte experimental	77

3.2.1. Metodología experimental.....	77
3.2.2. Aparatos y material.....	78
3.2.3. Reactivos.....	79
3.2.4. Preparación de la piel humana.....	80
3.2.5. Preparación de las celdas de difusión y toma de muestra.....	81
3.3. Resultados y discusión.....	82
3.3.1. Elección de las variables experimentales del sistema de simulación <i>in vitro</i>	82
3.3.2. Estudio de la integridad de la epidermis. Determinación del marcador rojo de fenol (RF) en muestras de líquido receptor.....	83
3.3.2.1. Estudio de las condiciones experimentales para la determinación del marcador RF.....	85
Estudio del pH de detección.....	85
Estudio de la composición del eluyente.....	86
Estudio del modo de calibración.....	87
Estudio de las variables SIA.....	88
3.3.2.2. Método analítico propuesto para la determinación del marcador RF.....	88
3.3.2.3. Parámetros analíticos del método.....	89
Estudio de la exactitud.....	89
Precisión.....	90
Parámetros instrumentales.....	90
Parámetros de calibración.....	90
3.3.3. Estudio de la absorción percutánea de PDT.....	91
3.3.3.1. Estudio de las condiciones experimentales en la determinación de PDT.....	91
Selección de las longitudes de onda.....	91
Estudio de la fase móvil.....	92
Estudio del caudal de fase móvil.....	93
3.3.3.2. Método analítico propuesto para la determinación del PDT absorbido percutáneamente a través de piel humana.....	94
3.3.3.3. Parámetros analíticos en la determinación de PDT.....	94
Estudio de la exactitud.....	94
Precisión.....	96
Parámetros cromatográficos.....	96
Parámetros de calibración.....	96
3.3.3.4. Aplicación del método propuesto al estudio de la absorción percutánea de PDT a través de piel humana.....	97
3.4. Conclusiones.....	99

CAPÍTULO 4. DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE POLIETILEN GLICOL 25 P-AMINO BENZOATO EN ORINA HUMANA MEDIANTE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA Y CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR CON DETECCIÓN FLUORIMÉTRICA. ESTUDIO DE LA EXCRECIÓN URINARIA DE VOLUNTARIOS DESPUÉS DE LA APLICACIÓN TÓPICA.....	101
4.1. Introducción y objetivo del trabajo.....	103
4.2. Parte experimental.....	104
4.2.1. Metodología experimental.....	104
4.2.2. Aparatos y material.....	104
4.2.3. Reactivos y muestras.....	105
4.3. Resultados y discusión.....	106
4.3.1. Elección de las condiciones de retención/elución en el proceso de extracción en fase sólida.....	106
4.3.2. Detección de posibles errores debidos a la matriz de la orina.....	108
4.3.3. Elección de las condiciones de la separación cromatográfica.....	108
4.3.4. Estudio de la estabilidad de las muestras de orina con el tiempo.....	110
4.3.5. Método propuesto para la determinación de PEG-25 PABA en orina de usuarios de productos cosméticos para la protección solar.....	111
4.3.6. Parámetros analíticos del método propuesto.....	112
Estudio de la exactitud.....	112
Precisión.....	113
Parámetros cromatográficos.....	113
Parámetros de calibración.....	113
4.3.7. Aplicación del método propuesto al estudio de la excreción urinaria de PEG-25 PABA en usuarios de productos solares.....	114
4.4. Conclusiones.....	117
CAPÍTULO 5. DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE POLIETILEN GLICOL 25 P-AMINO BENZOATO EN ESTUDIOS BASADOS EN LA SIMULACIÓN <i>IN VITRO</i> DEL PROCESO DE ABSORCIÓN PERCUTÁNEA, EMPLEANDO CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CON DETECCIÓN FLUORIMÉTRICA	119
5.1. Introducción y objetivo del trabajo.....	121
5.2. Parte experimental.....	121
5.2.1. Metodología experimental.....	121

5.2.2. Aparatos y material.....	122
5.2.3. Reactivos.....	123
5.2.4. Preparación de la piel humana y las celdas de difusión. Toma de muestra.....	124
5.3. Resultados y discusión.....	125
5.3.1. Elección de las variables experimentales del sistema de simulación in vitro.....	125
5.3.2. Estudio de la integridad de la celda. Determinación del marcador rojo de fenol (RF) en muestras de líquido receptor.....	125
5.3.3. Estudio de la absorción percutánea del PEG-25 PABA.....	127
5.3.3.1. Estudio de las condiciones experimentales en la determinación de PEG-25 PABA.....	127
Estudio de la composición de la fase móvil.....	127
Estudio del caudal de fase móvil.....	127
5.3.3.2. Método analítico propuesto para la determinación del PEG-25 PABA absorbido percutáneamente a través de piel humana.....	128
5.3.3.3. Estudio de la estabilidad del PEG-25 PABA en el líquido receptor.....	129
5.3.3.4. Estudio del soporte de la piel.....	129
5.3.3.5. Parámetros analíticos del método.....	130
Estudio de la exactitud.....	130
Precisión.....	131
Parámetros cromatográficos.....	131
Parámetros de calibración.....	131
5.3.4. Estudio de la determinación del PEG-25 PABA remanente en la epidermis y en la crema.....	132
5.3.4.1. Estudio del tiempo de lixiviación en el baño de ultrasonidos.....	133
5.3.4.2. Método analítico propuesto para la determinación de PEG-25 PABA en el vehículo remanente en el compartimento dador y en la epidermis.....	134
5.3.4.3. Parámetros analíticos del método propuesto.....	135
Estudio de la exactitud.....	135
Precisión.....	135
Parámetros cromatográficos.....	136
Parámetros de calibración.....	136
5.3.5. Obtención experimental del coeficiente de reparto octanol/agua del PEG-25 PABA.....	137
5.3.6. Aplicación de los métodos propuestos al estudio de la cinética de absorción percutánea de PEG-25 PABA a través de piel humana.....	138
5.3.6.1. Estudio cinético de la absorción percutánea de PEG25-PABA empleando diferentes vehículos.....	138

5.3.6.2. Estudio de la recuperación del total de PEG-25-PABA aplicada.....	145
5.3.6.3. Discusión de los resultados.....	145
5.4. Conclusiones.....	146

PARTE 2. DETERMINACIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS DESPIGMENTANTES EN PRODUCTOS COSMÉTICOS PARA EL BLANQUEAMIENTO DE LA PIEL.....	149
--	------------

JUSTIFICACIÓN DE LA SEGUNDA PARTE.....	151
---	------------

CAPÍTULO 6. INTRODUCCIÓN DE LA PARTE 2.....	153
--	------------

6.1. Interés cosmético de los agentes despigmentantes.....	155
6.2. Tipos de agentes despigmentantes.....	156
Hidroquinona y derivados.....	157
Ácido kójico y kójico dipalmitato.....	159
Ácido ascórbico y derivados.....	161
Ácido azelaico, ácido fítico y retinol.....	163
6.3. Antecedentes y estado actual de la determinación de agentes despigmentantes en productos cosméticos para el blanqueamiento de la piel.....	164

CAPÍTULO 7. DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE HIDROQUINONA, ÁCIDO KÓJICO, ÁCIDO AZELAICO, RESORCINOL Y ARBUTINA EN PRODUCTOS COSMÉTICOS PARA EL BLANQUEAMIENTO DE LA PIEL MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS Y MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CON DETECCIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA UV/VIS.....	171
---	------------

7.1. Introducción y objetivo del trabajo.....	173
7.2. Parte experimental.....	174
7.2.1. Metodología experimental.....	174
7.2.2. Aparatos y material.....	175
7.2.3. Reactivos y muestras.....	175
7.3. Resultados y discusión.....	176
7.3.1. Determinación de hidroquinona (HQ), ácido kójico (AK), ácido azelaico (AZ), resorcinol (RS) y arbutina (AR) mediante	

cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-EM).....	176
7.3.1.1. Estudio de los parámetros experimentales	176
Efecto del caudal y de la temperatura.....	178
7.3.1.2. Método propuesto para la determinación de HQ, AK, AZ, RS y AR mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).....	180
7.3.1.3. Parámetros analíticos del método.....	181
Parámetros cromatográficos.....	181
Parámetros de calibración.....	182
Estudio de la exactitud.....	183
7.3.1.4. Aplicación del método propuesto al análisis de productos cosméticos para el blanqueamiento de la piel comerciales.....	184
7.3.2. Determinación de hidroquinona (HQ), ácido kójico (AK), resorcinol (RS) y arbutina (AR) mediante cromatografía líquida con detección espectrofotométrica UV/vis.....	191
7.3.2.1. Estudio de los parámetros experimentales	191
Estudios preliminares.....	191
Estudio de la composición de la fase móvil.....	193
Estudio del efecto del caudal.....	194
7.3.2.2. Método propuesto para la determinación de hidroquinona (HQ), ácido kójico (AK), resorcinol (RS) y arbutina (AR) mediante cromatografía líquida con detección espectrofotométrica ultravioleta/visible (CL-UV/vis)	195
7.3.2.3. Parámetros analíticos del método.....	196
Parámetros cromatográficos.....	196
Parámetros de calibración.....	196
Estudio de la exactitud.....	197
7.3.2.4. Aplicación del método propuesto al análisis de productos para el blanqueamiento de la piel comerciales.....	198
7.3.3. Comparación entre los métodos propuestos.....	203
7.4. Conclusiones.....	206
CAPÍTULO 8. DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO Y DE SUS DERIVADOS MÁS UTILIZADOS EN PRODUCTOS COSMÉTICOS PARA EL BLANQUEAMIENTO DE LA PIEL, MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CON DETECCIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA UV/VIS.....	207
8.1. Introducción y objetivo del trabajo.....	209
8.2. Parte experimental.....	211

8.2.1. Metodología experimental.....	211
8.2.2. Aparatos y material.....	211
8.2.3. Reactivos y muestras.....	212
8.3. Resultados y discusión.....	213
8.3.1. Estudios preliminares del disolvente para la preparación de la muestra.....	213
8.3.2. Estudio de las variables cromatográficas y de los posibles interferentes.....	213
8.3.3. Método propuesto para la determinación de ácido ascórbico (AA), ascorbil fosfato (AF), ascorbil glucósido (AG) y ascorbil palmitato (AP).....	221
8.3.4. Parámetros analíticos del método.....	222
Parámetros cromatográficos.....	222
Parámetros de calibración.....	223
Estudio de la exactitud.....	224
8.3.5. Aplicación del método propuesto al análisis de muestras comerciales. Comparación de los resultados obtenidos con el método propuesto con los obtenidos mediante métodos publicados.....	225
8.4. Conclusiones.....	229
CAPÍTULO 9. DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE KÓJICO DIPALMITATO EN PRODUCTOS COSMÉTICOS PARA EL BLANQUEAMIENTO DE LA PIEL MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE EXCLUSIÓN CON DETECCIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA UV/VIS.....	231
9.1. Introducción y objetivo del trabajo.....	233
9.2. Parte experimental.....	234
9.2.1. Metodología experimental.....	234
9.2.2. Aparatos y material.....	234
9.2.3. Reactivos y muestras.....	234
9.3. Resultados y discusión.....	235
9.3.1. Ensayos preliminares.....	235
9.3.2. Estudio de las interferencias.....	237
9.3.3. Método propuesto para la determinación de kójico dipalmitato (KD).....	238
9.3.4. Parámetros analíticos del método.....	239
Parámetros cromatográficos.....	239
Parámetros de calibración.....	239
Estudio de la exactitud.....	239
9.3.5. Aplicación del método propuesto al análisis de productos para el blanqueamiento de la piel comerciales.....	243
9.4. Conclusiones.....	246

CONCLUSIONES GENERALES	247
APÉNDICE I. CLAVES EMPLEADAS	253
APÉNDICE II. CONTRASTES DE SIGNIFICACIÓN	259
➤ II.1. Contraste de Fisher para la comparación de desviaciones estándar.....	261
➤ II.2. Comparación de una media experimental con un valor conocido.....	261
➤ II.3. Comparación de dos medias experimentales	262
➤ II.4. Comparación de dos rectas de regresión.....	263
➤ II.5. Comparación de dos series de resultados mediante un modelo de regresión lineal.....	264
➤ II.6. Cálculo de la desviación estándar de los resultados obtenidos mediante adición estándar.....	264
APÉNDICE III. ELABORACIÓN DE LOS PRODUCTOS COSMÉTICOS SINTÉTICOS EMPLEADOS EN LOS DIFERENTES ESTUDIOS REALIZADOS	265
➤ III.1. Elaboración de una loción solar conteniendo fenildibencimidazol tetrasulfonato disódico.....	269
➤ III.2. Elaboración de una crema conteniendo PEG-25 PABA.....	269
➤ III.3. Elaboración de un gel conteniendo PEG-25 PABA.....	270
➤ III.4. Elaboración de una crema conteniendo resorcinol, hidroquinona, ácido kójico, ácido azelaico y arbutina.....	270
➤ III.5. Elaboración de una crema conteniendo ascorbil fosfato sódico, ascorbil glucósido, ácido ascórbico y ascorbil palmitato.	271
➤ III.6. Elaboración de seis cremas conteniendo kójico dipalmitato.....	272
BIBLIOGRAFÍA	275
ARTICULOS QUE COMPONEN ESTA TESIS DOCTORAL	293

JUSTIFICACIÓN GENERAL DE LA TESIS DOCTORAL

Esta Tesis Doctoral forma parte de una línea de investigación dedicada al control analítico y a la estimación de la eficacia y seguridad de los productos cosméticos, en particular de los protectores solares y de otros productos cosméticos relacionados con el proceso de bronceado y blanqueamiento de la piel.

Se han abordado dos temas:

En la Parte 1, se detallan los métodos analíticos desarrollados para la estimación de los niveles de absorción percutánea y excreción urinaria de filtros UV en productos cosméticos para la protección solar.

En la Parte 2, se detallan los métodos analíticos desarrollados para la determinación de principios activos despigmentantes en productos cosméticos para el blanqueamiento de la piel.

PARTE 1

Métodos analíticos para la estimación de los niveles de absorción percutánea y excreción urinaria de filtros solares



JUSTIFICACIÓN de la Primera Parte

En la Primera Parte de la presente Tesis Doctoral se han desarrollado métodos analíticos selectivos y sensibles, que permiten la estimación *in vitro* de los niveles de absorción percutánea de algunos filtros UV utilizados en formulaciones cosméticas para la protección solar.

Igualmente, mediante la colaboración de voluntarios, se han desarrollado métodos que permiten determinar los niveles excretados, por vía urinaria, de algunos filtros UV tras la aplicación tópica de formulaciones cosméticas conteniendo dichos filtros.

Mediante el desarrollo y empleo de estos métodos será posible avanzar en el estudio de la cinética de absorción/excreción de los filtros solares.

Este estudio es de interés desde el punto de vista de la seguridad del usuario y permitirá que en el futuro se diseñen formulaciones para la protección solar basadas en filtros UV con bajo nivel de absorción y rápida eliminación del organismo humano.

Capítulo 1

Introducción de la Parte 1

1.1. INTERÉS DEL ESTUDIO DE LOS PROCESOS DE ABSORCIÓN PERCUTÁNEA Y EXCRECIÓN DE LOS FILTROS UV

1.1.1. Necesidad del uso de productos cosméticos para la protección solar

En la actualidad el sol está muy presente en nuestra sociedad. Una gran cantidad de personas y algunos colectivos de trabajadores se ven expuestos de forma continuada a la radiación solar, en el ejercicio de su profesión o en el disfrute del tiempo libre y las vacaciones, sobre todo en el periodo estival (piscinas, playas, monte...).

Los baños de sol tomados de forma moderada son beneficiosos para la salud, siempre partiendo de cortas exposiciones a la radiación para, poco a poco, ir aumentando su duración conforme vaya apareciendo el bronceado que constituye un manto de protección natural. Además de broncear la piel, la radiación solar favorece la producción de vitamina D, que actúa en la asimilación del calcio por el organismo humano, previniendo así enfermedades como la osteoporosis y el raquitismo. Además, regula el crecimiento celular y previene la aparición de cáncer. Por otro lado, la radiación solar presenta un efecto regulador del ritmo cardíaco, previniendo enfermedades cardiovasculares e incluso mejorando el estado de ánimo (Holick, 2001; Lucas y Ponsonby, 2006; Sinclair, 2006).

Sin embargo, un abuso en el tiempo de exposición solar es perjudicial, ya que puede provocar la aparición de eritema solar, así como reacciones de fotosensibilización, e incluso puede producir lesiones del ADN, lesiones oculares, fotocarcinogénesis, inmunosupresión y envejecimiento prematuro de la piel si el abuso es prolongado y repetitivo (Lim y Cooper, 1999).

La radiación causante de tales efectos es la denominada ultravioleta (UV), que sólo representa un 5% del total de la radiación solar que llega a la superficie terrestre. El resto lo constituye la radiación visible (45%) y la radiación infrarroja (50%).

El 98% de la radiación UV que llega a la superficie terrestre se debe a la denominada radiación UVA (320-400 nm) y el 2% restante a la UVB (290-320 nm). La radiación UVC (100-290 nm) que es la más energética, afortunadamente no llega a la superficie terrestre.

En la siguiente tabla se resumen los efectos nocivos que provocan las radiaciones UVB y UVA (Pons y Parra, 1995).

Tabla 1.1. Principales efectos nocivos de la radiación UVB y UVA

UVB	UVA
Eritema solar (aparece a las 2 horas)	Eritema solar (aparece a las 24-48 horas)
Fotosensibilización	Fotoenvejecimiento
Cáncer piel (principal causante)	Cáncer piel
Lesiones oculares	Lesiones oculares
Inmunosupresión	Inmunosupresión
Hiperqueratosis (principal causante)	Hiperqueratosis

Con el fin de prevenir o minimizar la aparición de los efectos perjudiciales de la radiación solar, se han desarrollado formulaciones cosméticas denominadas productos cosméticos para la protección solar (o protectores solares), que contienen filtros UV (también denominados filtros solares).

1.1.2. Filtros UV. Clasificación y normativa actual

Las formulaciones de los productos cosméticos para la protección solar se basan en el uso de filtros UV como ingredientes activos.

Se trata de compuestos que actúan principalmente absorbiendo (filtros químicos) o reflejando (filtros físicos) parte de la radiación UV que llega a la piel, disminuyendo así la cantidad de luz que interactúa con las células de la piel.

En la siguiente tabla se muestran los filtros UV autorizados actualmente a nivel europeo. También se incluyen los niveles máximos de concentración que pueden presentar en el producto acabado según la Directiva Europea en materia de productos cosméticos (Directiva Europea 76/768/EEC), así como las siglas utilizadas en la presente Tesis Doctoral. Los filtros UV se indican siguiendo el orden en el que aparecen en la Directiva.

Tabla 1.2. Filtros UV autorizados en el marco de la Unión Europea y sus niveles máximos permitidos

Nombre químico	Nombre INCI*	Concentración máxima autorizada**	Siglas empleadas
Ácido 4-aminobenzoico	PABA (ácido p-aminobenzoico)	5 %	PABA
Metil sulfato de N,N,N-trimetil-4-(2-oxoborn-3-ilidinemetil) anilinio	Canfor benzalconio metosulfato	6%	CBM
Salicilato 3,3,5-trimetil ciclohexilo (homosalato)	Homosalato	10 %	HS
2-hidroxi-4-metoxibenzofenona (oxibenzona)	Benzofenona-3	10 %	BZ3
Ácido 2-fenilbencimidazol-5-sulfónico y sus sales de K+, Na+, TEA	Ácido fenilbencimidazol sulfónico	8 %***	PBS
Ácido 3,3'-(1,4-fenilendimetileno) bis (7,7-dimetil-2-oxobiciclo-[2.2.1]hept-1-ilmetano sulfónico) y sus sales	Ácido tereftaliden dicanfor sulfónico	10 %***	TDS
4-tert-butil-4'-metoxidibenzoilmetano	Butil metoxidibenzoilmetano	5 %	BDM
Ácido α -(2-oxoborn-3-iliden)-toluen-4-sulfónico y sus sales	Ácido benciliden canfor sulfónico	6 %***	BCS
2-ciano-3,3-difenilacrilato de 2-etilhexilo	Octocrileno	10 %***	OCR
Polimero de N-[(2 y 4)-(2-oxoborn-3-iliden)metil]bencil} acrilamida	Poliacridometil benciliden canfor	6 %	PBC
4-metoxicinamato 2-etilhexilo	Etilhexil metoxicinamato	10 %	EMC
4-aminobenzoato de etilo etoxilado	PEG-25 PABA	10 %	PEG-25 PABA
4-metoxicinamato de isoamilo (mezcla de isómeros)	Isoamil metoxicinamato	10 %	IMC
2,4,6-trianilina-(p-carbo-2'-etilhexil-1'-oxi)-1,3,5-triazina	Etilhexil triazona	5 %	ET
2-(2H-benzotriazol-2-il)-4-metil-6-[2-metil-3-(1,3,3,3-tetrametil-1-(trimetilsilil)oxi)disiloxanil]propil) fenol	Drometizol trisiloxano	15 %	DT

(continúa)

Tabla 1.2. (Continuación)

4,4'-[[[6-[[[(1,1-dimetiletil)amino] carbonil]fenil]amino]-1,3,5-triazina-2,4-diil]diimino]bis-bis(2-etilhexil) benzoate	Dietilhexil butamido triazona	10 %	DBT
3-(4'-metilbenciliden) canfor	4-metilbenciliden canfor	4 %	MBC
3-benciliden canfor	3-benciliden canfor	2 %	3BC
Salicilato de 2-etilhexilo	Etilhexil salicilato	5 %	ES
4-dimetilaminobenzoato de 2-etilhexilo	Etilhexil dimetil PABA	8 %	EDP
Ácido 2-hidroxi-4-etoxibenzofenona-5-sulfónico (<i>sulisobenzona</i>)	Benzofenona-4	5 %***	BZ4
2,2'-metilen-bis-[4-(1,1,3,3-tetrametil butil)-6-(2H-benzotrizol-2-il)fenol]	Metilen bis-benzotriazolil tetrabutifenol	10 %	MBP
Ácido 2,2'-(1,4-fenilen) bis-1H-bencimi-dazol-4,6-disulfónico (sal monosódica)	Fenil dibencimidazol tetrasulfonato disódico	10 %***	PDT
2,2'-[6-(4-metoxifenil)-1,3,5-triazina-2,4-diil]bis[5-[(2-etilhexil)oxi]fenol]	Bis-etilhexiloxifenol metoxifenil triazina	10 %	EMT
Metil 3-[4-[2,2-bis(etoxicarbonil) etenil] fenoxi]propenil dimetil polisiloxano	Polisilicona-15	10 %	P15
Dióxido de titanio	Dióxido de titanio	25 %	TiO2
Ácido benzoico, 2-[-4-(dietilamino)-2-hidroxibenzoil]-, hexilester	Dietilamino hidroxibenzoil hexil benzoato	10 %	DHHB

*Nomenclatura Internacional de Ingredientes Cosméticos.

** Concentración expresada en porcentaje en peso.

*** Expresado como ácido.

1.1.3. Ventajas e inconvenientes del uso de productos cosméticos para la protección solar

Los protectores solares deben ser eficaces frente a la radiación solar que llega a la Tierra, tanto frente a la UVB, más energética y más dañina, como frente a la UVA, menos energética pero, con un mayor poder de penetración en la piel (Griffiths et al., 1998; Krutmann, 2000). A pesar de

que la radiación UVB es la principal causante del enrojecimiento de la piel (eritema solar) y del cáncer de piel, se debe tener en cuenta la contribución de la radiación UVA, que además provoca el envejecimiento prematuro de la piel. También hay que tener en cuenta que ambos tipos de radiación afectan al sistema inmunitario tal como se indicó en la Tabla 1.1.

Sin embargo, aunque el uso de protectores solares es necesario, también puede entrañar ciertos riesgos para los usuarios (Gasparro et al., 1998; Nohynek y Schaefer, 2001; Nash, 2006; Serpone et al., 2007).

Los riesgos más comunes son la posible aparición de problemas dermatológicos como consecuencia de reacciones alérgicas (por contacto o fotoalergias) producidas por algunos filtros UV (Schauder y Ippen, 1997; Berne y Ros, 1998; Schmidt et al., 1998; Darvay et al., 2001).

Por otro lado, se ha puesto de manifiesto la actividad estrogénica de algunos filtros UV ampliamente utilizados, tales como EMC, MBC, BZ3, 3BC, MBP o EMT (Ashby et al., 2001; Mueller et al., 2003; Kunz et al., 2004; Schlumpf et al., 2004a; Schlumpf et al., 2004b; Heneweer et al., 2005; Klammer et al., 2005; Maerkel et al., 2005; Morohosi et al., 2005; Kunz y Fent, 2006a; Kunz y Fent, 2006b; Seidlová-Wuttke et al., 2006a; Seidlová-Wuttke et al., 2006b; Maerkel et al., 2007). Además, recientemente se ha observado que el PEG-25 PABA presenta una cierta actividad estrogénica (Kunz y Fent, 2006b).

Otro tipo de efecto secundario estudiado es la influencia en la generación de radicales libres. Algunos autores indican que los filtros solares OCR, EMC, BZ3 (Hanson et al., 2006) y BDM (Damiani et al., 2000) aumentan los niveles de radicales libres generados tras su aplicación. Los radicales libres desencadenan multitud de procesos oxidativos que dañan la funcionalidad de las macromoléculas del tejido conjuntivo y alteran la síntesis de las nuevas moléculas, lo que conduce a un envejecimiento prematuro de la piel. No obstante existe cierta controversia ya que otros autores indican el papel protector de los filtros UV ante la generación de dichos radicales (Herrling et al., 2006).

También se ha estudiado el efecto nocivo de los filtros BZ3, BZ4, OCR, EMC y EDP sobre los queratinocitos (Hayden et al., 2005).

Todos estos efectos secundarios adquieren una especial relevancia si se tiene en cuenta que, además, algunos filtros solares son capaces de ser absorbidos percutáneamente (Giokas et al., 2007), pasando al torrente sanguíneo, lo que podría ocasionar la aparición de efectos sistémicos (a largo plazo), especialmente si el uso de protectores solares que los contienen es continuado.

Además, algunos filtros UV parecen tener un efecto sinérgico sobre la absorción percutánea de determinados pesticidas (Pont et al., 2004; Brand et al., 2007), lo que debe tenerse en cuenta cuando los usuarios de los protectores solares son agricultores.

1.1.4. Necesidad de la estimación de los niveles de absorción percutánea de los filtros UV y de su excreción

En el contexto anteriormente descrito, la química analítica juega un papel importante pudiendo proporcionar las herramientas necesarias para la realización de los correspondientes estudios de absorción cutánea y excreción de los filtros UV.

Por ello, el objetivo de la línea de investigación en la que se enmarcan los trabajos correspondientes a la Parte 1 de la presente Tesis Doctoral es la puesta a punto de métodos analíticos que permitan realizar estudios de los niveles de absorción percutánea de los filtros UV así como estudios de su excreción urinaria.

Estos métodos analíticos deben ser suficientemente sensibles para poder detectar y cuantificar los filtros solares a niveles traza, a la vez que selectivos, para poder determinarlos con exactitud en matrices tan complejas como la orina.

La finalidad, a largo plazo, de todos estos estudios, es aportar a las empresas del sector cosmético las metodologías analíticas propuestas, con el fin de que se puedan realizar estudios detallados, cuyos resultados contribuyan a la selección de los filtros UV a emplear, que presenten una menor absorción percutánea y una excreción urinaria más rápida, así como a la de la formulación cosmética, que proporcione una menor absorción de los filtros UV elegidos, todo ello sin pérdida de eficacia protectora.

1.2. CARACTERÍSTICAS DE LA PIEL. MECANISMOS DE LA ABSORCIÓN DE COMPUESTOS A TRAVÉS DE LA PIEL

1.2.1. Características de la piel

La piel humana (Pons y Parra, 1995) está constituida por diferentes capas, tal y como se muestra en la figura 1.1.

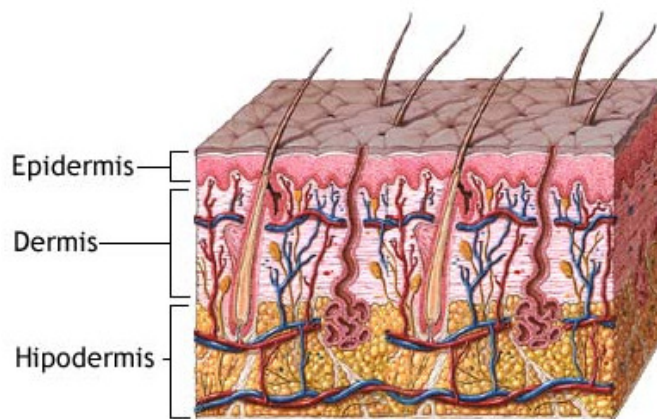


Fig. 1.1. Esquema de la piel humana

En la parte más externa se encuentra la epidermis, seguida de la dermis y de la hipodermis. La primera está separada de la dermis por la membrana basal y posee folículos pilosebáceos y glándulas sudoríparas que ayudan a regular la temperatura corporal.

La epidermis está formada por células dispuestas en capas, llamadas queratinocitos. Estas células son las responsables de las denominadas "propiedades barrera" de la piel, evitando la pérdida descontrolada de agua al exterior. Las células de las capas más externas de la epidermis presentan un porcentaje mayor de queratina que las más internas. La epidermis tiene un espesor medio de 0,1 mm. También se encuentra en la epidermis otros tipos de células como los melanocitos (causantes de la coloración de la piel), las células de Langerhans y células de Merkel (encargadas de activar el sistema inmunitario cutáneo). En la epidermis se pueden distinguir cuatro estratos diferentes desde la capa más externa a la más interna: el córneo, el granuloso, el espinoso y el basal.

El estrato córneo es, por tanto, el más externo. Consta de varias capas de células llamadas corneocitos. Se trata de células muertas aplanadas, compuestas casi exclusivamente por queratina. Están incluidas en una matriz lipídica. Su función es evitar la deshidratación e impedir la entrada de sustancias exógenas. Se trata de la principal barrera física que nos protege y aísla del exterior.

Los queratinocitos se forman en el estrato basal y se van desplazando progresivamente hacia el córneo, aumentando su capacidad de sintetizar queratina. En este tránsito las células se vuelven mucho más anchas y aplanadas, formando así el estrato espinoso y granuloso.

Los espacios intercelulares están ocupados por lípidos dispuestos en múltiples bicapas, de forma paralela a la superficie de la piel. Estas estructuras se forman durante el proceso de diferenciación en el estrato granuloso. Los lípidos que integran estas estructuras son principalmente, ceramidas, ácidos grasos, colesterol y ésteres de colesterol; gracias a sus largas cadenas lineales y saturadas forman la estructura semicristalina, muy ordenada e impermeable, del estrato córneo.

La dermis tiene un espesor medio de 1-2 mm y está constituida principalmente por una matriz amorfa rica en glucosaminoglicanos y tejidos conjuntivo y fibroso. Esta capa se encuentra muy vascularizada y de ella parten los pelos, glándulas sebáceas y sudoríparas. En la dermis se encuentra presente el colágeno, que proporciona turgencia a la piel.

La hipodermis o tejido subcutáneo es una capa de tejido conjuntivo, continuación de la dermis. En algunas regiones del cuerpo es rica en adipocitos (células encargadas de la acumulación de grasas). Está irrigada por grandes vasos, nervios y terminaciones nerviosas. Su principal función es almacenar triglicéridos y proteger a la piel de agresiones mecánicas.

1.2.2. Mecanismos de la absorción percutánea

La absorción de compuestos químicos a través de la piel es un proceso muy complejo que depende de varias etapas (Pons y Parra, 1995). La sustancia se libera por difusión desde el vehículo hasta la superficie cutánea, atraviesa la capa córnea, entra en contacto con las capas más profundas de la epidermis y finalmente, al llegar a la dermis, se incorpora a la circulación general.

La penetración en la epidermis se puede producir por vía transdérmica (a través del estrato córneo) o transapendicular (a través de las glándulas sudoríparas y de los folículos pilosos).

La penetración a través del estrato córneo puede ser mediante un paso directo que implica sucesivas entradas y salidas de las sustancias a través de las células y de los espacios intercelulares (vía intracelular); o mediante un recorrido más largo a través de la fase intercelular únicamente. Dependiendo de la naturaleza polar de la molécula el paso intercelular puede ser por difusión a través de la parte lipófila de las bicapas lipídicas o a través de la parte hidrófila.

El paso por vía intracelular tiene lugar a través de los corneocitos, lo que implica múltiples repartos entre las diferentes células densamente empaquetadas. Por ello, se atribuye a esta vía una contribución menor en el proceso de penetración global.

La penetración, ya sea a través del estrato córneo o de los órganos anexos (glándulas sudoríparas y folículos pilosos), se produce por difusión pasiva y se rige por la segunda ley de Fick, es decir su avance entre los diferentes medios que encuentra a su paso se debe únicamente a múltiples procesos de reparto.

Por tanto, en la penetración cutánea influye una serie de factores que dependen de las características del compuesto, de la naturaleza del vehículo (formulación cosmética utilizada) y de las propiedades de la piel, y que se describen a continuación.

- Factores fisicoquímicos:

La concentración de una sustancia puede tener un efecto regulador sobre la cantidad de ella que atraviesa una membrana, tal como la piel humana. La ley general de Fick para la difusión establece que la velocidad de transferencia de una sustancia desde zonas de alta concentración a las de baja es proporcional al gradiente de concentración.

La solubilidad de una sustancia influye en su liberación, ya que al aumentar la cantidad de sustancia disuelta en el vehículo se consigue un mayor gradiente de concentración.

El coeficiente de difusión expresa la velocidad de difusión de un compuesto en un medio determinado. En los procesos de absorción percutánea las moléculas difunden desde el vehículo hasta la superficie cutánea y posteriormente a través del estrato córneo. Las moléculas de bajo peso molecular difunden más rápidamente que las de peso molecular más elevado. Este efecto se produce siempre que no existan uniones a la

membrana epidérmica. Estas uniones se originan por los grupos polares de la molécula, por lo que, compuestos de elevada polaridad pueden presentar coeficientes de difusión bajos.

El coeficiente de reparto proporciona una orientación acerca del grado de afinidad del compuesto por la barrera cutánea. La ley de Fick establece una relación proporcional entre el flujo a través de la piel y el coeficiente de reparto del principio activo entre el vehículo y la piel. Sin embargo, valores elevados del coeficiente de reparto no indican siempre una mayor facilidad en su paso a través de la piel, ya que cuando el carácter lipofílico es elevado las moléculas pueden quedar retenidas en el estrato córneo.

- Factores biológicos:

La morfología de la piel, fundamentalmente la del estrato córneo, puede sufrir modificaciones en función de la edad, estados patológicos, flujo sanguíneo, hidratación y espesor del estrato córneo según las diferentes partes del cuerpo. Además, en la absorción percutánea puede influir la presencia de un mayor número de glándulas sebáceas y folículos pilosos.

En líneas generales se puede asociar un mayor flujo percutáneo a una mayor hidratación y/o un menor espesor del estrato córneo. Por otro lado, un mayor flujo sanguíneo en la dermis reduce el tiempo de permanencia de las sustancias y aumenta el gradiente de concentración, favoreciendo, así, su paso a través de la epidermis.

- Vehículo dermatológico:

La naturaleza del vehículo (formulación cosmética estudiada) influye en el proceso de absorción percutánea de las sustancias, ya sea modificando su liberación o la permeabilidad del estrato córneo, por un aumento de su hidratación o por la incorporación de promotores de la absorción, o por ambas cosas a la vez. Por tanto, el coeficiente de reparto de la sustancia entre el vehículo y la piel y la viscosidad del vehículo tienen una gran importancia. En general, cuanto mayor sea la viscosidad del vehículo menor será la liberación de la sustancia.

Los promotores de la absorción actúan modificando reversiblemente la estructura del estrato córneo, por lo que disminuyen su impermeabilidad al paso de diferentes compuestos.

Hay sustancias que pueden interaccionar con la parte polar de los lípidos extracelulares (organizados en una doble capa o bicapa), y modificar las uniones por puentes de hidrógeno o fuerzas electroestáticas que existen entre ellos. Se producen variaciones en la estructura de la bicapa y aumenta el volumen de agua entre los lípidos, lo que favorece la difusión

de compuestos polares. Además, al alterar la organización de la bicapa, se puede facilitar el transporte de sustancias apolares.

Algunos disolventes orgánicos polares, tales como propilenglicol y etanol, se disuelven en la fase acuosa incluida entre las bicapas lipídicas y alteran su composición. Por tanto, aumentan la afinidad de la membrana por las sustancias lipófilas.

Algunos promotores se pueden insertar entre las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos y alterar la estructura característica de la bicapa, permitiendo un mayor flujo de sustancias apolares. Además, se produce un cierto desorden en la parte polar de la bicapa favoreciendo también el flujo de sustancias polares.

Existen otros compuestos que modifican la impermeabilidad del estrato córneo al interactuar con los grupos polares de las fibras de queratina, alterando su estructura y favoreciendo la absorción de ciertos principios activos.

De forma general, los promotores más importantes son los alcoholes, propilenglicol, sulfóxidos, urea, pirrolidonas, azona, ácidos grasos, tensioactivos, terpenos, ciclodextrinas y liposomas.

1.3. ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DE LOS MÉTODOS PARA LA ESTIMACIÓN DE LA ABSORCIÓN PERCUTÁNEA DE FILTROS UV Y/O DE SU EXCRECIÓN

1.3.1. Métodos para el estudio de los procesos de absorción percutánea y excreción de las sustancias presentes en un vehículo o formulación dermatológica o cosmética

Para el estudio de los procesos de absorción percutánea de las sustancias presentes en un vehículo (o formulación) a través de la piel se han descrito diversas metodologías. Las más utilizadas son las basadas en la técnica denominada *tape-stripping*, las de simulación del proceso de absorción percutánea *in vitro* con el uso de celdas de flujo y las basadas en el análisis de fluidos o tejidos biológicos.

- Métodos basados en la técnica de *tape-stripping*

Consiste en la aplicación sobre la piel de una formulación de un principio activo (Couteau et al., 2001), la separación de distintas capas del estrato córneo con el uso de tiras adhesivas y la posterior cuantificación de la absorción total a partir de las cantidades recuperadas en cada una de las tiras. Las láminas adhesivas se aplican sobre la zona tratada de la piel después de un tiempo prefijado y tras eliminar la formulación no absorbida con ayuda de un algodón o papel. A continuación se retiran después de un periodo de tiempo establecido (ver figura 1.2.).



Fig.1.2. Imagen de la aplicación de la técnica *tape-stripping*

- Métodos de simulación del proceso de absorción percutánea *in vitro* basados en el uso de celdas de flujo

Se basan en la colocación de una membrana (piel natural o artificial) entre dos compartimentos (Wang et al., 2006), uno dador donde se introduce el vehículo con el producto a estudiar y otro receptor en el que se introduce una disolución, a la que van pasando las moléculas que consiguen atravesar la membrana cutánea (el líquido receptor debe estar en agitación continua con el fin de garantizar su homogeneidad). El líquido receptor debe mantener en disolución al producto en estudio y debe ser semejante, en la medida de lo posible a la sangre. Por tanto, para sustancias hidrófilas se recomienda el uso de disoluciones de tampón fosfato de pH=7,4 y cloruro sódico con el fin de simular las condiciones de pH y fuerza iónica de la sangre. Para sustancias menos hidrófilas se puede emplear propilenglicol o suero de albúmina bovino.

La membrana debe situarse, por tanto, entre los dos compartimentos anteriores, la cara superior en contacto con el vehículo que contiene la sustancia a ensayar y la cara inferior en contacto con el líquido receptor. Con la utilización de estas celdas de difusión se pretende reproducir, en la medida de lo posible, las condiciones reales de la piel.

Aunque no existen métodos oficiales para la realización de estos estudios en productos cosméticos, recientemente, el Comité Científico para Productos de Consumo (2006) (SCCP, del inglés *Scientific Committee on Consumer Products de la European Comisión*) ha propuesto algunas directrices de interés para su correcta realización.

A continuación se muestra un esquema de una celda de difusión utilizada en los estudios realizados en la presente Tesis Doctoral.

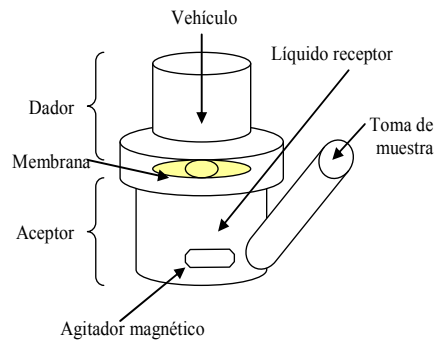


Fig. 1.3. Celda de difusión

El paso del compuesto, presente en el vehículo estudiado, a través de la membrana se puede representar mediante la siguiente expresión (Copoví et al., 2006), válida para procesos de difusión pasiva (2ª ley de Fick):

$$Q_{(t)} = AKLC \left[D \frac{t}{L^2} - \frac{1}{6} - \frac{2}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n^2} \exp\left(-\frac{Dn^2\pi^2 t}{L^2}\right) \right] \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde $Q_{(t)}$ es la cantidad de compuesto que pasa a través de la membrana y alcanza el líquido receptor a un tiempo t , A es el área de la superficie de la membrana disponible para la difusión, K es el coeficiente de partición del compuesto entre la membrana y el vehículo del dador, L es la longitud del recorrido a través del cual difunde la molécula, C es la concentración del producto en el vehículo del dador y D es el coeficiente de difusión del producto en la membrana.

Cuando el coeficiente de difusión y la concentración de principio activo permanecen constantes a lo largo del tiempo (lo que se consigue para cantidades elevadas de principio activo en el compartimiento dador), se alcanza el estado estacionario, donde la ecuación anterior se puede expresar como:

$$\frac{Q}{A} = KLC \left(\frac{Dt}{L^2} - \frac{1}{6} \right) \quad (\text{Ecuación 2})$$

El flujo, J , es la cantidad de sustancia que, por unidad de superficie, atraviesa la membrana frente al tiempo, una vez alcanzado el estado estacionario.

El flujo se relaciona con el coeficiente de permeabilidad, K_p , mediante la concentración inicial del compuesto en estudio.

$$J = \frac{CKD}{L} = CK_p \quad (\text{Ecuación 3})$$

El tiempo de latencia (tiempo necesario para alcanzar el estado estacionario) viene definido por $t_l = L^2/6D$.

Cuando la concentración del compuesto en la superficie de la membrana no es constante sino que depende de la velocidad de difusión en el vehículo, la cinética resultante es una mezcla de los procesos de liberación y de penetración.

Para realizar algunos estudios de absorción percutánea es recomendable mantener el estado estacionario para poder estimar mejor el flujo. Esto se consigue mediante la técnica de la dosis infinita, que consiste en aplicar una cantidad de producto suficientemente grande en el compartimiento dador para mantener la concentración del mismo pseudoconstante durante todo el experimento. De esta forma el flujo aumenta hasta alcanzar un valor máximo, a partir del cual permanece constante (estado estacionario).

Si se pretende obtener el porcentaje de producto que ha penetrado es recomendable aplicar la dosis que habitualmente se utiliza. Por tanto, muchas veces se utilizan dosis finitas, por lo que la concentración inicial del compuesto en estudio disminuye durante el ensayo. Después de un período inicial, el flujo aumenta con el tiempo hasta que alcanza un valor máximo que se mantiene durante un tiempo, dependiendo de la cantidad de compuesto presente en el compartimiento dador, para disminuir finalmente a medida que éste se va agotando. Se observa que la cantidad acumulada en el compartimiento receptor aumenta linealmente con el

tiempo hasta alcanzar un máximo, para posteriormente permanecer constante.

- Métodos basados en el análisis de fluidos o tejidos biológicos

Los métodos *in vivo* habitualmente empleados utilizan tejidos biológicos para la estimación de la absorción percutánea y se basan en la aplicación tópica de la formulación conteniendo la sustancia a estudiar a animales de experimentación y posterior análisis de los tejidos. Los métodos *in vivo* para la estimación de la absorción percutánea mediante la determinación de los compuestos en fluidos biológicos se basan en la aplicación de la formulación sobre la piel de animales o de voluntarios humanos y posterior análisis de los fluidos.

1.3.2. Antecedentes de estudios de absorción percutánea y excreción de filtros UV

El descubrimiento de que el cuerpo humano es capaz de absorber a través de la piel algunos filtros UV contenidos en productos cosméticos ha impulsado el estudio de los procesos de absorción y de excreción (Walters y Roberts, 2002). En un reciente artículo de revisión realizado por nuestro grupo (Giokas et al., 2007) se recopilan los trabajos realizados por los diversos investigadores sobre este tema.

En una búsqueda bibliográfica empleando las bases de datos Analytical Abstracts, Web of Knowledge y ScienceFinder Scholar, desde el año 1976 hasta abril de 2008, se han encontrado 47 publicaciones referentes al estudio de la absorción y/o excreción de los filtros UV. En la siguiente tabla se indican estas publicaciones con los filtros UV estudiados y los métodos empleados para ello.

Tabla 1.3. Artículos publicados sobre estudios de absorción/excreción de los filtros UV (1976-2007)

Referencias	Filtros UV	Método empleado	Comentario
Arancibia et al., 1981	PABA	Análisis de fluidos biológicos	Orina de voluntarios humanos, aplicación tópica
Okereke et al., 1994	BZ3	Análisis de fluidos biológicos	Tejidos de rata tras aplicación tópica
Hagedorn-Leweke y Lippold, 1995	BZ3, MBC, IMC, IDM	Celdas de difusión	Estudio comparativo entre los diferentes filtros UV, piel humana
Hany y Nagel, 1995	BZ3	Análisis de fluidos biológicos	Voluntarios humanos, aplicación tópica, análisis de plasma
Jiang et al., 1996	BZ3, EMC, ES, BDM, EDP	Celdas de difusión	Estudio comparativo entre los diferentes filtros UV, piel humana
Marginean-Lazar et al., 1996	EMC	<i>Tape-stripping</i>	Absorción percutánea del filtro UV en humanos
Treffel y Gabard, 1996	EMC, BZ3, ES	<i>Tape-stripping</i> , celdas de difusión	Influencia del vehículo, uso de piel humana
Hayden et al., 1997	BZ3	Análisis de fluidos biológicos	Análisis de plasma, voluntarios humanos, aplicación tópica
Marginean-Lazar et al., 1997	EMC, BZ3, BDM, MBC	<i>Tape-stripping</i>	Influencia radiación UV, influencia del vehículo
Felix et al., 1998	BZ3	Análisis de fluidos biológicos	Análisis de orina, voluntarios humanos, aplicación tópica
Aghazarian et al., 1999	3BC	Celdas de difusión	Influencia del vehículo, uso de piel de rata y membrana sintética
Gupta et al., 1999	BZ3, EMC	Celdas de difusión	Uso de piel de cerdo
Jiang et al., 1999	BZ3	Celdas de difusión	Uso de piel humana y voluntarios humanos, aplicación tópica, análisis plasma
Pottard et al., 1999	EMC, BZ3, BZ4, ET, OCR	<i>Tape-stripping</i> , celdas de difusión	Distribución de los filtros UV en las diferentes capas de la epidermis
Pottard et al., 2000	EMC, BZ3, BZ4, ET, OCR	<i>Tape-stripping</i> , celdas de difusión	Distribución de los filtros UV en las diferentes capas de la epidermis, uso de epidermis humana

(continúa)

Tabla. 1.3. (continuación)

Fernández et al., 2000a	BZ3	<i>Tape-stripping</i> , celdas de difusión	Distribución de los filtros UV en las capas de la piel, influencia del vehículo, epidermis de cerdo
Fernández et al., 2000b	BZ3	Celdas de difusión	Influencia de la formulación, epidermis humana
Cambon et al., 2001	EMC	<i>Tape-stripping</i>	Influencia radiación UV, voluntarios humanos
Couteau et al., 2001	BZ4, PEG-25 PABA	<i>Tape-stripping</i>	Estudio comparativo entre los dos filtros hidrosolubles, voluntarios humanos
Laugel et al., 2001	EMC	<i>Tape-stripping</i>	Espectroscopía IR, penetración percutánea, voluntarios humanos
Fernández et al., 2002	BZ3	<i>Tape-stripping</i>	Penetración del filtro UV <i>in vivo</i> , voluntarios humanos
Gustavsson-Gonzalez et al., 2002	BZ3	Análisis de fluidos biológicos	Análisis de orina, voluntarios humanos, aplicación tópica
Walters y Roberts, 2002	ES	Celdas de difusión	Influencia del vehículo, uso de epidermis humana
Wissing y Muller, 2002	BZ3	Celdas de difusión	Liberación <i>in vitro</i> del filtro UV introducido en nanopartículas, uso de epidermis humana
Benech-Kieffer et al., 2003	TDS	Celdas de difusión, análisis orina	Voluntarios humanos, aplicación tópica
Chatelaine et al., 2003	EMC, BZ3, ES, BDM, HS	<i>Tape-stripping</i> , celdas de difusión	Influencia de la extensión lateral del producto, influencia del vehículo, uso de piel humana
*Vidal et al., 2003	PBS	Análisis de fluidos biológicos	Análisis de orina, voluntarios humanos, aplicación tópica
Gu et al., 2004	BZ3	Celdas de difusión	Efectos sinérgicos entre los filtros UV, uso de piel de cerdo
Jacobi et al., 2004	BDM, MBC	<i>Tape-stripping</i>	Estudio comparativo entre los dos filtros UV
Janjua et al., 2004	BZ3, OMC, 4MBC	Análisis de fluidos biológicos	Análisis de orina, voluntarios humanos, aplicación tópica
Jiménez et al., 2004	EMC	<i>Tape-stripping</i> , celdas de difusión	Influencia del vehículo, uso de piel de cerdo

(continúa)

Tabla. 1.3. (continuación)

Montenegro et al., 2004	EMC, BDM	Celdas de difusión	Influencia del vehículo, uso de epidermis humana
Sarveiya et al., 2004	EMC, BZ3, ES, HS	<i>Tape-stripping</i> , Análisis de fluidos biológicos	Aplicación tópica, voluntarios humanos, análisis de orina
Gu et al., 2005	BZ3	Celdas de difusión	Uso de piel de cerdo y membrana sintética
Kasichayanula et al., 2005	BZ3	Análisis de fluidos biológicos	Análisis de orina de cerdo tras aplicación tópica
Olvera-Martinez et al., 2005	EMC	<i>Tape-stripping</i>	Influencia del vehículo, voluntarios humanos
**Balaguer et al., 2006a	PDT	Análisis de fluidos biológicos	Análisis de orina, voluntarios humanos, aplicación tópica
**Balaguer et al., 2006b	PDT	Celdas difusión	Epidermis humana
Gustavsson-Gonzalez et al., 2006	BZ3	Análisis de fluidos biológicos	Análisis de orina, voluntarios humanos, aplicación tópica
Schauer et al., 2006	4MBC	Análisis de fluidos biológicos	Análisis orina, voluntarios humanos, aplicación tópica
Soeborg et al., 2006	3BC	Análisis de fluidos biológicos	Tejidos de rata tras aplicación tópica
Wang et al., 2006	BZ3	Celdas de difusión	Efectos sinérgicos entre los filtros UV, uso de epidermis humana
*Vidal et al., 2007	BZ3	Análisis de fluidos biológicos	Análisis de orina, voluntarios humanos, aplicación tópica
Wang et al., 2007	PABA	Análisis de fluidos biológicos	Análisis de orina, voluntarios humanos, aplicación tópica
**Balaguer et al., 2008a	PEG-25 PABA	Análisis de fluidos biológicos	Análisis de orina, voluntarios humanos, aplicación tópica
**Balaguer et al., 2008b	PEG-25 PABA	Celdas de difusión	Epidermis humana
*León et al., 2008	BZ4, PBS, TDS, PDT	Celdas de difusión	Epidermis humana

* Artículos publicados por el grupo de investigación en el que se ha desarrollado esta Tesis Doctoral

** Artículos que forman parte de esta Tesis Doctoral

Generalmente, en la metodología de *tape-stripping* los ensayos se realizan utilizando animales de experimentación o voluntarios humanos, a los que se aplica el vehículo conteniendo el filtro UV en estudio. Los filtros UV habitualmente más estudiados mediante la técnica *tape-stripping* son EMC (Treffel y Gabard, 1996; Marginean-Lazar et al., 1996; Marginean-Lazar et

al., 1997; Pottard et al., 1999; Pottard et al., 2000; Cambon et al., 2001; Laugel et al., 2001; Chatelaine et al., 2003; Sarveiya et al., 2004; Jiménez et al., 2004; Olvera-Martinez et al., 2005) y BZ3 (Treffel y Gabard, 1996; Marginean-Lazar et al., 1997; Pottard et al., 1999; Pottard et al., 2000; Fernández et al., 2000a; Fernández et al. 2002; Chatelaine et al., 2003; Sarveiya et al., 2004), seguidos de ES (Treffel y Gabard, 1996; Chatelaine et al., 2003; Sarveiya et al., 2004), BDM (Marginean-Lazar et al., 1997; Chatelaine et al., 2003; Jacobi et al., 2004), BZ4 (Pottard et al., 1999; Pottard et al., 2000; Couteau et al. 2001), MBC (Marginean-Lazar et al., 1997; Jacobi et al., 2004), ET (Pottard et al., 1999; Pottard et al., 2000), OCR (Pottard et al., 1999; Pottard et al., 2000), HS (Chatelaine et al., 2003; Sarveiya et al., 2004) y PEG-25 PABA (Couteau et al. 2001).

Además del estudio de absorción percutánea, se ha estudiado la distribución de los filtros UV en las diferentes capas de la piel (Pottard et al., 1999; Pottard et al., 2000; Fernández et al., 2000a), la influencia de la irradiación previa con luz UV (Marginean-Lazar et al., 1997; Cambon et al., 2001), la influencia de la extensión lateral del producto como proceso competitivo de la penetración (Chatelaine et al., 2003), el diferente comportamiento de la absorción percutánea según el vehículo empleado (Treffel y Gabard, 1996; Marginean-Lazar et al., 1997; Fernández et al., 2000a; Chatelaine et al., 2003) y la disminución de la absorción al aplicar el filtro UV encapsulado, utilizando un polímero, en la correspondiente formulación (Jiménez et al., 2004; Olvera-Martinez et al., 2005). En la mayoría de los trabajos, la absorción percutánea observada mediante esta técnica oscila entre un 0,1% y un 4% de la cantidad total aplicada.

Los filtros UV más estudiados mediante celdas de difusión son BZ3 (Hagedorn-Leweke y Lippold, 1995; Jiang et al., 1996; Treffel y Gabard, 1996; Gupta et al., 1999; Jiang et al., 1999; Pottard et al., 1999; Pottard et al., 2000; Fernández et al., 2000a; Fernández et al., 2000b; Chatelaine et al., 2003; Gu et al., 2004; Gu et al., 2005; Wang et al., 2006) y EMC (Jiang et al., 1996; Treffel y Gabard, 1996; Gupta et al., 1999; Pottard et al., 1999; Pottard et al., 2000; Chatelaine et al., 2003; Jiménez et al., 2004; Montenegro et al., 2004), seguidos de ES (Jiang et al., 1996; Treffel y Gabard, 1996; Walters y Roberts, 2002; Chatelaine et al., 2003), BDM (Jiang et al., 1996; Chatelaine et al., 2003; Montenegro et al., 2004), OCR (Pottard et al., 1999; Pottard et al., 2000), ET (Pottard et al., 1999; Pottard et al., 2000), EDP (Hagedorn-Leweke y Lippold, 1995; Jiang et al., 1996), BZ4 (Pottard et al., 1999; Pottard et al., 2000), MBC (Hagedorn-Leweke y Lippold, 1995), IMC (Hagedorn-Leweke y Lippold, 1995), IDM (Hagedorn-Leweke y Lippold, 1995), HS (Chatelaine et al., 2003), 3BC (Aghazarian et al., 1999), PDT (Balaguer et al., 2006b, León et al., 2008) PEG-25 PABA

(Balaguer et al., 2008b), PBS (León et al., 2008), BZ4 (León et al., 2008) y TDS (León et al., 2008). También se ha estudiado mediante esta técnica el efecto de diferentes vehículos en la absorción percutánea (Aghazarian et al., 1999; Fernández et al., 2000a; Walters y Roberts, 2002; Montenegro et al., 2004) y los efectos sinérgicos entre los diferentes filtros en estudio (Gu et al., 2004; Wang et al., 2006). Empleando celdas de difusión se encuentran porcentajes de absorción percutánea a las 24 horas que oscilan entre 0,6% y 10% de la cantidad aplicada inicialmente sobre la membrana en el compartimento dador.

Los métodos *in vivo* basados en el análisis de tejidos biológicos son bastante escasos. Sólo se han analizado tejidos de rata tras una administración tópica de BZ3 (Okereke et al. 1994) y 3BC (Soeborg et al., 2006).

Los métodos *in vivo* basados en el análisis de orina son más habituales. Se han estudiado los siguientes filtros UV: BZ3 (Felix et al., 1998; Gustavsson-Gonzalez et al., 2002; Janjua et al., 2004; Sarveiya et al., 2004; Kasichayanula et al., 2005; Gustavsson Gonzalez et al., 2006; Vidal et al., 2007) MBC (Janjua et al., 2004; Schauer et al., 2006; Völkel et al., 2006), PABA (Arancibia et. al., 1981 y Wang et al., 2007), TDS (Benech-Kieffer et al., 2003), EMC (Janjua et al., 2004), PBS (Vidal et al., 2003), PDT (Balaguer et al., 2006a) y PEG-25 PABA (Balaguer et al., 2008a). En el análisis de orina se encuentran porcentajes de excreción que oscilan entre 0,014 % y el 3,7 %, generalmente obtenidos tras la aplicación tópica del producto en voluntarios humanos.

Como se observa en la Tabla 1.3, y a la vista del total de filtros UV autorizados (Tabla 1.2), los estudios realizados son todavía incipientes ya que se han estudiado pocos filtros UV. Cabe indicar que en la mayor parte de estos trabajos los métodos utilizados no se han validado suficientemente por lo que los resultados no son totalmente fiables.

Por otro lado, es necesario indicar que la legislación Europea actual no permite el uso de ensayos *in vivo* empleando animales de experimentación para la evaluación de la eficacia o la seguridad de productos cosméticos para los que ya se disponga de otros métodos alternativos. Además, está prevista la prohibición total de la experimentación animal en este campo para el año 2009 (Directiva 76/768/EEC 7ª enmienda; Directiva 2003/15/EC).

Por todo ello, es necesario avanzar en el desarrollo de nuevos métodos analíticos que permitan realizar estudios rigurosos sobre los procesos de absorción–excreción de los filtros solares, sin necesidad del uso de animales.

Capítulo 2

**Desarrollo de un método analítico
para la determinación de fenil dibencimidazol
tetrasulfonato disódico en orina humana mediante
extracción en fase sólida en línea con detección
fluorimétrica empleando un sistema de análisis por
inyección secuencial. Estudio de la excreción urinaria
de voluntarios después de la aplicación tópica**

El contenido de este capítulo ha sido publicado en Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis (2006) 40:922-927.

2.1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO DEL TRABAJO

El fenil dibencimidazol tetrasulfonato disódico (PDT) es un compuesto recientemente autorizado para su uso como filtro UV en los productos cosméticos para la protección solar en concentraciones inferiores al 10%. Como se observa en la siguiente figura, su banda de absorción en el UV abarca por completo el intervalo UVB (290-320 nm) y presenta muy buena absorción en la zona UVA (320-400 nm).

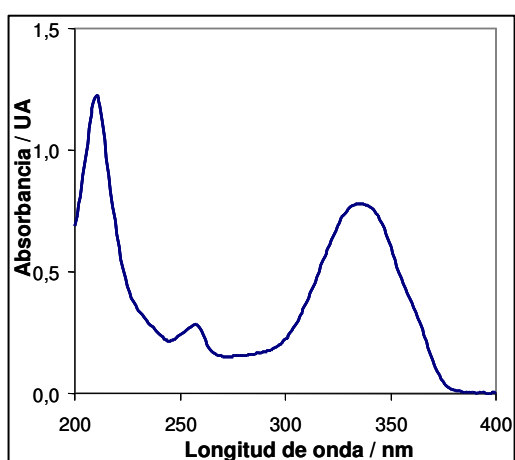


Fig. 2.1. Espectro UV del PDT en EtOH

No se han encontrado en la bibliografía analítica artículos en los que se estudien los procesos de absorción percutánea de PDT o las cantidades excretadas en orina humana después del uso de productos solares que lo contengan.

El objetivo del presente trabajo es obtener datos analíticos sobre los niveles de excreción urinaria del PDT mediante el análisis de orina de voluntarios humanos después del uso de una loción solar conteniendo este filtro UV.

Este objetivo se enmarca en la justificación general de la Tesis Doctoral descrita al inicio de la presente Memoria.

Se han propuesto diferentes métodos analíticos, especialmente basados en la cromatografía líquida, para la determinación de algunos filtros UV (sin incluir el PDT) en los productos cosméticos para la protección solar (Gagliardi et al., 1989; DiNunzio y Gadde, 1990; Ikeda et al., 1990; Wallner,

1993; Ro et al., 1994; Yao et al., 1998; Scalia, 2000; Chisvert et al., 2001a; Chisvert, et al., 2001; Chisvert y Salvador, 2002; Salvador y Chisvert, 2005a). Además, en nuestro grupo de investigación se ha desarrollado recientemente un método de cromatografía líquida con detección espectrofotométrica UV/vis para la determinación de 18 filtros UV (incluyendo el PDT) (Salvador y Chisvert, 2005b), pero su sensibilidad es insuficiente para la determinación de los niveles traza de PDT presentes en la orina de los voluntarios después del uso de los productos cosméticos solares.

La estructura química del PDT le confiere fluorescencia nativa (ver figura 2.2), que puede aprovecharse para conseguir una alta sensibilidad en su determinación.

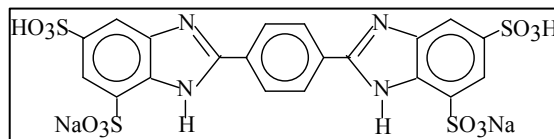


Fig. 2.2. Estructura química del PDT

Por otro lado, la extracción en fase sólida (EFS), usando una microcolumna de intercambio aniónico fuerte (SAX), permite la retención y posterior elución selectiva de PDT, evitando las interferencias del resto de componentes de la matriz de la orina. Esta etapa de EFS se realiza en línea mediante un sistema de inyección secuencial (SIA) para conseguir un mayor grado de automatización.

2.2. PARTE EXPERIMENTAL

2.2.1. Metodología experimental

Las etapas seguidas en este trabajo fueron las siguientes: en primer lugar se estudiaron las variables instrumentales, las interferencias de la orina, así como las condiciones de extracción, lavado y elución en la etapa de EFS. Posteriormente se hizo un estudio del orden de inserción de la muestra y los reactivos en el sistema SIA, del diseño apropiado del calibrado de adición estándar requerido en este método y de la estabilidad de las muestras de orina con el pH y el tiempo. Por último, se validó el

método aplicándolo a orina de voluntarios que se aplicaron un protector solar conteniendo PDT y se estudió la curva de excreción urinaria.

2.2.2. Aparatos y material

Se empleó un espectrofluorímetro Jasco modelo FP-6200 (provisto de lámpara de Xe) (Tokio, Japón). Se trabajó a potencia media y las rendijas de emisión y de excitación se fijaron en 10 nm. La detección se realizó a $\lambda_{em}=454$ nm ($\lambda_{exc}=330$ nm).

El sistema SIA utilizado constaba de una válvula automática de 8 vías Crison 2030 y una bureta automática Crison 2031 con jeringa de 5 ml. Se utilizaron tubos de teflón de 0,5 mm de diámetro interno.

Como celda de medida se empleó una cubeta de flujo Hellma® para fluorescencia de 1,5 mm de paso óptico y 25 μ l de volumen interno.

Se empleó una microcolumna de intercambio aniónico preparada a partir de relleno SAX Varian® (Barcelona) en un tubo de teflón de 20 mm x 3 mm de diámetro interno. También se utilizó para la construcción de la microcolumna el relleno SAX LiChrolut® de Merck (Darmstadt, Alemania).

Las medidas de pH se realizaron con un pHmetro Crison modelo micropH 2001.

2.2.3. Reactivos

Se emplearon los siguientes reactivos: fenildibencimidazol tetrasulfonato disódico (PDT) R>98% (Haaimann & Reimer, Parets del Vallés), ácido clorhídrico 37% d=1,19 g ml⁻¹ grado análisis, etanol absoluto (EtOH) grado HPLC (Scharlab, Barcelona). También se utilizó hidróxido amónico 25% d=0,910 g ml⁻¹, hidróxido sódico grado análisis (Probus S.A., Badalona) y dihidrogenofosfato sódico monohidrato grado análisis (Merck, Darmstadt, Alemania).

Se preparó una loción solar en el laboratorio, siguiendo un protocolo de fabricación facilitado por la empresa RNB-Cosméticos (ver Apéndice III.1). Para su elaboración se emplearon ingredientes de grado cosmético suministrados por la empresa Guinama. La loción contenía un 5% en PDT (cabe indicar que el máximo legal permitido es del 10%).

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1. Elección de las variables instrumentales

Se obtuvieron los espectros de emisión y excitación de una disolución de $0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$ de PDT en medio HCl $0,1 \text{ M}$ (figura 2.3). Las longitudes de onda de excitación y emisión que permitieron una mayor sensibilidad fueron 330 nm y 454 nm , respectivamente.

Se ajustaron el resto de parámetros instrumentales utilizando una sensibilidad media y unas rendijas de excitación y de emisión de 10 nm , por presentar una relación señal-ruido más favorable. El tiempo de respuesta fue de $0,02 \text{ s}$ y se tomaron datos cada $0,5 \text{ s}$.

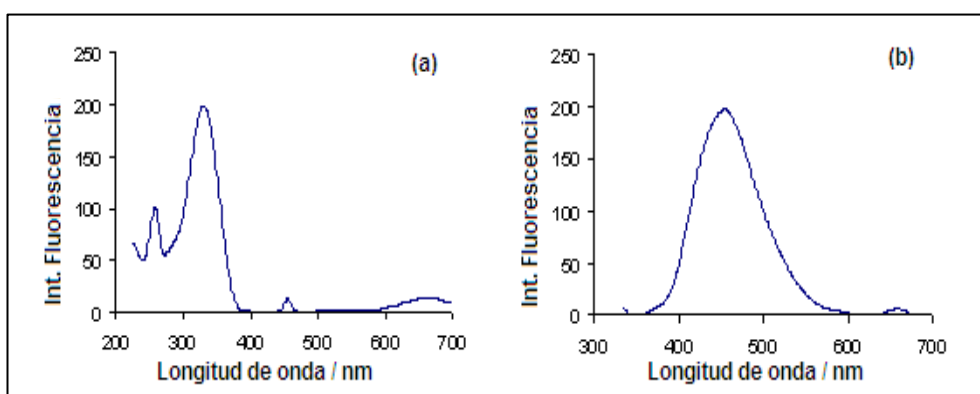


Fig. 2.3. Espectros de (a) excitación ($\lambda_{em}=454 \text{ nm}$) y (b) de emisión ($\lambda_{exc}=330 \text{ nm}$) de una disolución de $0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$ de PDT en medio HCl $0,1 \text{ M}$, intensidad media, rendijas 10 nm

2.3.2. Extracción en fase sólida empleando una fase de intercambio aniónico fuerte. Elección de la disolución de elución

Se realizaron estudios preliminares que indicaron que la determinación directa de PDT en orina no podía llevarse a cabo mediante fluorimetría directa debido a las interferencias. Por tanto, se propuso la realización de una etapa de EFS utilizando una fase de intercambio aniónico fuerte (SAX), de Merck.

El PDT en la orina se encuentra en forma aniónica por la desprotonación de sus grupos sulfónicos. Por tanto, el analito queda retenido selectivamente al pasar por el cartucho SAX, mientras que gran parte de las interferencias se eliminan. Posteriormente a la etapa de retención, se aplicó una etapa de elución con HCl para protonar al analito y permitir su elución. Esta etapa se realizó en línea, acoplada a un sistema de análisis por inyección secuencial (SIA).

En todos los casos, la microcolumna de EFS se acondicionó previamente a cada sesión de trabajo con 0,250 ml de etanol y 1 ml de agua, sucesivamente.

Para optimizar la concentración del HCl de elución se inyectaron 500 μl de una disolución acuosa de 0,2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de PDT en el sistema SIA mostrado en la figura 2.4; se realizó la elución con 1 ml de HCl de diferentes concentraciones y se realizó un lavado con 1 ml de HCl 3 M para asegurar la total elución entre experimentos sucesivos. Los resultados se resumen en la figura 2.5.

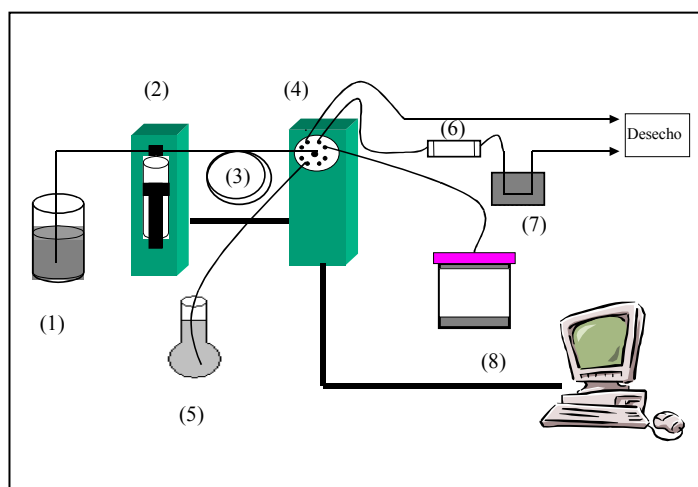


Fig. 2.4. Sistema SIA empleado en el estudio de la concentración de HCl en la elución. (1) Portador (agua), (2) bureta automática provista de jeringa de 5 ml, (3) tubo de almacenamiento (2 m), (4) válvula automática de 8 vías, (5) disolución de PDT patrón, (6) microcolumna con relleno SAX, (7) celda de detección en flujo, acoplada al espectrofluorímetro, (8) disolución acuosa de HCl para la elución

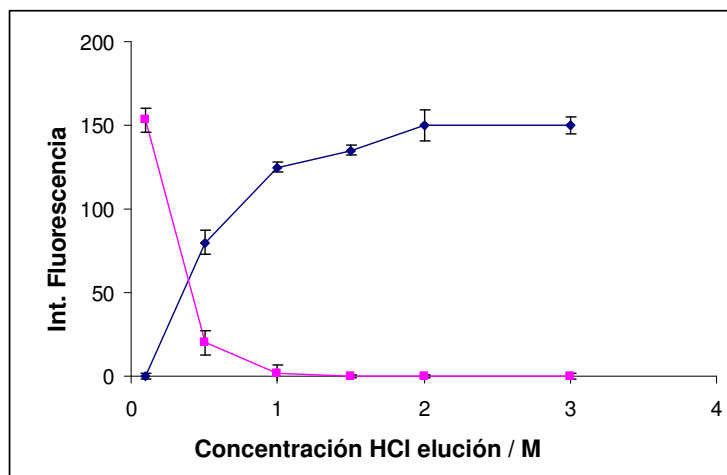


Fig.2.5. Resultados del estudio de la concentración del HCl de elución. Elución (◆), lavado posterior con HCl 3 M (■)

Como se puede apreciar, empleando HCl 1 M se eluía la totalidad del analito, ya que al lavar con HCl 3 M no se obtuvo señal; al eluir con HCl de mayor concentración se obtenían picos más intensos y estrechos, pero se reducía drásticamente la vida útil del relleno; por lo que se prefirió emplear HCl 1 M.

2.3.3. Detección de posible errores debidos a la matriz de la orina

Con el fin de estudiar si la matriz de la orina provocaba errores constantes y/o proporcionales en la determinación del analito debidos a componentes que pudiesen quedar retenidos en la microcolumna y posteriormente eluidos junto al analito, se propuso la realización de un calibrado de PDT en disolución acuosa y otro en orina, empleando para ello una orina filtrada y exenta de PDT.

Los diferentes patrones de ambos calibrados contenían entre 0 y 0,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de PDT.

Los patrones fueron inyectados en el sistema SIA descrito en la figura 2.3 siguiendo la siguiente secuencia:

1. Aspiración de 3500 μl de portador (agua).
2. Aspiración de 500 μl de patrón.
3. Propulsión de 4000 μl a través de la microcolumna.
4. Aspiración de 3000 μl de portador (agua).
5. Aspiración de 1000 μl de HCl 1 M.
6. Propulsión de 4000 μl a través de la microcolumna (elución).

La secuencia se realizó por triplicado para cada patrón.

Utilizando el calibrado de PDT en orina se obtuvo una buena linealidad ($R^2=0,9992$), pero el calibrado acuoso presentaba un coeficiente de regresión bajo y unos picos poco reproducibles.

Se repitió varias veces con similares resultados. Por ello, se prepararon los patrones acuosos en tampón fosfato 0,5 M de pH=7 que era el de la orina estudiada.

Los registros obtenidos se muestran en la figura 2.6.

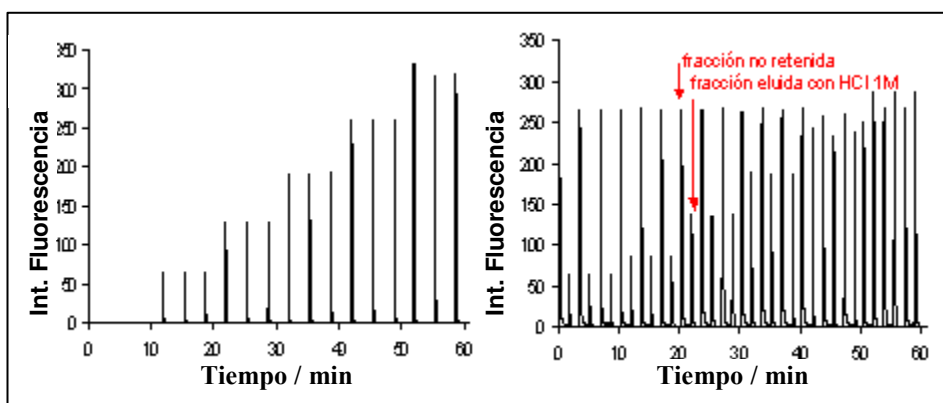


Fig. 2.6. Registros obtenidos para los calibrados de PDT en tampón fosfato 0,5 M pH=7 (a) y en orina (b)

Como se aprecia en la figura 2.6.(b), correspondiente a la orina, aparece una señal debida a la fracción no retenida en la microcolumna, que interferiría si se realizase la determinación directa del PDT, por lo que es necesaria la separación previa mediante EFS.

En la figura 2.7 se representan las rectas de regresión obtenidas.

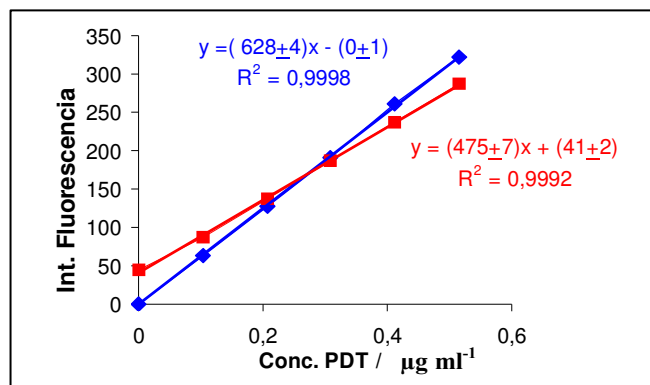


Fig. 2.7. Rectas de regresión obtenidas para el PDT en disolución tampón fosfato 0,5 M pH=7 (\blacklozenge) y en orina (\blacksquare). Las pendientes y las ordenadas en el origen incorporan su desviación estándar en las respectivas rectas de regresión

Como se puede apreciar, el calibrado de PDT en orina introduce dos tipos de error: uno proporcional y otro constante.

El error proporcional (efecto matriz) se manifiesta al presentar la pendiente del calibrado en orina un valor estadísticamente diferente a la del calibrado acuoso, libre de interferentes.

El error constante se aprecia en que la ordenada en el origen del calibrado de PDT en orina es estadísticamente distinta de cero, ya que el valor de $(t_{\text{cal}})_a$ fue de 20,50 (ver Apéndice II.5), mayor al valor crítico del parámetro t de Student para un nivel de confianza del 95% y 6 puntos experimentales que es de 2,78.

Para estudiar las diferencias de comportamiento del PDT cuando se encuentra en disoluciones patrón en tampón fosfato y cuando está presente en orina, se realizaron estudios de la influencia del pH y de la concentración de NaCl sobre la intensidad de la señal del PDT.

Se realizaron medidas por triplicado de una disolución patrón con $0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$ de PDT a diferentes pHs, obteniéndose valores comparables. Los resultados se muestran en la siguiente figura.

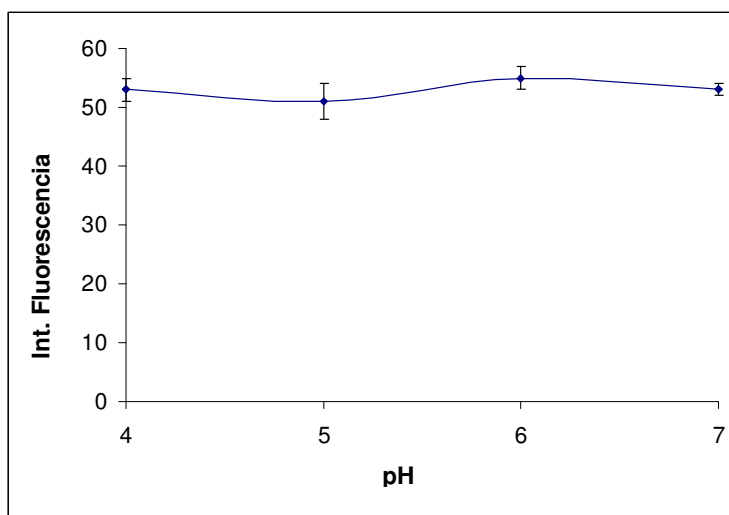


Fig.2.8. Estudio del efecto del pH de una disolución patrón de $0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$ PDT (tampón fosfato $0,5 \text{ M}$) en la señal analítica. Medidas realizadas por triplicado

Por tanto, el diferente comportamiento del PDT en orina y en patrones no se debe a diferencias en el valor del pH.

Puesto que el pH no afectaba a las medidas, se eligió $\text{pH}=6$ por ser un valor intermedio en relación a los diferentes pHs que pueden presentar las distintas orinas de cada individuo.

También se ensayó la adición de NaCl a diferentes concentraciones (1–10%) con la finalidad de evaluar la influencia de la fuerza iónica. En este caso se observó una disminución de la señal analítica en la fracción de la etapa de elución. Esto puede deberse a que los cloruros compiten con el PDT por los puntos activos del relleno en la etapa de retención, de modo que se favorece que parte de las moléculas de PDT no puedan anclarse al relleno en la etapa de carga y sean eliminadas del sistema.

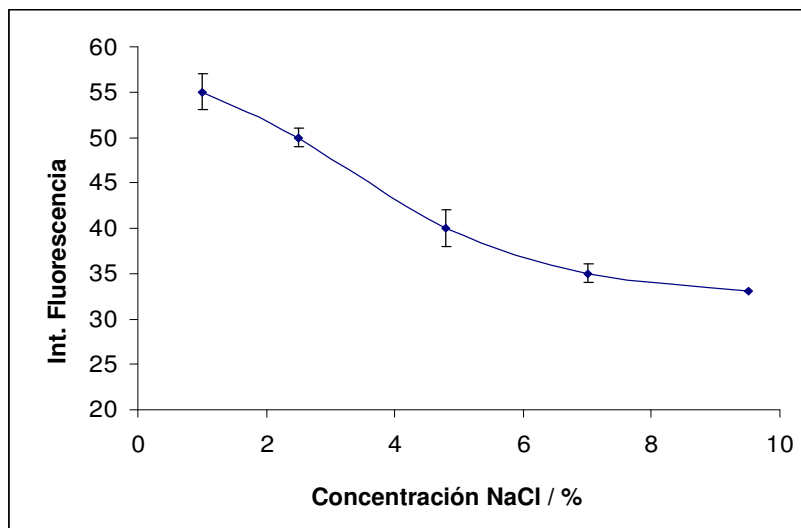


Fig.2.9. Estudio del efecto de la concentración de NaCl sobre la señal analítica de una disolución patrón de $0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$ PDT (tampón fosfato $0,5 \text{ M}$ pH=6). Medidas realizadas por triplicado

Según los resultados obtenidos, se puede apreciar que la concentración de sales presente en la orina es, al menos en parte, la responsable de la diferente sensibilidad observada en patrones acuosos y en orina.

Para corregir la interferencia proporcional se utilizó calibración mediante adición estándar.

Para eliminar el error constante se realizaron experimentos con el fin de conseguir una elución selectiva, basada en la diferente selectividad que presenta el relleno de la microcolumna respecto al analito y a los interferentes, eluyendo así el analito libre de interferentes. Estas se describen a continuación.

2.3.4. Elección de la disolución de lavado

Con el fin de eliminar los componentes que provocaban interferencias constantes, se estudió la incorporación de una etapa de lavado previa a la elución de PDT.

Como disolución de lavado se utilizaron diferentes concentraciones de HCl, de modo que los protones neutralizasen los grupos básicos aniónicos de las moléculas de interferentes provocando su elución. Al mismo tiempo, y aunque en menor medida, la presencia de cloruros favorece que los compuestos se liberen del sorbente ya que compiten por los puntos activos del mismo. Este mecanismo de elución es el mismo para las moléculas de PDT; por lo que, con el fin de evitar pérdidas de analito, se deben emplear disoluciones de lavado más diluidas que la disolución de HCl de elución (1 M).

La etapa de lavado se realizó haciendo pasar a través de la microcolumna 1 ml de disolución de HCl de diferentes concentraciones (entre 0,05 y 0,5 M).

El estudio se realizó de la siguiente forma: primero se inyectaron 500 μl de orina (previamente filtrada) exenta de PDT, a continuación se aplicó la etapa de lavado con 1 ml de HCl (cada vez con una concentración mayor) y, por último, se realizó la elución con 1 ml de HCl 1 M.

Para poder observar el comportamiento del analito en la etapa de lavado, se aplicó el procedimiento anterior a dos disoluciones conteniendo 0,1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de PDT, una en orina y otra en tampón fosfato 0,5 M de pH=6.

Cada secuencia se realizó por triplicado. Los resultados obtenidos se pueden observar en la figura 2.10, donde se muestra la señal de la fracción obtenida en la etapa de elución.

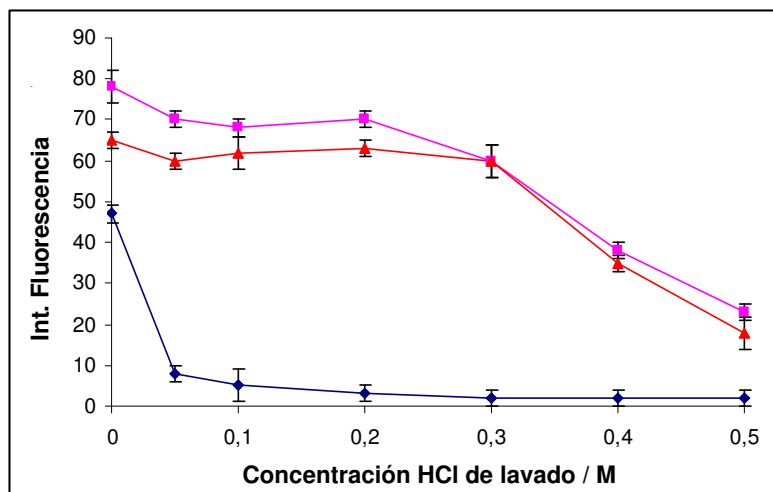


Fig. 2.10. Efecto de la concentración de HCl en la disolución de lavado sobre la señal en la etapa de elución de una orina exenta de PDT (◆), de una orina conteniendo $0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$ de PDT (■) y de una disolución tampón fosfato $0,5 \text{ M}$, $\text{pH}=6$, conteniendo $0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$ de PDT (▲)

Como se observa, mediante una etapa de lavado empleando 1 ml de HCl $0,3 \text{ M}$ se logra eliminar la señal provocada por las sustancias causantes de las interferencias constantes. El empleo de concentraciones de HCl superiores en la etapa de lavado provocaba pérdidas significativas de analito, lo que conducía a una menor sensibilidad.

También se estudió la posibilidad de realizar la etapa de lavado empleando 1 ml de disolución de NaCl de diferentes concentraciones. No se consiguieron resultados satisfactorios; por lo que el lavado con HCl resultó más eficaz.

Una vez definidas las mejores condiciones de lavado (1 ml de HCl $0,3 \text{ M}$) y elución (1 ml de HCl 1 M), se procedió a realizar el calibrado de adición estándar de una orina exenta de PDT. Se utilizó el sistema SIA que se muestra en la figura 2.11.

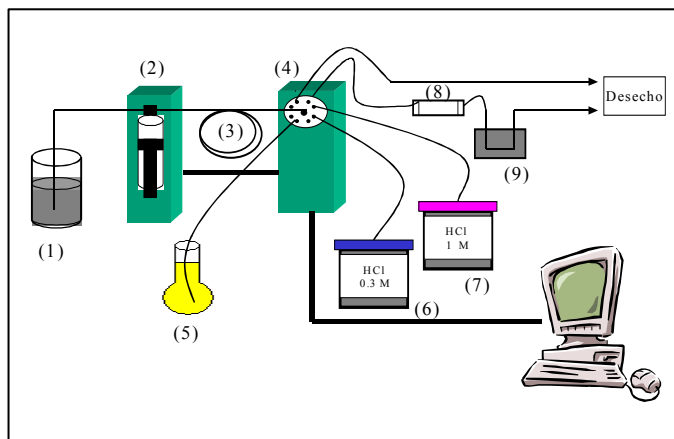


Fig. 2.11. Sistema SIA empleado en la realización del calibrado de adición estándar. (1) Portador (agua), (2) bureta automática provista de jeringa de 5 ml, (3) tubo de almacenamiento (2 m), (4) válvula automática de 8 vías, (5) disolución patrón de PDT en orina, (6) disolución de lavado (HCl 0,3 M), (7) disolución de elución (HCl 1 M), (8) microcolumna con relleno SAX, (9) celda de flujo acoplada al espectrofluorímetro

Se inyectaron 500 μl de orina fortificada con PDT (entre 0 y 0,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) (previamente filtrada), 1 ml de HCl 0,3 M y, finalmente, 1 ml de HCl 1 M para eluir el analito. Cada secuencia se realizó por triplicado. El registro obtenido se muestra en la figura 2.12.

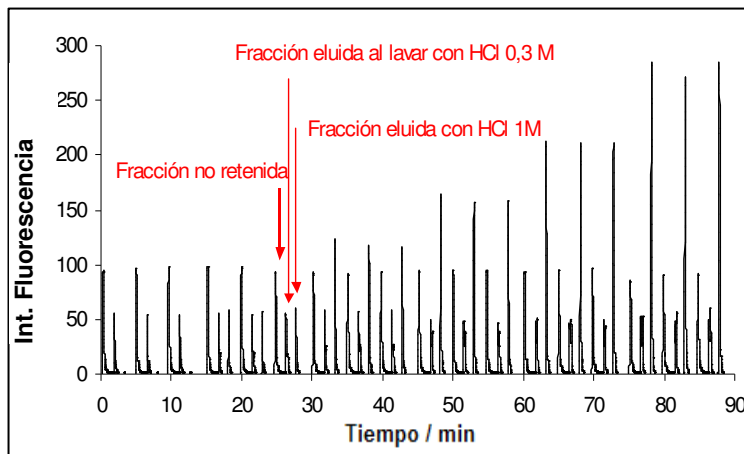


Fig. 2.12. Registro obtenido para el calibrado de adición estándar de una orina exenta de PDT

Como puede apreciarse, aparece una nueva fracción, que corresponde a la etapa de lavado, en la que se elimina la interferencia constante y una parte de analito. En las tres primeras réplicas (primer punto del calibrado) la fracción de elución no presenta señal apreciable, ya que no hay analito y los interferentes se han eliminado en la etapa de lavado.

En la recta de calibración resultante, $y=(524\pm 17)x + (3\pm 5)$, (la incertidumbre se ha estimado mediante la desviación estándar) (y es la intensidad de fluorescencia, x es la concentración en $\mu\text{g ml}^{-1}$), se observa que la interferencia constante ha sido eliminada, ya que el valor de $(t_{\text{cal}})_a$ fue de 0,59 (ver Apéndice II.5), menor al valor crítico del parámetro t de Student para un nivel de confianza del 95% y 6 puntos experimentales que es de 2,78.

2.3.5. Preparación en línea del calibrado de adición estándar en el sistema SIA

Se estudió la posibilidad de preparar la adición estándar en línea para conseguir un mayor grado de automatización. Se aspiraron 500 μl de orina (previamente filtrada y exenta de PDT) y, a continuación, 200 μl de disolución de PDT en tampón fosfato 0,5 M pH=6, transportándolos del tubo de almacenamiento a la microcolumna. Antes de la microcolumna se insertó un tubo de mezclado de 25 cm para asegurar un correcto

mezclado. Posteriormente se realizó la etapa de lavado con 1 ml de HCl 0,3 M; finalmente se eluyó el analito con HCl 1M. El sistema utilizado se indica en la figura 2.13. El ciclo se repitió con disoluciones patrón de PDT de concentración creciente por triplicado, para construir así la curva de calibrado.

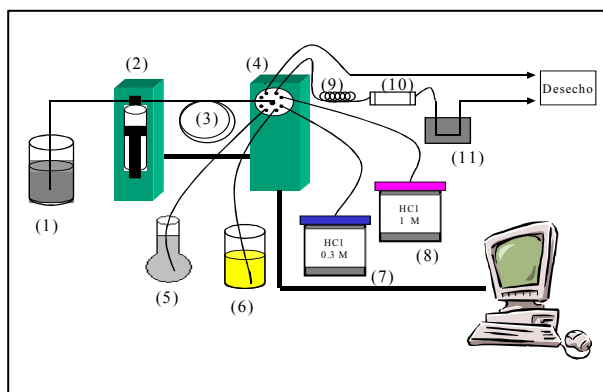


Fig. 2.13. Sistema SIA empleado en la construcción de la curva del calibrado de adición estándar en línea. (1) Portador: agua, (2) bureta automática provista de una jeringa de 5 ml, (3) bucle de almacenamiento, (4) válvula automática de 8 vías, (5) disolución acuosa de PDT patrón, (6) muestra de orina, (7) disolución de lavado HCl 0,3 M, (8) disolución de elución HCl 1 M, (9) tubo de mezclado de 25 cm, (10) microcolumna con relleno SAX, (11) celda de flujo acoplada al espectrofluorímetro

De esta forma se obtienen resultados equivalentes a los obtenidos con las disoluciones preparadas fuera de línea.

2.3.6. Estudio de la estructura del *sandwich*

Para el estudio de la estructura más adecuada de la secuencia de almacenamiento (o *sandwich*) se ensayaron diferentes secuencias de aspiración de orina (filtrada y exenta de PDT) y PDT patrón. Para ello se empleó el sistema SIA de la figura 2.12. El estudio se realizó con el patrón tamponado a pH=6 (tampón fosfato 0,5 M) y sin tamponar. En todos los casos se inyectaron 200 μl de un patrón de 0,75 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de PDT. La secuencia se realizó por triplicado para cada caso, con el fin de comparar sus respectivos coeficientes de variación (CV). Los resultados se resumen en la tabla 2.1.

Tabla 2.1. Estudio de la estructura del *sandwich*

Patrón	Estructura		CV / %
	nº	Secuencia	
Disolución PDT 0,75 $\mu\text{g ml}^{-1}$ en tampón fosfato 0,5 M pH=6	1	100 μl PDT-500 μl orina-100 μl PDT	1,00
	2	200 μl PDT-500 μl orina	0,52
	3	500 μl orina-200 μl PDT	0,39
	4	250 μl orina-200 μl PDT-250 μl orina	2,74
Disolución PDT 0,75 $\mu\text{g ml}^{-1}$ en agua	5	100 μl PDT-500 μl orina-100 μl PDT	4,06
	6	200 μl PDT-500 μl orina	2,60
	7	500 μl orina-200 μl PDT	3,09
	8	250 μl orina-200 μl PDT-250 μl orina	4,21

Como se muestra en la tabla, las secuencias con menores coeficientes de variación son la 2 y la 3, siendo ambos valores del mismo orden; por lo que podría utilizarse cualquiera de estas dos secuencias. Para futuros experimentos se escogió finalmente la secuencia 3.

2.3.7. Preparación del calibrado de adición estándar en línea a partir de una sola disolución de patrón

Se estudió la posibilidad de realizar la adición estándar inyectando volúmenes crecientes de una misma disolución patrón. En los experimentos anteriores, para cada punto del calibrado se necesitaba una disolución patrón diferente. Utilizar volúmenes crecientes de una misma disolución patrón de PDT es factible, ya que el analito queda retenido en la microcolumna y lo que importa no es la concentración inicial del patrón,

sino la masa introducida. Para verificar si se obtienen resultados equivalentes, se realizó el análisis de una orina (previamente filtrada) fortificada con PDT ($0,104 \mu\text{g ml}^{-1}$) utilizando diferentes patrones, y utilizando un solo patrón e inyectando diferentes volúmenes. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.2. La desviación estándar (s) se ha calculado tal como se indica en el Apéndice II.6.

Tabla 2.2. Comparación de resultados obtenidos realizando la adición estándar con diferentes patrones de concentración creciente y con un solo patrón, inyectando diferentes volúmenes

Secuencia	C \pm s* / $\mu\text{g ml}^{-1}$
500 μl orina-200 μl PDT (C $\mu\text{g ml}^{-1}$) C = 0-0,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$,	0,107 \pm 0,009
500 μl orina- V μl PDT (0,4 $\mu\text{g ml}^{-1}$) V = 0, 50, 100, 150, 200, 250 μl .	0,098 \pm 0,014

* C=concentración, s=desviación estándar

Los resultados obtenidos se compararon con un test de Student, la t_{cal} calculada fue 1,32, menor que la t crítica para un nivel de confianza del 95%, ($t_{\text{crit}}=2,36$). Por tanto, los resultados son estadísticamente comparables. Se propone la estrategia de inyección de volúmenes variables por presentar un mayor grado de automatización, menor manipulación y menor tiempo de análisis (ya que no es necesaria la limpieza entre disoluciones patrón).

Con el fin de disminuir el valor, algo elevado, de la desviación estándar del método de inyección de volúmenes variables, se modificó el diseño aumentando los volúmenes. En lugar de inyectar 0, 50, 100, 150, 200 y 250 μl de un patrón (tamponado, pH=6) de 0,4 $\mu\text{g ml}^{-1}$ PDT se inyectaron 0, 100, 200, 300, 400 y 500 μl de un patrón (tamponado, pH=6) de 0,2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ PDT. De esta forma, se analizó una orina fortificada con 0,100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de PDT (previamente filtrada) obteniéndose un resultado de $0,095 \pm 0,005 \mu\text{g ml}^{-1}$; lo que supone una mayor precisión. Por tanto, se utilizó este último diseño en los experimentos siguientes.

2.3.8. Modificación de las condiciones de lavado y elución

Al realizar nuevos experimentos analizando más orinas fortificadas se observó que los últimos puntos de los calibrados presentaban una señal

sensiblemente menor a la esperada, con rectas poco lineales y, por tanto, con baja precisión. Esto se debía al deterioro del relleno de la microcolumna, que fue sustituido por otro nuevo. El nuevo relleno utilizado era de una casa comercial distinta y las rectas de calibrado de adición estándar de orinas fortificadas eran lineales, pero conducían a errores del orden del 30 % en la concentración de PDT.

Este error por exceso podría deberse a que el nuevo relleno retenía aún más aquellos compuestos de la orina que provocan interferencias constantes, haciendo insuficiente la etapa de lavado hasta ahora utilizada. Esto se confirmó al inyectar 500 μ l de orina exenta de PDT, realizar el lavado habitual y eluir. Se observó una señal de 31 unidades de intensidad de fluorescencia, por lo que las condiciones de lavado optimizadas anteriormente para el relleno SAX de Merck® eran insuficientes. Lavados más agresivos, incluso con HCl 0,5 M, aún daban una señal significativa de 14 unidades de intensidad.

Se estudió la posibilidad de añadir a la disolución de lavado una cierta cantidad de EtOH para favorecer la eliminación de los compuestos interferentes, evitando en lo posible la elución del analito en la etapa de lavado. Se comprobó que el EtOH no era capaz de eluir al analito, inyectando un patrón acuoso y midiendo la intensidad al aplicar un lavado con EtOH al 75%.

Se llevó a cabo un estudio del porcentaje de etanol necesario, fijando la concentración de HCl en la etapa de lavado en 0,3 M. Se prepararon disoluciones del 25%, 50% y 75% en EtOH, todas 0,3 M en HCl. Se inyectaron 500 μ l de orina exenta de PDT (previamente filtrada), se realizó el lavado con 1 ml de las disoluciones anteriores y se eluyó con HCl 1 M. El resultado se muestra en la figura 2.14.

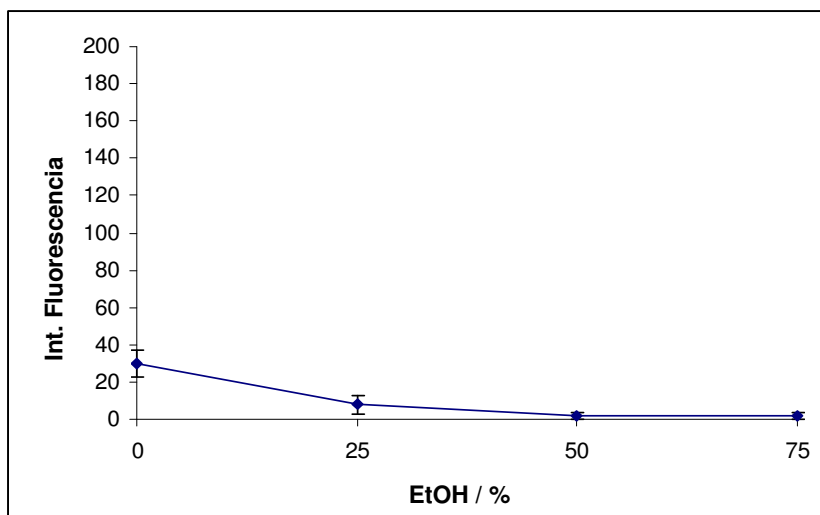


Fig. 2.14. Estudio de la influencia del porcentaje de EtOH de la disolución de lavado en la intensidad de fluorescencia de la etapa de elución (inyectando una orina exenta de PDT)

A la vista de los resultados, parece que el lavado más eficaz se realiza con mezcla de HCl 0,3 M conteniendo más de un 50 % de EtOH.

Se realizó otro estudio similar (con orinas exentas de PDT) variando la concentración de HCl de la disolución de lavado y manteniendo el 50% de etanol, y se inyectaron 500 μl de orina más 200 μl de PDT patrón de 0,2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (tamponado a pH=6). Se realizó cada secuencia por triplicado, midiendo la intensidad de fluorescencia al eluir con HCl 1 M. Los resultados se muestran en la figura 2.15.

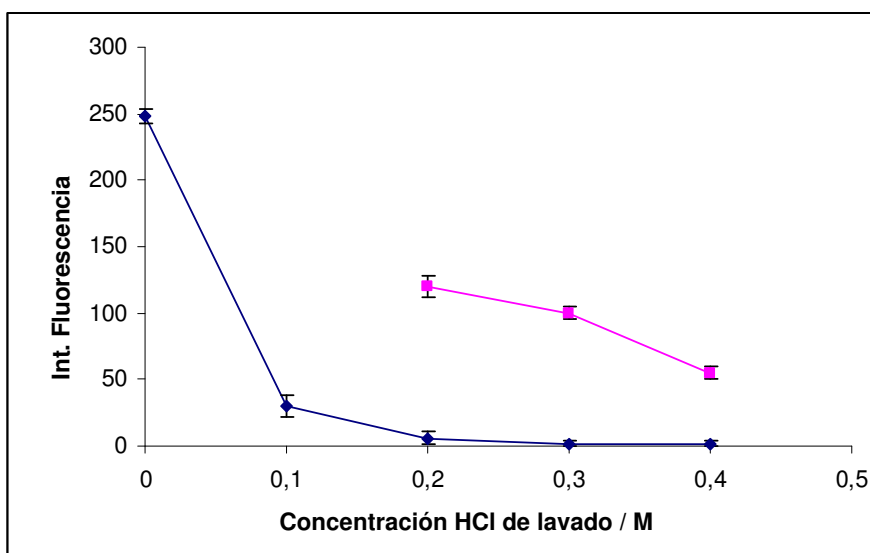


Fig. 2.15. Efecto de la concentración de HCl en la disolución de lavado (con un 50 % de EtOH) sobre la señal en la etapa de elución de una orina exenta de PDT (♦) y de una orina conteniendo $0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$ de PDT (■)

Con HCl 0,3 M en medio 50% EtOH se consiguieron buenos lavados y la señal del PDT no disminuía excesivamente, dando valores similares a los obtenidos en experimentos anteriores, lo que confirmó que la presencia de EtOH en la disolución de lavado no eluía analito, eliminando solamente interferentes.

Al estudiar la concentración del HCl de elución se obtuvieron resultados equivalentes a los del estudio con el anterior relleno.

Por tanto, la señal analítica del PDT depende de la etapa de lavado, a la vez que de la concentración del HCl de la etapa de elución. Con el fin de optimizar conjuntamente la etapa de elución y la de lavado, se realizó un estudio multivariante mediante el algoritmo SIMPLEX, entre la concentración del HCl de elución, la concentración del HCl de lavado y el porcentaje de EtOH en la misma. En el programa informático se incluyó la condición de señal mínima al eluir $500 \mu\text{l}$ de una orina exenta de PDT, pero sin utilizar menos de HCl 1 M, ya que con menos no se eluye cuantitativamente (tanto el volumen inyectado de disolución de lavado, como de disolución de elución, eran de 1 ml). Como punto de partida se utilizaron los valores encontrados en el anterior estudio univariante (HCl

0,3 M en 50% EtOH para el lavado y HCl 1M para la elución). La realización de los experimentos propuestos por el algoritmo SIMPLEX indicó que los valores óptimos para las variables estudiadas eran:

Disolución de lavado: 1 ml de HCl 0,3 M conteniendo 45% de EtOH

Disolución de elución: 1 ml de HCl 1,15 M

Por tanto, en los estudios posteriores se utilizaron estas condiciones para realizar los análisis, independientemente del relleno utilizado; asegurando así un lavado realmente eficaz. Para comprobar la eliminación de la interferencia constante se realizó un calibrado de adición estándar de una orina exenta de PDT. Se inyectaron 500 μl de orina más $V \mu\text{l}$ de disolución patrón de 0,2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de PDT (tampón fosfato 0,5 M pH=6) ($V = 0, 100, 200, 300, 400$ y 500 μl para cada punto del calibrado). Cada secuencia se realizó por triplicado.

La ordenada en el origen resultó estadísticamente comparable a cero ya que el valor de $(t_{\text{cal}})_a$ fue de 0,54 (ver Apéndice II.5), menor al valor crítico del parámetro t de Student para un nivel de confianza del 95% y 6 puntos experimentales que es de 2,78; lo que demuestra que los compuestos que provocaban las interferencias constantes habían sido eliminados.

2.3.9. Diseño de la preparación del calibrado de adición estándar para una extrapolación correcta

Se fortificaron orinas exentas de PDT con cantidades conocidas de éste (0,050–0,200 $\mu\text{g ml}^{-1}$), con el fin de llevar a cabo su análisis mediante el procedimiento en estudio y estudiar así si se obtenían resultados comparables a la cantidad aditivada. Se obtuvo que los análisis de orinas fortificadas con cantidades superiores a 0,100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ daban resultados con errores superiores al 10%. Esto se debió a que la ordenada en el origen del correspondiente calibrado de adición estándar (coincidente con el primer punto del calibrado, y por tanto, sin añadir PDT patrón) era relativamente elevada, lo que provocaba que se obtuviera un error considerable al obtener la concentración por extrapolación mediante el calibrado de adición estándar.

Con el fin de solucionar este problema, se inyectó un volumen de orina diferente que dependía de la señal que cada orina presentaba antes de empezar a añadir PDT para construir el calibrado de adición estándar. Así, se inyectaron menores volúmenes de las orinas que proporcionaban

señales altas con la correspondiente disminución de la señal (ya que se inyecta menos masa de PDT).

Se observó que el volumen de inyección de muestra se debe regular para obtener una señal del primer pico de elución menor que 50 unidades de intensidad. De esta forma, al extrapolar la lectura de la recta, se obtienen valores similares al primer patrón (segundo punto del calibrado), criterio que a menudo se utiliza en el diseño del calibrado de adición estándar.

En la fig. 2.16 se muestra un ejemplo de una curva de calibrado mediante adición estándar diseñado de esta manera.

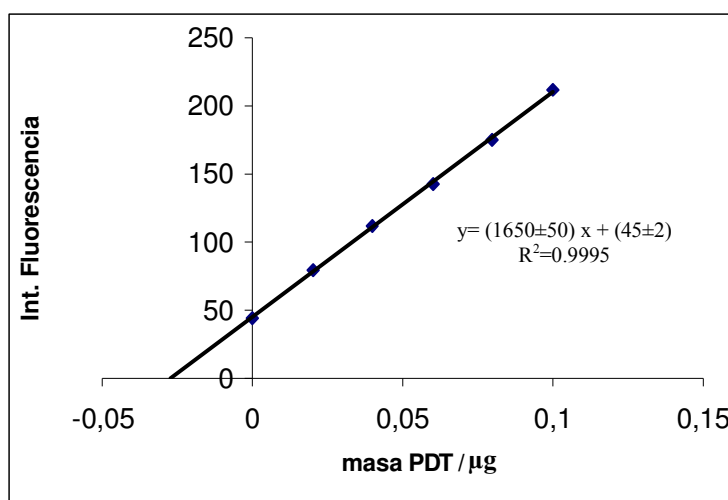


Fig. 2.16. Diseño del calibrado de adición estándar que ofrece resultados correctos. La incertidumbre de la pendiente y la ordenada en el origen se estima mediante su desviación estándar

De esta manera se obtienen resultados exactos para el intervalo de concentraciones estudiado.

2.3.10. Estudio del sistema de filtración utilizado

La orina debe filtrarse antes de inyectarse en el sistema SIA para eliminar las partículas en suspensión. En un principio se filtró con papel Whatman nº 42, pero se observó que se obtenían valores muy inferiores a los reales. Para corroborarlo se inyectó una disolución patrón de PDT sin filtrar, a continuación se filtró con el papel y se volvió a inyectar, observándose una

sensible disminución de la señal, del orden del 40%. Por tanto, se debía evitar filtrar con papel de filtro ya que el PDT se retiene parcialmente en el papel. Se ideó un sistema alternativo basado en la utilización de unas fritas de material poroso insertadas en un cartucho de plástico. Para hacer pasar toda la orina por el cartucho se acopló una jeringa. De esta manera se conseguía filtrar correctamente la orina sin pérdidas de analito. El sistema de filtración se ilustra en la figura 2.17.

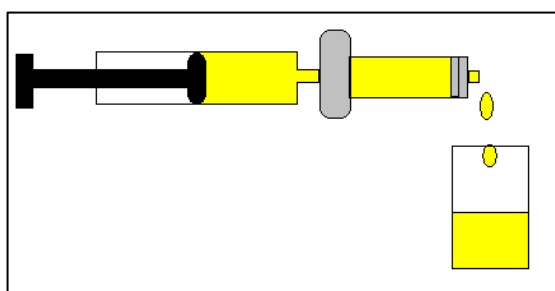


Fig. 2.17. Sistema de filtración utilizado

2.3.11. Estudio de la influencia del pH en el resultado analítico

Debido a la gran variedad de pHs que pueden presentar las orinas de los distintos individuos, se hace necesario estudiar su influencia en el resultado analítico. Para ello se tomaron cuatro fracciones de una misma orina (exenta de PDT), se ajustó cada una a un pH (4, 5, 6 y 7) con la ayuda de HCl 1M o NH₃ 2 M, y se fortificaron con 0,060 µg ml⁻¹ de PDT.

Las orinas así preparadas se filtraron y se analizaron. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 2.3.

Tabla 2.3. Resultados obtenidos en la determinación de PDT en orinas ajustadas a diferentes pHs. Los resultados se muestran con su desviación estándar

Concentración real / µg ml ⁻¹	pH=4	pH=5	pH=6	pH=7
0,060	0,061±0,006	0,061±0,005	0,065±0,003	0,065±0,002

Como se puede apreciar, dentro del intervalo estudiado (que es el habitual en la orina humana) se obtienen resultados satisfactorios en los cuatro casos. Por tanto, el pH de las muestras no afecta al resultado analítico.

2.3.12. Estudio de la estabilidad de las muestras de orina con el tiempo

Con el fin de estudiar la estabilidad de las muestras de orina con el tiempo, para la determinación de PDT, se realizó el siguiente experimento: se fortificó una muestra de orina (250 ml) con $0,101 \mu\text{g ml}^{-1}$ de PDT, se dividió en dos fracciones, una se conservó en nevera ($11 \text{ }^{\circ}\text{C}$) y la otra a temperatura ambiente (28°C). Ambas fracciones fueron analizadas diariamente. Los resultados se muestran en la tabla 2.4.

Tabla 2.4. Estudio de la conservación de las muestras de orina. Los resultados se muestran con su desviación estándar

	Días transcurridos				
	0	1	2	3	4
	$C \pm s^* / \mu\text{g ml}^{-1}$				
T= $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$	$0,103 \pm 0,009$	$0,108 \pm 0,008$	$0,123 \pm 0,005$	$0,126 \pm 0,009$	$0,123 \pm 0,010$
T= $11 \text{ }^{\circ}\text{C}$	$0,103 \pm 0,009$	$0,106 \pm 0,008$	$0,101 \pm 0,004$	$0,134 \pm 0,012$	$0,122 \pm 0,007$

* C=concentración encontrada de PDT, s=desviación estándar

A la vista de los resultados, se observa que a temperatura ambiente se obtenían resultados satisfactorios (error relativo $< 10\%$) durante el día de toma de muestra y al siguiente; en días sucesivos el valor era muy superior. Esta tendencia también se refleja a $11 \text{ }^{\circ}\text{C}$, pero en este caso se obtenían resultados satisfactorios durante un día más.

Cabe indicar la aparición de un precipitado arenoso a partir del segundo día en la orina conservada a temperatura ambiente, que no se observa en la orina conservada a $11 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

La aparición de resultados más elevados a los iniciales se podría deber a la formación de sustancias fluorescentes de degradación de algún

componente de la orina, que queda retenido en la microcolumna a pesar de la etapa de lavado, y que se eluye junto al analito.

Por tanto, el análisis nunca debe realizarse después del primer día de almacenamiento a T ambiente o después del segundo a 11 °C.

2.3.13. Método propuesto para la determinación de PDT en orina de usuarios de productos cosméticos para la protección solar

En base a los estudios precedentes, se propone el siguiente procedimiento experimental:

Tomar la muestra de orina, dejar alcanzar temperatura ambiente y filtrar mediante unas fritas.

Preparar una disolución patrón con $0,2 \mu\text{g ml}^{-1}$ de PDT (para favorecer la disolución del PDT se pueden añadir unas gotas de NaOH 10%) en tampón fosfato 0,5 M, pH=6.

Acondicionar la microcolumna (100 mg de relleno SAX) haciendo pasar por el sistema 250 μl de EtOH y 1 ml de agua antes de cada sesión de trabajo.

Empleando el sistema SIA de la figura 2.17 realizar el siguiente ciclo:

- 1. Aspiración de 3500 μl de portador (H_2O nanopure).**
- 2. Aspiración de 150-500 μl de orina (según la intensidad del primer punto del calibrado con el fin de obtener una señal del orden de 50).**
- 3. Aspiración de V μl de disolución patrón de PDT de $0,2 \mu\text{g ml}^{-1}$, pH=6 (V = 0, 100, 200, 300, 400, 500).**
- 4. Propulsión de 4500 μl a través de la microcolumna (carga de la microcolumna).**
- 5. Aspiración de 3000 μl de portador.**
- 6. Aspiración de 1000 μl de disolución de lavado (HCl 0,3 M conteniendo 45% de EtOH).**
- 7. Propulsión de 4000 μl a través de la microcolumna.**
- 8. Aspiración de 3000 μl de portador.**
- 9. Aspiración de 1000 μl de eluyente (HCl 1,15 M).**
- 10. Propulsión de 4000 μl a través de la microcolumna.**

(Esta secuencia se realiza por triplicado para cada uno de los puntos que constituyen el calibrado de adición estándar).

Realizar las medidas fluorimétricas, utilizando los siguientes parámetros instrumentales: Longitud de onda de excitación 330 nm, longitud de onda de emisión 454 nm, ancho de las rendijas 10 nm, tiempo de respuesta 0,02 s, sensibilidad media y toma de datos cada 0,5 s.

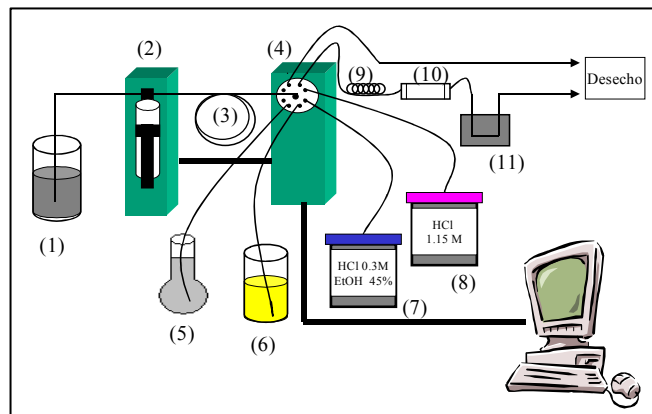


Fig. 2.18. Sistema SIA empleado. (1) Portador (agua), (2) bureta automática provista de una jeringa de 5 ml, (3) bucle de almacenamiento, (4) válvula automática de 8 vías, (5) disolución acuosa de PDT patrón, (6) muestra de orina, (7) disolución de lavado HCl 0,3 M al 45% EtOH, (8) disolución de elución HCl 1,15 M, (9) tubo de mezclado de 25 cm, (10) microcolumna con relleno SAX, (11) celda de flujo acoplada al espectrofluorímetro

2.3.14. Parámetros analíticos del método

Estudio de la exactitud

Para comprobar la exactitud del método propuesto, se analizaron distintas orinas exentas de PDT, fortificadas con distintas concentraciones de PDT, con el fin de cubrir un intervalo de concentración suficientemente amplio. Los resultados se muestran en la tabla 2.5.

Tabla 2.5. Resultados obtenidos en el análisis de muestras de orina aditivadas con PDT

Muestra	Concentración real / $\mu\text{g ml}^{-1}$	$C \pm s^* / \mu\text{g ml}^{-1}$
1	0,100	0,110 \pm 0,019
2	0,061	0,064 \pm 0,005
3	0,051	0,055 \pm 0,002
4	0,202	0,198 \pm 0,013
5	0,043	0,047 \pm 0,002
6	0,122	0,130 \pm 0,006
7	0,150	0,160 \pm 0,012
8	0,079	0,081 \pm 0,004
9	0,049	0,046 \pm 0,004
10	0,060	0,061 \pm 0,002
11	0,120	0,125 \pm 0,017

* C=concentración hallada, s=desviación estándar

Los resultados obtenidos fueron comparados mediante un modelo de regresión lineal, representando en abcisas la concentración real y en ordenadas la concentración hallada al aplicar el método propuesto. La regresión se muestra en la figura 2.19.

Para poder validar la exactitud del método se debe comprobar que la ordenada en el origen del modelo de regresión lineal es estadísticamente comparable a cero y que la pendiente es estadísticamente comparable a 1, tal como se describe en el Apéndice II.5.

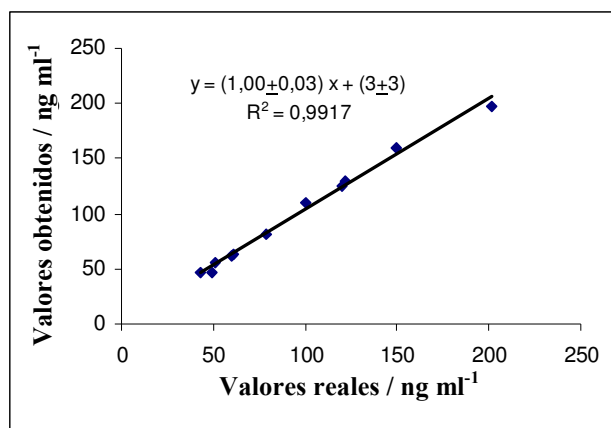


Fig. 2.19. Comparación de los valores obtenidos con los reales

El valor de $(t_{cal})_a$ fue de 1,01 mientras que el de $(t_{cal})_b$ fue de 0,03 (ver Apéndice II.5). Como el valor crítico del parámetro t de Student para un nivel de confianza del 95% y 11 puntos experimentales es de 2,26, se puede concluir que los resultados obtenidos por el método propuesto son estadísticamente exactos.

Precisión

Los coeficientes de variación de los resultados obtenidos por el método propuesto oscilan entre el 3 y el 14%, con un valor medio del 7%. Por tanto el método propuesto proporciona resultados precisos.

Parámetros instrumentales

Los coeficientes de variación de la señal analítica están comprendidos entre el 0,9 y el 7%, en función de la masa introducida.

El tiempo requerido para la realización de un ciclo completo, incluyendo la inyección de la orina (una sola inyección) y el patrón, la etapa de lavado y la etapa de elución del analito, es de 345 segundos.

Parámetros de calibración

La sensibilidad se puede estimar a partir de la pendiente del calibrado de adición estándar, pero en este caso la pendiente varía de una orina a otra (debido al diferente efecto matriz); además, se observó su disminución paulatina conforme se iba deteriorando el relleno. Por ello se ha estimado la sensibilidad como el valor promedio de las pendientes de los calibrados de adición estándar. Se obtuvo un valor promedio de $1900 \pm 500 \mu\text{g}^{-1}$ (la incertidumbre del valor medio se estima mediante su desviación estándar).

El límite de detección (LD) se puede calcular como $(3 s_{y/x}) / b$, donde $s_{y/x}$ es la desviación estándar de los residuos de la recta de calibrado y b es la pendiente. Como ya se ha comentado, la pendiente no presenta un valor constante, por tanto, se estima el LD como valor promedio de los calibrados realizados. El LD así calculado es $0,005 \pm 0,002 \mu\text{g}$, lo que equivaldría a $10 \pm 4 \text{ ng ml}^{-1}$ para un volumen de inyección de $500 \mu\text{l}$ de orina.

2.3.15. Validación del método propuesto mediante el estudio de la excreción urinaria de PDT en usuarios de productos solares

El método analítico descrito en el apartado 2.3.13. se utilizó en el análisis de muestras de orina de 5 voluntarios que se aplicaron un producto solar conteniendo PDT.

Se recogió una muestra de orina de cada voluntario a primera hora de la mañana (blanco). A continuación se aplicaron 10 ml de la loción solar (conteniendo 5% PDT) sobre la piel, esperando 15 minutos antes de vestirse para evitar pérdidas del producto.

En cada evacuación urinaria (aproximadamente cada 2–3 horas), se recogió el total de la orina excretada, midiendo su volumen. A continuación, se guardaba una fracción y se desechaba el resto. Las sucesivas muestras se fueron almacenando en nevera, hasta su análisis que en cualquier caso fue antes de dos días desde la excreción. Se recogieron sus orinas durante un intervalo de 1 a 3 días, hasta que la concentración de PDT no fue detectable.

La figura 2.20 muestra los resultados obtenidos expresados como μg totales excretados. El voluntario 4 excretó aproximadamente $300 \mu\text{g}$ de PDT durante 30 horas después de la aplicación (0,06% de la dosis

aplicada). Los voluntarios 1 y 2 excretaron entre 35–45 μg y necesitaron 35 y 50 horas (aproximadamente 0,008% de la dosis aplicada), respectivamente, para su total eliminación. No obstante, el voluntario 3 presentó unos niveles muy bajos (3,5 μg) y una eliminación muy rápida (8 horas) (0,0007% de la dosis aplicada). En las orinas del voluntario 5 no se encontraron cantidades detectables de PDT.

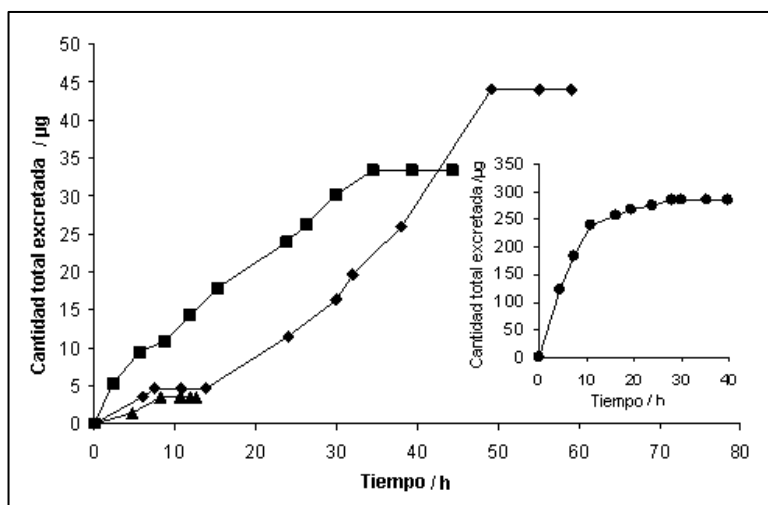


Fig. 2.20. Estudio de eliminación de PDT. (■) Voluntario 1; (◆) Voluntario 2; (▲) Voluntario 3; (●) Voluntario 4

Estos resultados muestran que los procesos de absorción–excreción del PDT en el cuerpo humano dependen en gran medida de cada sujeto.

La velocidad de difusión a través de la bicapa lipídica depende del tamaño de la molécula, de su liposolubilidad y de su grado de ionización.

Las moléculas más grandes y más hidrosolubles presentan más dificultad para atravesar la piel. El filtro solar estudiado es una molécula relativamente grande y, debido a sus cuatro grupos sulfónicos, es bastante hidrosoluble; por tanto no es de extrañar que la absorción por la piel se vea bastante impedida, tal y como muestran los resultados obtenidos. El porcentaje de excreción máximo para el PDT fue del 0,06% (voluntario 4), valor muy inferior al encontrado en la bibliografía para el filtro liposoluble benzofenona-3 que fue del orden del 1% (Sarveiya et al., 2004).

Es de destacar que si se confirman estos resultados, el PDT permitiría una buena protección solar (eficacia) con un bajo nivel de absorción

percutánea y una rápida eliminación, lo que tendría interés desde el punto de vista de su seguridad.

2.4. CONCLUSIONES

En este trabajo se ha propuesto por primera vez un método analítico que permite la determinación de PDT a niveles de ng ml^{-1} en muestras de orina.

La determinación directa y selectiva de PDT en muestras de orina se realiza mediante la combinación de un sistema de análisis por inyección secuencial incorporando en línea una extracción en fase sólida y posterior detección fluorimétrica.

Al estar automatizado el proceso se consigue una disminución del consumo de reactivos y de los residuos generados. El sistema SIA puede ser programado mediante el *software* adecuado.

La posibilidad de realizar la calibración mediante el método de adición estándar en línea empleando el sistema SIA permite compensar el efecto matriz partiendo de una sola disolución patrón. La exactitud del método desarrollado ha sido probada mediante el análisis de once muestras de orina fortificadas.

La sensibilidad del método permite la determinación del PDT en muestras de orina obtenidas de voluntarios después de la aplicación tópica de un producto solar conteniendo PDT. Los resultados parecen indicar que la excreción de este filtro UV es baja y suficientemente rápida.

Capítulo 3

Desarrollo de un método analítico para la determinación de fenil dibencimidazol tetrasulfonato disódico en estudios basados en la simulación *in vitro* del proceso de absorción percutánea, empleando cromatografía líquida con detección fluorimétrica

El contenido de este capítulo ha sido publicado en *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2006) 385:1225-1232.

3.1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO DEL TRABAJO

Como se mencionó en el Capítulo 2, el fenil dibenzimidazol tetrasulfonato disódico (PDT) es un nuevo filtro UV hidrosoluble usado en las modernas formulaciones cosméticas para la protección solar en forma de spray.

En el Capítulo 2 se describió un método que permitió demostrar la existencia de trazas de PDT en la orina de los usuarios de productos cosméticos solares que contienen este compuesto, lo que demuestra que una cierta cantidad de PDT se absorbe a través de la piel.

El objetivo del trabajo presentado en este capítulo es desarrollar un método *in vitro* sensible que permita determinar el porcentaje de absorción de este filtro UV que penetra a través de la piel, objetivo que se enmarca dentro de la justificación general de la Tesis Doctoral descrita al inicio de la presente Memoria.

El método estudiado está basado en la simulación *in vitro* del proceso de absorción percutánea, empleando una celda de difusión y realizando la determinación en el líquido receptor mediante cromatografía líquida con detección fluorimétrica. En los estudios realizados se ha utilizado epidermis humana.

Para el estudio de la integridad de las células empleadas se desarrolla y valida un método para la determinación de un marcador coloreado (rojo de fenol) mediante un sistema de inyección secuencial con una etapa de extracción en fase sólida (EFS) en línea y posterior detección espectrofotométrica UV/vis.

3.2. PARTE EXPERIMENTAL

3.2.1. Metodología experimental

En primer lugar, se realizaron ensayos previos consistentes en la preparación de la piel humana y el montaje de las células de difusión.

Para estudiar la integridad de la epidermis durante todo el proceso se desarrolló un método analítico para la determinación de un marcador coloreado, rojo de fenol (RF), que se introduce en el compartimento dador. Para la determinación de rojo de fenol se empleó un sistema de análisis

por inyección secuencial provisto de una etapa de extracción en fase sólida en línea y detección espectrofotométrica UV/vis.

Finalmente, se desarrolló el método analítico para la determinación de PDT en el líquido receptor para realizar el estudio *in vitro* de la absorción percutánea de este filtro UV. Para su determinación se propuso la cromatografía líquida con detección fluorimétrica. Las etapas seguidas fueron las siguientes: en primer lugar se estudió las variables instrumentales y la composición y el caudal de la fase móvil. A continuación se estudiaron los parámetros analíticos (exactitud, sensibilidad, precisión...) y por último se validó el método mediante el estudio de la absorción percutánea de PDT a través de piel humana.

3.2.2 Aparatos y material

Las celdas de difusión empleadas fueron fabricadas por VidraFoc® (Barcelona, España) utilizando un diseño del grupo de investigación de los profesores Dra. Marina Herráez y Dr. Octavio Díez del departamento de Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Valencia (Díez-Sales et al., 1991; Borrás-Blasco et al., 2004; Díez-Sales et al., 2005), con cuya colaboración hemos contado en este trabajo.

Se utilizó un baño termostatzado J.P Selecta® (Barcelona) modelo Precistern y un agitador magnético sumergible Variomag® modelo Telesystem fabricado por H+P Labortechnik AG (Wasserburg, Alemania).

Para la determinación de PDT se empleó un sistema de cromatografía líquida Perkin Elmer (Massachussets, USA), equipado con una bomba modelo 250 y un detector de fluorescencia serie 200, se usó un bucle de inyección de 20 µl y una columna LiChrospher® RP-18 (12,5 cm x 4mm diámetro interno y 5 µm tamaño de partícula) de Merck (Darmstadt, Alemania).

Se empleó un espectrofotómetro UV/vis Hewlett-Packard (Hanover, USA) modelo 8453 para la determinación en línea del rojo de fenol (RF), usado como marcador para evaluar la integridad de la piel durante el estudio *in vitro*.

El sistema SIA utilizado consta de una válvula automática de 8 vías Crison (Barcelona) 2030 y una bureta automática Crison 2031 con jeringa de 5 ml. Se utilizaron tubos de teflón de 0,5 mm de diámetro interno.

Como celda de medida se empleó una cubeta de flujo UV/vis Hellma® (Badalona) de 1,5 mm de paso óptico y 25 µl de volumen interno.

La microcolumna se preparó a partir de 100 mg de relleno C18 obtenido a partir de un cartucho de extracción en fase sólida Varian (Barcelona).

Las medidas del pH fueron realizadas empleando un pHmetro Crison (Barcelona) modelo micropH 2001.

3.2.3. Reactivos

Se emplearon los siguientes reactivos, fenil dibencimidazol tetrasulfonato disódico (PDT) R>98% (Haaimann & Reimer, Parets del Vallés), rojo de fenol (RF) R>99%, ácido clorhídrico 37% d=1,19 g ml⁻¹ grado análisis, etanol absoluto grado HPLC y cloruro sódico grado análisis (Scharlab, Barcelona). También se utilizó hidróxido sódico grado análisis (Probus S.A., Badalona), dihidrogenofosfato sódico monohidrato grado análisis (Merck, Damstandt (Alemania)) y monohidrogenofosfato disódico anhidro grado análisis (Panreac, Barcelona). Se empleó agua desionizada obtenida a partir del sistema NANOpure II (Boston, USA).

Se preparó una loción solar en el laboratorio, siguiendo el protocolo de fabricación facilitado por la empresa RNB-Cosméticos, que emplea en la formulación de lociones solares otros filtros semejantes al PDT (ver Apéndice III.1). Para su elaboración se emplearon ingredientes de grado cosmético suministrados por la propia empresa. La loción contenía un 5 % en PDT (el máximo legal permitido es del 10%). A la loción así preparada se le adicionó la masa de patrón de RF (como marcador para estimar la integridad de la piel) necesaria para obtener una loción final con un 0,05% de RF.

El fluido receptor se preparó mezclando 20 ml de NaH₂PO₄ 10,4 g l⁻¹ y 80 ml de Na₂HPO₄ 11,9 g l⁻¹ para obtener una disolución tampón de pH 7,4, que contenía un 0,44 % NaCl. De esta forma se simulan el pH y la fuerza iónica de la sangre.

3.2.4. Preparación de la piel humana

Todos los estudios de difusión se realizaron empleando epidermis humana abdominal procedente de mujeres caucásicas, de edad comprendida entre 30 y 40 años, obtenidas después de operaciones de cirugía estética.

La preparación de la piel comprende las siguientes etapas:

En primer lugar, se eliminó la grasa de la piel de forma mecánica, utilizando un bisturí. A continuación se fijó la piel a un soporte de goma (ver figura 3.1a) y se sumergió en un baño de agua a 60 °C durante un minuto. Transcurrido este tiempo se retiró del baño y se procede a la separación de la epidermis con la ayuda de unas pinzas (esta operación debe realizarse con sumo cuidado para no provocar roturas en la epidermis extraída). A continuación, se cortó la epidermis en trozos más pequeños (figura 3.1b), acordes al tamaño de las celdas de difusión. Estos trozos pueden utilizarse directamente o conservarse para un estudio posterior, depositándolos sobre un papel de filtro absorbente y congelándolos.

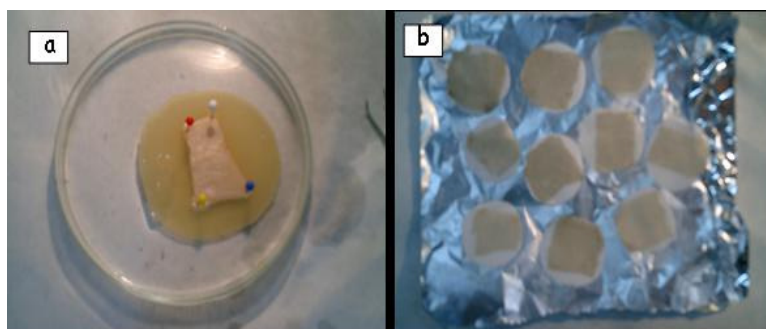


Fig.3.1. (a) Piel sobre soporte de goma. (b) Epidermis sobre soporte de papel de filtro

3.2.5. Preparación de las celdas de difusión y toma de muestra

A continuación se muestra un esquema de una celda de difusión.

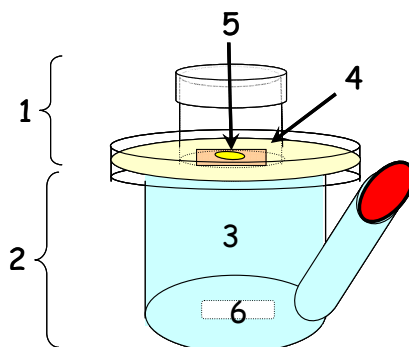


Fig.3.2. Esquema de una celda de difusión. 1. Compartimento dador. 2. Compartimento receptor. 3. Líquido receptor. 4. Epidermis. 5. Loción. 6. Agitador magnético

Las celdas están construidas con vidrio y constan de dos compartimentos, uno superior, o dador, y otro situado en la parte inferior, llamado compartimento receptor. La epidermis ya preparada se sitúa entre ambos compartimentos; el compartimento receptor se llena con un fluido receptor de forma completa para asegurar el contacto íntimo con la parte inferior de la epidermis.

El compartimento receptor también dispone de un orificio en forma de tubo, provisto de un tapón, por el que se realiza la toma de muestra. Además, se introduce un pequeño agitador magnético para conseguir una correcta homogeneización del receptor.

Se realizaron ensayos preliminares encaminados a conseguir un total sellado de las celdas y evitar fugas en el sistema. Las zonas de contacto entre ambos compartimentos están esmeriladas para favorecer el correcto sellado de la piel. Además, se aplicó silicona líquida por el borde de ambos lados de forma que el único paso posible de moléculas del compartimento dador al receptor era a través de la epidermis.

Después, se aplicó un volumen de 10 μ l de la loción solar sobre la piel, en el compartimento dador.

Las celdas una vez preparadas, se introdujeron en un baño termostático a 37 °C de temperatura y en constante agitación; el compartimento dador se tapó con parafilm (ver figura 3.3).



Fig. 3.3. Sistema termostático provisto de agitación magnética con capacidad para 15 celdas, en el que se puede observar seis celdas de difusión

Tras 2 horas de funcionamiento de la celda, se extrajeron 20 μ l del compartimento receptor, reponiendo dicha cantidad con fluido receptor nuevo y tapando de nuevo el tubo de toma de muestra. Se realizó otra toma de muestra a las 22 y a las 24 horas. Las diluciones debidas a la reposición de fluido receptor se corrigieron posteriormente a la hora de realizar los cálculos.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. Elección de las variables experimentales del sistema de simulación *in vitro*

En la realización de los experimentos se utilizó únicamente la epidermis. Esta decisión se tomó porque la dermis podría retener el PDT en el montaje estático; esta retención no se produce *in vivo*, ya que el sistema

microcirculatorio irriga abundantemente la dermis, incorporando fácilmente las sustancias exógenas al sistema circulatorio (ver figura 3.4).

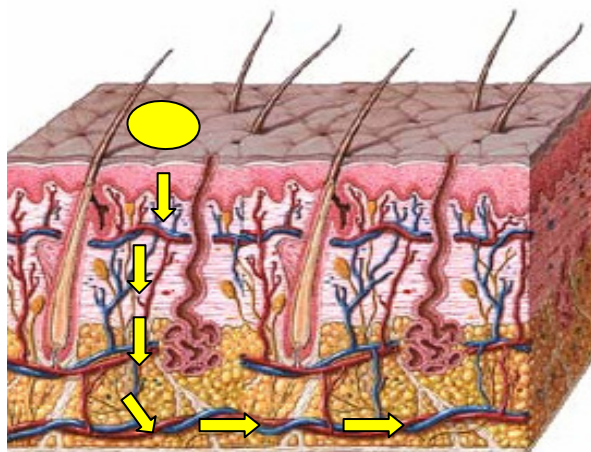


Fig. 3.4. Esquema de la piel

La superficie de la epidermis en contacto con la loción es del orden de 1 cm^2 . El volumen de loción aplicado fue de $10 \mu\text{l}$, ya que éste supone una masa de producto del orden del que habitualmente se aplican los usuarios de lociones solares. La loción solar aplicada contenía un 5% de PDT, que es la mitad del máximo autorizado por la legislación Europea.

El fluido receptor, descrito en el apartado 3.3.3, fue una disolución acuosa tamponada debido a la naturaleza hidrofílica del PDT; además, debe ser semejante a la sangre en cuanto a pH y a fuerza iónica.

3.3.2. Estudio de la integridad de la epidermis. Determinación del marcador rojo de fenol (RF) en muestras de líquido receptor

Es necesario asegurar que la piel durante su preparación o durante el proceso del estudio de la difusión no ha sufrido ninguna rotura o grieta.

Para evaluar la integridad de la celda se introdujo rojo de fenol en la loción solar como marcador. Es posible que esta molécula penetre a través de la epidermis, a nivel de trazas, pero en el caso de que la epidermis presentase una rotura significativa, el indicador pasaría en cantidad apreciable al receptor, dando una tonalidad rosada al compartimento. En

este caso la celda sería desechada. No obstante, el análisis visual no es suficiente ya que la epidermis puede presentar diminutos orificios donde antes se situaba el vello o puede tener microroturas que permitirían el paso de rojo de fenol, pero de manera no apreciable para el ojo humano, y que causarían errores por exceso en la determinación de la absorción percutánea.

Por ello, se diseñó un método analítico suficientemente sensible para discriminar aquellas celdas que no presentaban una integridad adecuada para realizar los estudios de permeabilidad cutánea.

En la práctica, la toma de muestra de todas las celdas se realiza con normalidad, y al terminar el experimento se determina la cantidad de rojo de fenol en el líquido receptor restante. El criterio utilizado fue considerar como no válidas las celdas en la que la cantidad de rojo de fenol en el líquido receptor fuese superior al 10 % de la cantidad contenida en la formulación aplicada.

Para la determinación del rojo de fenol se utilizó un sistema de análisis por inyección secuencial (SIA) que permite realizar un proceso de extracción en fase sólida (EFS) y posterior medida mediante espectrofotometría UV/vis de forma automatizada, tal y como se muestra en la figura 3.5. En todos los ensayos realizados, la microcolumna de EFS se acondicionó previamente a cada sesión de trabajo propulsando 0,250 ml de etanol (EtOH) y posteriormente 1 ml de agua.

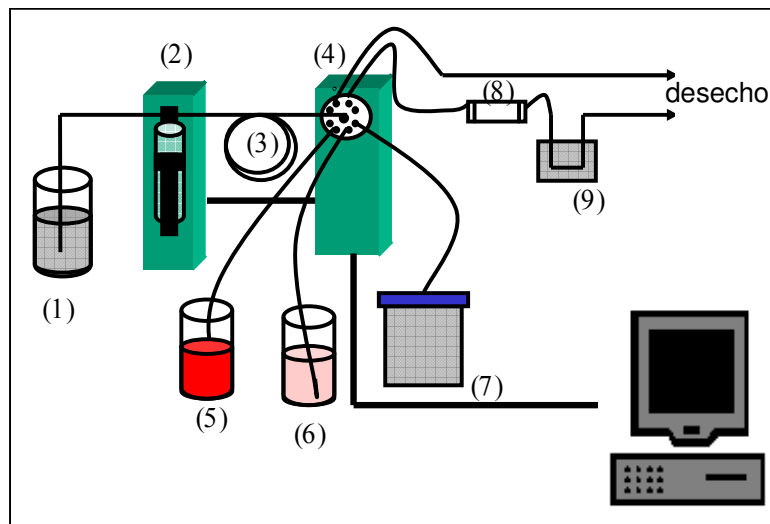


Fig. 3.5. Sistema SIA empleado en la determinación de RF: 1. Portador. 2. Bureta automática provista de una jeringa de 5 ml. 3. Bucle de almacenamiento de 2,5 ml. 4. Válvula de 8 vías. 5. Patrón de RF. 6. Muestra de líquido receptor. 7. Eluyente. 8. Microcolumna C18. 9. Celda de detección en flujo acoplada al espectrofotómetro UV/vis

3.3.2.1. Estudio de las condiciones experimentales para la determinación del marcador RF

Como se ha mencionado anteriormente, la determinación de RF se realiza para garantizar que la epidermis se encuentra en buen estado y asegurar el sellado correcto de la celda. Con los niveles de concentración establecidos como límite permitido se hace necesario disponer de un método de gran sensibilidad.

Estudio del pH de detección

El RF se encuentra en el líquido receptor a pH 7,4. En estas condiciones presenta una coloración roja, no obstante, su absorbividad se ve fuertemente incrementada a valores de pH superiores a 8, adquiriendo un color violeta. Por este motivo se decidió utilizar como disolución portadora una disolución tampón fosfato de pH 9 y de 10 g l⁻¹ (concentración equivalente en fosfatos a la del líquido receptor).

Con el sistema de análisis por inyección secuencial propuesto se consigue una preconcentración en la microcolumna con relleno C18.

El RF se retiene a pH=7,4, ya que permanece en la microcolumna conservando su coloración roja, hasta que paulatinamente, mientras va pasando el portador (pH 9), se produce el cambio de color de la molécula a violeta.

Con el sistema propuesto se realiza el cambio de pH, la limpieza y la preconcentración de la muestra de forma automática, sin dispersión aparente de la muestra en la microcolumna y sin necesidad de haber realizado ninguna dilución, consiguiéndose así una gran sensibilidad.

Estudio de la composición del eluyente

En el estudio de la composición del disolvente para la elución del RF se estudiaron diferentes proporciones de portador y EtOH. Los ensayos se realizaron empleando 300 μl de una disolución tampón fosfato (10 g l^{-1} , pH=7,4) de $4 \mu\text{g ml}^{-1}$ de RF. Se utilizó un volumen de elución de 1 ml en todos los casos. Después de realizar la elución se aplicó una etapa de lavado de 1 ml de EtOH a fin de observar posibles restos no eluidos de RF. Los resultados se presentan en la figura 3.6.

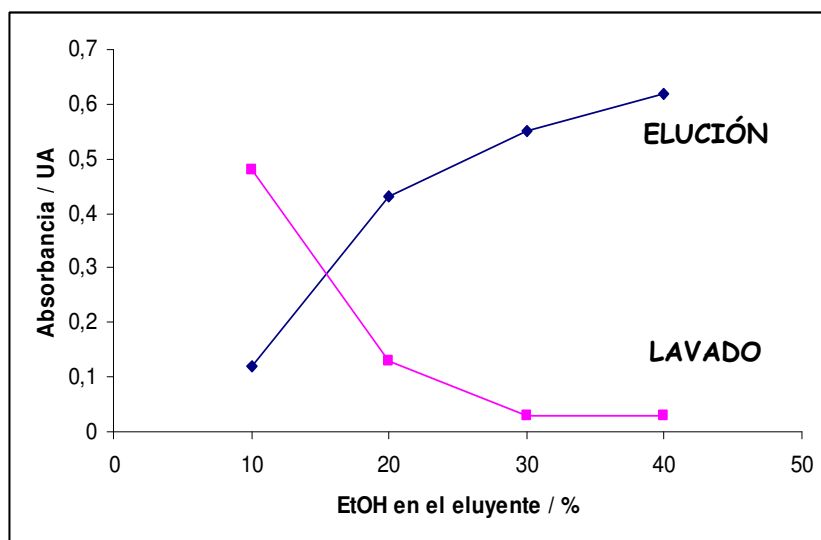


Fig. 3.6. Determinación de RF. Estudio del porcentaje de EtOH en el eluyente

Se escogió un porcentaje de EtOH del 30%. A partir de este valor la elución es total ya que no se observan restos de RF en la etapa posterior de lavado.

Estudio del modo de calibración

Con el fin de aumentar el grado de automatización y rapidez de la determinación, se estudió la posibilidad de preparar el calibrado en línea empleando el sistema SIA. Se aspiraron para ello distintos volúmenes de una sola disolución patrón en tampón fosfato 10 g l^{-1} , $\text{pH}=7,4$, de $4 \mu\text{g ml}^{-1}$ de RF. Al pasar por la microcolumna se concentra, y se eluye con un volumen fijo de eluyente (1 ml). De este modo el calibrado puede realizarse en línea y preparando un solo patrón.

Esta forma de calibración se comparó con la calibración mediante preparación de los patrones fuera del sistema SIA (volumen de inyección de $300 \mu\text{l}$ de patrones de concentración creciente). Los resultados fueron los siguientes:

Calibrado externo:

$$\text{Absorbancia} = (0,247 \pm 0,003) \cdot \text{Masa} + (0,071 \pm 0,006); R^2=0,9997$$

(Masa expresada en μg de RF)

Calibrado en línea:

$$\text{Absorbancia} = (0,231 \pm 0,005) \cdot \text{Masa} + (0,051 \pm 0,007); R^2=0,9994$$

(Masa expresada en μg de RF)

Tanto la ordenada en el origen como la pendiente son estadísticamente comparables para un nivel de confianza del 95% según el test descrito en el Apéndice II.4, ya que la t_{cal} para la comparación de las pendientes es 2,10, y la t_{cal} para la comparación de las ordenadas es 2,62, siendo ambos valores menores a la t_{crit} tabulada que es 2,78 para 4 puntos experimentales de cada calibrado.

Por tanto, se escogió la modalidad en línea por presentar un mayor grado de automatización y una mayor velocidad en la determinación.

Estudio de las variables SIA

Por otro lado, se estudió el volumen de inyección y se observó que introducir volúmenes inferiores a 50 μl y superiores a 1 ml no conducía a valores reproducibles (al aspirar más de 1 ml se crea un vacío excesivo que favorece la entrada de burbujas de aire al sistema).

La longitud del tubo desde la microcolumna al detector fue la mínima necesaria para la conexión.

Se trabajó a la velocidad mínima de la jeringa automática para evitar la entrada de burbujas al sistema y para evitar presiones excesivas debidas a la microcolumna; el caudal así generado fue 3,6 ml min^{-1} .

3.3.2.2. Método analítico propuesto para la determinación del marcador RF

En base a los estudios precedentes, se recomienda el siguiente procedimiento experimental para la determinación del RF en el líquido receptor de la celda de difusión:

Utilizar el sistema descrito en la figura 3.5.

Como portador utilizar una disolución tampón fosfato de 10 g l^{-1} , de pH 9, y como eluyente una disolución de EtOH:tampón fosfato 10 g l^{-1} pH=9, 30:70 (v/v).

Utilizar una disolución de rojo de fenol de 4 $\mu\text{g ml}^{-1}$ preparada en tampón fosfato 10 g l^{-1} de pH 7,4 (el mismo pH que las muestras de líquido receptor) como disolución patrón.

Aspirar directamente en el sistema SIA las muestras de líquido receptor. Trabajar a la velocidad mínima con un caudal de propulsión de 3,6 ml min^{-1} . El ciclo de aspiración / propulsión es el siguiente:

- 1. Aspiración de 2 ml de portador.**
- 2. Aspiración del volumen correspondiente de muestra (1 ml) o disolución patrón (50-250 μl) al interior del bucle de almacenamiento.**
- 3. Propulsión del bolo de muestra o disolución patrón desde el bucle de almacenamiento hacia el detector, a través de la microcolumna.**
- 4. Aspiración de 2 ml de portador.**
- 5. Aspiración de 1 ml de disolución de eluyente.**

6. Propulsión de 3 ml a través de la microcolumna hacia el detector.

Realizar el ciclo por triplicado para cada disolución de medida.

Realizar la medida de la absorbancia a una longitud de onda de 559 nm (corrección a 625 nm).

3.3.2.3. Parámetros analíticos del método

Estudio de la exactitud

Con el fin de evaluar la exactitud del método se estudiaron las posibles interferencias debidas a la loción o a la piel en la determinación de RF. Se prepararon cuatro celdas de difusión y se depositaron 200 µl de loción solar exenta de RF. Tras 48 horas se recogieron los líquidos receptores y se mezclaron. A partir de esta disolución (exenta de RF) se preparó una adición estándar de RF. Esta recta de calibración se comparó con la obtenida en línea con una única disolución de RF.

Los datos de las rectas son los siguientes:

Calibrado normal en línea:

$$\text{Absorbancia} = (0,42 \pm 0,01) \cdot \text{Masa} + (0,016 \pm 0,007); R^2 = 0,9987$$

(masa expresada en µg de RF)

Calibrado adición estándar:

$$\text{Absorbancia} = (0,44 \pm 0,01) \cdot \text{Masa} + (0,039 \pm 0,009); R^2 = 0,9989$$

(masa expresada en µg de RF)

Las rectas se compararon estadísticamente utilizando el test descrito en el Apéndice II.4. Las pendientes son estadísticamente comparables para un nivel de confianza del 95% y cuatro puntos experimentales para cada calibrado (t_{cal} es 1,95, t_{crit} es 2,78). Por tanto, no existen errores proporcionales. Las ordenadas son igualmente comparables ($t_{\text{cal}} = 1,31$).

Puesto que en este experimento la muestra utilizada en la adición estándar no contenía RF, estos resultados prueban que no existen errores constantes debidos a la piel, a la loción o al líquido receptor.

Por tanto, el método propuesto proporciona resultados estadísticamente exactos. Hay que destacar que las condiciones finales de trabajo de las

celdas no fueron tan extremas como las ensayadas en la validación de la exactitud. Finalmente, sólo se introducen 10 µl de loción y el experimento concluye a las 24 horas, por tanto la exactitud en estas condiciones se presupone todavía con más garantías.

Precisión

Con el fin de estimar la precisión en la determinación del RF, se prepararon tres disoluciones de RF en el fluido receptor de concentración cercana al límite máximo tolerable en las celdas de difusión (según el criterio empleado en este trabajo, el 10% de la dosis aplicada inicialmente), se analizaron y se obtuvo una desviación estándar relativa de los resultados del 9%.

Parámetros instrumentales

Los coeficientes de variación de la señal analítica están comprendidos entre 0,6–6 %, en función de la masa introducida.

La velocidad de muestreo es de 20 ciclos h⁻¹.

Parámetros de calibración

En la tabla 3.1 se indican los parámetros de calibración del método, así como una recta de calibración representativa.

Tabla 3.1. Parámetros de calibración obtenidos en la determinación de RF

Intervalo lineal	< 2 µg RF
Intervalo de trabajo	< 2 µg RF
Recta de calibración	Abs = (-0,008±0,005) + (0,463±0,004).Masa (Masa en µg)
R ²	0,9994
Sensibilidad (b±s _b)	0,463 ±0,004 UA* µg ⁻¹
LD (3.s _{y/x} /b)	0,02 µg ≡ 0,02 µg ml ⁻¹ (V _{iny} = 1 ml)

* UA: Unidades de absorbancia.

Los parámetros analíticos son apropiados para el problema analítico planteado.

Como se ha indicado en el apartado 3.3.2, el criterio utilizado para rechazar las celdas de difusión es que se encuentren cantidades superiores al 10 % de RF en el líquido receptor a las 24 horas. Si la loción utilizada contiene un 0,05 % de RF y se aplican 10 μ l, se están introduciendo en la celda 5 μ g de RF. El compartimento receptor tiene un volumen de 6 ml. Esto implica que sólo serán válidas las celdas en las que se encuentre una concentración de RF inferior a 83 ng ml^{-1} . Este nivel de concentración es superior al límite de detección del método propuesto para la determinación del marcador y, por tanto, es apto para el control requerido en estos montajes *in vitro*.

3.3.3. Estudio de la absorción percutánea de PDT

Para resolver el problema analítico de la estimación de la absorción percutánea de PDT *in vitro* mediante su determinación en el líquido receptor de la celda de difusión, se ensayó la posibilidad de utilizar un procedimiento ya desarrollado en nuestro grupo de investigación (Salvador y Chisvert, 2005a) para la determinación de filtros UV en productos cosméticos.

Este método está basado en una cromatografía líquida en fase reversa con detección espectrofotométrica UV/vis y empleando disolventes inocuos para el operador y para el medio ambiente. Este método permite determinar 18 filtros UV autorizados y empleados en la actualidad en Europa, incluido el PDT. Sin embargo, no resulta apropiado para el análisis de fluido receptor, ya que su límite de determinación para la medida de PDT es superior al necesario en ensayos de permeabilidad cutánea.

Por tanto, se propone la cromatografía líquida con detección fluorimétrica, más sensible.

3.3.3.1. Estudio de las condiciones experimentales en la determinación de PDT

Selección de las longitudes de onda

En la figura 3.7 se muestran los espectros de excitación y de emisión del PDT en la fase móvil finalmente utilizada (EtOH:tampón fosfato 0,1 g l^{-1} pH=7,4 (20:80, v/v)).

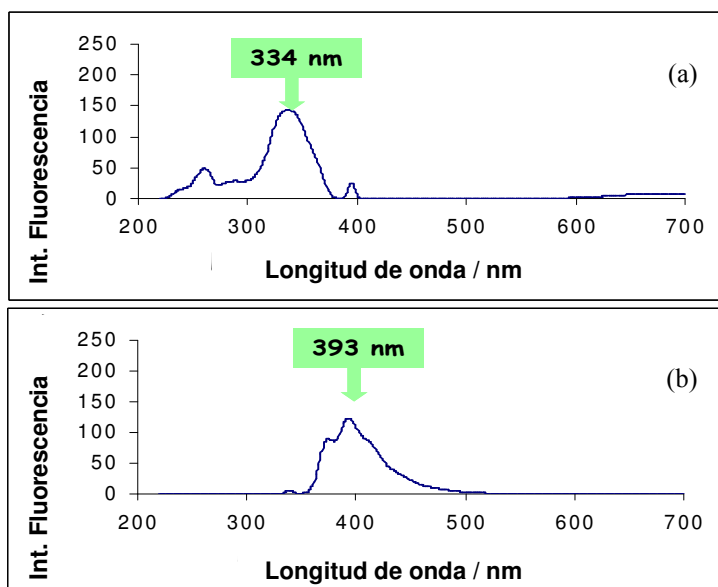


Fig. 3.7. Espectros de (a) excitación ($\lambda_{em}=393$ nm) y (b) de emisión ($\lambda_{exc}=334$ nm) de una disolución de 300 ng ml^{-1} de PDT en la fase móvil (EtOH:tampón fosfato $0,1 \text{ g l}^{-1}$ pH=7,4 (20:80, v/v)); intensidad media; rendijas 10 nm

Se seleccionó la longitud de onda de excitación de 334 nm y la de emisión de 393 nm por proporcionar la máxima intensidad de fluorescencia.

Estudio de la fase móvil

Se realizaron estudios preliminares empleando como fase móvil tampón fosfato 10 g l^{-1} , pH=7,4, semejante a la utilizada como líquido receptor en las celdas de difusión, pero se obtuvieron picos muy anchos (aproximadamente 3 min) y con un hombro en la parte final del pico.

Se estudió la adición de diferentes porcentajes de EtOH a la fase móvil. Los resultados se muestran en la figura 3.8.

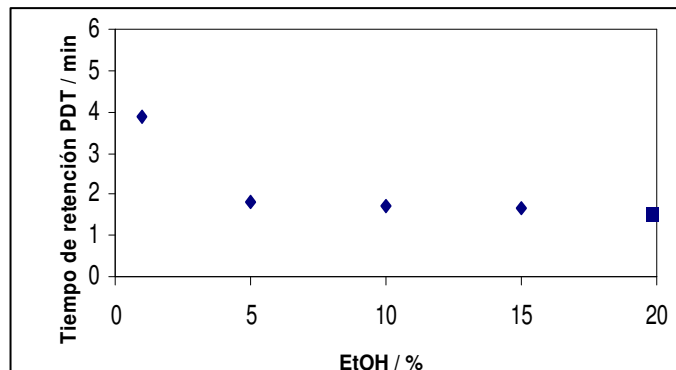


Fig.3.8. Efecto del porcentaje de EtOH en la fase móvil en el tiempo de retención del PDT

Utilizando porcentajes bajos de EtOH en la fase móvil se conseguía un perfil del pico más estrecho (anchura de pico, 1 min), pero no se eliminaba el hombro. Se estudió la concentración del tampón y se observó que a concentraciones más bajas desaparecía el hombro; por lo que se escogió una concentración de tampón fosfato de 0,1 g l⁻¹.

Finalmente, se optó por utilizar un porcentaje de EtOH del 20 % para conseguir eluir otras posibles moléculas presentes en la muestra procedentes de la piel o de la loción que, aun no siendo fluorescentes pudieran ir ensuciando la columna en cada inyección.

Estudio del caudal de fase móvil

Se ensayaron caudales de fase móvil de 0,5, 1 y 1,5 ml min⁻¹. Se seleccionó el flujo de 0,5 ml min⁻¹ ya que proporcionaba una señal mayor para el analito (ver figura 3.9).

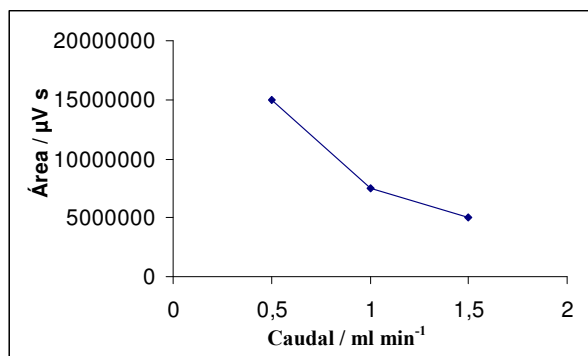


Fig.3.9. Efecto del caudal sobre la señal analítica del PDT

3.3.3.2. Método analítico propuesto para la determinación de la cantidad de PDT absorbida percutáneamente a través de piel humana

En base a los estudios precedentes, se recomienda el siguiente procedimiento experimental:

Preparar la piel y la celda de difusión tal y como se describe en los apartados 3.2.4. y 3.2.5.

Aplicar un volumen de 10 μl de loción solar a estudiar sobre la piel, en el compartimento dador y mantener la celda a 37 °C y en oscuridad.

Extraer 20 μl de líquido receptor, introducir en un vial y diluir con fase móvil (dilución mínima 1:49). Agitar y analizar por cromatografía líquida con detección fluorimétrica, empleando disoluciones patrón de PDT (conteniendo entre 5 y 50 ng ml^{-1}) en la fase móvil.

Emplear como fase móvil una mezcla de EtOH:tampón fosfato 0,1 g l^{-1} , pH=7,4 (20:80, v/v).

Utilizar los siguientes parámetros instrumentales:

Columna C18, caudal 0,5 ml min^{-1} , longitud de onda de excitación 334 nm, longitud de onda de emisión 393 nm, potencia media y rendijas de emisión y de excitación 15 nm.

Cada muestra se inyecta por triplicado.

Los valores obtenidos en la determinación de PDT para cada uno de los tiempos estudiados fueron corregidos, teniendo en cuenta las cantidades ya extraídas en anteriores tomas de muestra.

3.3.3.3. Parámetros analíticos en la determinación de PDT

Estudio de la exactitud

Con el fin de estimar la exactitud del método, se realizaron los estudios necesarios para asegurar la ausencia de interferencias procedentes de restos de la piel, de la loción o del fluido receptor.

Para ello, se preparó una loción solar exenta de PDT equivalente a la utilizada en los ensayos de permeabilidad cutánea. Se adicionaron 200 μl de esta loción en cuatro celdas de difusión, se mantuvieron en funcionamiento (agitación constante, oscuridad y 37 °C) durante 48 horas y se recogieron los distintos líquidos receptores; tras comprobar que las

celdas de difusión habían mantenido su integridad mediante el ensayo de determinación de RF (ver apartado 3.3.2) se mezclaron los líquidos receptores para conseguir un fluido más representativo (blanco exento de PDT).

Se observó que la inyección directa del líquido receptor proporcionaba errores constantes. Por ello, se estudió la posibilidad de corregir estos errores mediante dilución de las muestras. Se procedió a la dilución del receptor (blanco exento de PDT) en diferentes proporciones (desde dilución 1:4 hasta 1:99) para la obtención de una señal equivalente a la generada por la propia fase móvil. Los resultados se muestran en la figura 3.10.

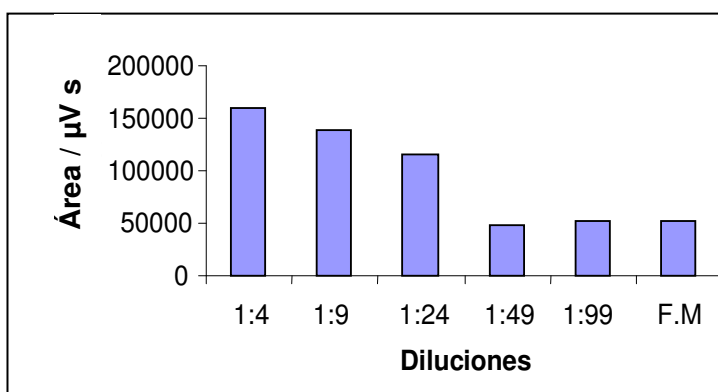


Fig.3.10. Efecto de la dilución en la señal del blanco

Diluciones del blanco de líquido receptor en fase móvil iguales o superiores a 1:49 permitían que la señal fuese comparable a inyectar fase móvil pura, corrigiendo así las interferencias constantes.

Para la estimación de las posibles interferencias proporcionales, se preparó un calibrado de adición estándar tomando 0,2 ml de receptor (blanco exento de PDT), al que se adicionó cantidades variables de disolución patrón de PDT en fase móvil, y diluyéndose a un volumen final de 10 ml (dilución final 1:49).

La recta de calibración de adición estándar se comparó con la obtenida mediante disoluciones patrón de PDT en fase móvil. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Calibrado fase móvil:

Área= (53200±500). Concentración + (13000±12000); $R^2=0,9998$

(concentración de expresada en ng ml^{-1} y el área en $\mu\text{V s}$)

Adición estándar:

Área= (52900±500). Concentración + (27000±12000); $R^2=0,9997$

(concentración de PDT expresada en ng ml^{-1} y el área en $\mu\text{V s}$)

Las rectas se compararon estadísticamente utilizando el test descrito en el Apéndice II.4. Las pendientes fueron estadísticamente comparables para un nivel de confianza del 95% y cuatro puntos experimentales para cada calibrado (t_{cal} fue 0,81, t_{crit} fue 2,78). Por tanto, se demuestra que no existen errores proporcionales. Las ordenadas fueron igualmente comparables ($t_{\text{cal}}= 0,49$).

Puesto que en este experimento la muestra utilizada en la adición estándar no contenía PDT, estos resultados indican que no existen errores constantes debidos a la piel, a la loción o al líquido receptor. Por tanto, se puede afirmar que el método propuesto proporciona resultados estadísticamente exactos.

Hay que destacar que las condiciones finales de trabajo de las celdas fueron menos drásticas, ya que finalmente sólo se introducen 10 μl de loción y el experimento concluye a las 24 horas; por tanto, la exactitud en estas condiciones se presupone todavía con más garantías.

Precisión

La precisión obtenida para el análisis de muestras reales de líquido receptor fue de 1–4 %.

Parámetros cromatográficos

El coeficiente de variación del área es del orden del 0,4 % (5 lecturas).

El tiempo de retención del PDT es de $1,224\pm 0,003$ min (5 lecturas).

Parámetros de calibración

En la tabla 3.2 se indican los parámetros de calibración del método.

Tabla 3.2. Parámetros de calibración obtenidos en la determinación de PDT

Intervalo lineal	< 420 ng ml ⁻¹
Intervalo de trabajo	De 10 a 400 ng ml ⁻¹
Recta de calibración	Área= (5,32 10 ⁺⁴ ± 0,05 10 ⁺⁴). Concentración + (1,3 10 ⁺⁴ ± 1,2 10 ⁺⁴) (Concentración expresada en ng ml ⁻¹ y área en μV s)
R ²	0,9998
Sensibilidad (b±s _b)	5,32 10 ⁺⁴ ± 0,05 10 ⁺⁴ μV s ml ng ⁻¹
LD (3.s _{y/x} /b)	1 ng ml ⁻¹

El método permite detectar niveles de concentración de 1 ng ml⁻¹, lo que utilizando una dilución 1:49 supone detectar niveles de 50 ng ml⁻¹ en muestras reales de líquido receptor. Los parámetros analíticos son, por tanto, apropiados para el problema analítico planteado.

3.3.3.4. Aplicación del método propuesto al estudio de la absorción percutánea de PDT a través de piel humana

Se estudió la absorción percutánea del PDT empleando tres celdas de difusión y se determinó la concentración del marcador RF a las 24 horas en las tres celdas. No se obtuvieron valores detectables en ninguna de las tres celdas; por tanto, quedó comprobada la integridad de la epidermis durante el experimento.

En la tabla 3.3 se muestran las concentraciones encontradas en las tres celdas a las 2 horas, a las 22 horas y a las 24 horas, así como el porcentaje de absorción a las 24 horas.

Tabla 3.3. Resultados obtenidos en el análisis de tres celdas de difusión aplicando el método propuesto

Tiempo	Celda 1		Celda 2		Celda 3	
	C±s / ng ml ⁻¹	CV / %	C±s / ng ml ⁻¹	CV / %	C±s / ng ml ⁻¹	CV / %
2 h	73±3	4	63±1	2	No detectado	-
	Concentración media (2 h) = 68±7 ng ml ⁻¹ (CV=10)					
22 h	451±8	2	1220±20	2	900±10	1
	Concentración media (22 h) = 900±400 ng ml ⁻¹ (CV=50)					
24 h	448±9	2	1290±30	2	880±10	1
	Concentración media (24 h) = 900±400 ng ml ⁻¹ (CV=50)					
Tiempo	Celda 1		Celda 2		Celda 3	
	A±s / %	CV / %	A±s / %	CV / %	A±s / %	CV / %
24 h	0,44±0,01	2	1,51±0,04	3	0,98±0,01	1
	Absorción media (24 h) = 1,0±0,5 % (CV =50)					

C es la concentración media (análisis realizados por triplicado) obtenida en el líquido receptor en los intervalos de tiempo estudiados.

s es la desviación estándar de los resultados.

A es el porcentaje de absorción percutánea estimado a partir de la cantidad de PDT aplicada (alrededor de 0,5 mg); el volumen de líquido de las celdas fue de 6 ml.

CV es el coeficiente de variación de los resultados.

La precisión obtenida para cada celda es elevada (CV 1–4 %), mientras que, evidentemente, se aprecian diferencias entre los distintos trozos de piel humana utilizados en los ensayos. Por ello, los resultados numéricos deben ser tomados únicamente como preliminares, ya que para obtener un valor estadísticamente significativo de la absorción percutánea debería aplicarse el método a un elevado número de pieles de diferentes sujetos y también realizar ensayos del posible efecto del vehículo en el que se encuentra el PDT sobre la permeabilidad. Sin embargo, aun siendo preliminares, se pueden extraer conclusiones tales como:

-A partir de 22 h no se produce incremento en la concentración del líquido receptor, lo que significa que ya no hay absorción considerable.

-La máxima absorción obtenida a 24 h es 1,5%, siendo la media 1,0±0,5%.

Si se comparan estos valores con los resultados obtenidos en el capítulo 2 correspondiente al estudio de la excreción urinaria de PDT empleando la misma loción, y teniendo en cuenta que allí se obtenía una excreción del orden del 0,007 % a las 35 horas de la aplicación de la loción, se puede concluir que se excreta por vía urinaria del orden del 0,7 % de la cantidad absorbida percutáneamente.

3.4. CONCLUSIONES

El método propuesto permite conocer el grado de penetración cutánea de PDT en lociones solares sin interferencias, empleando un sistema de simulación *in vitro*.

Los parámetros de sensibilidad, límite de detección y precisión en la determinación son apropiados para los niveles de concentración encontrados en el líquido receptor.

El procedimiento propuesto para la evaluación de la integridad de las celdas de difusión mediante la determinación del marcador RF es un método general que podría ser aplicado en otros estudios basados en el uso de celdas de difusión.

Los métodos propuestos en los Capítulos 2 y 3 de esta Memoria tienen una gran utilidad para su posible aplicación en estudios farmacocinéticos, con el fin de elaborar conclusiones estadísticamente significativas acerca de los procesos de absorción/excreción de los filtros solares, en particular el PDT, en el cuerpo humano. Estas conclusiones permitirán mantener en el mercado del sector cosmético las formulaciones solares conteniendo aquellos filtros solares que presenten poca absorción percutánea y una rápida eliminación del organismo. Además, ayudarán a sustituir los demás filtros por nuevos compuestos que proporcionen similar protección solar, pero con menor penetrabilidad y permanencia en el organismo, contribuyendo de esta forma a una progresiva mejora de la seguridad de las formulaciones solares.

Capítulo 4

**Desarrollo de un método analítico para la
determinación de polietilen glicol 25
p-aminobenzoato en orina humana mediante
extracción en fase sólida y cromatografía líquida de
exclusión molecular con detección fluorimétrica.
Estudio de la excreción urinaria de voluntarios
después de la aplicación tópica**

El contenido de este capítulo ha sido publicado en *Analytica Chimica Acta*
(2008) 611: 220-225

4.1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO DEL TRABAJO

El ingrediente cosmético conocido como ácido p-aminobenzóico (PABA) ha sido ampliamente utilizado como filtro UV en los productos cosméticos para la protección solar durante muchos años. Se trata de un compuesto hidrosoluble especialmente útil para la protección solar en el intervalo UVB (290–320 nm). No obstante, se han descrito algunas reacciones alérgicas cutáneas en personas sensibles a esta sustancia (Schauder y Ippen, 1997; Darvay et al., 2001; Uter et al., 2002; Tornero et al., 2004) y, además, produce manchas en la ropa. El contenido máximo autorizado de este compuesto en los productos cosméticos depende de cada legislación (en este momento en la Unión Europea (UE) es el 5%).

Debido a los inconvenientes que presenta el PABA se han propuesto diferentes derivados para su uso como filtros UV, tales como los ésteres formados por reacción del PABA con alcoholes de cadena larga. Un ejemplo es el polietilén glicol 25 p-aminobenzoato (PEG-25 PABA) (ver figura 4.1), el cual no causa irritación cutánea ni tampoco produce manchas en la ropa. La cantidad máxima autorizada en la UE para el PEG-25 PABA es el doble que para el PABA.

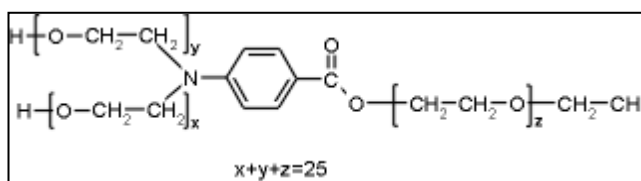


Fig. 4.1. Estructura molecular del PEG-25 PABA

A diferencia que para otros filtros UV, no se han encontrado datos en la bibliografía referentes a la cinética de absorción percutánea del PEG-25 PABA o sobre los niveles de excreción urinaria tras la aplicación tópica de productos solares en humanos. No obstante, merece especial mención un artículo en el que se estudia la permanencia de los filtros UV PEG-25 PABA y benzofenona-4 sobre la piel mediante la técnica *tape-stripping* (Couteau et al., 2001), descrita en el Apartado 1.3.1.

El objetivo del presente trabajo es el desarrollo de un método analítico selectivo y sensible que permita determinar trazas de PEG-25 PABA en muestras de orina, con el fin de estudiar el proceso de excreción por el cuerpo humano después de la aplicación tópica de un producto cosmético conteniendo este filtro UV. El método propuesto se basa en una etapa de extracción en fase sólida (EFS) seguida de una separación por

cromatografía líquida de exclusión molecular y posterior detección fluorimétrica.

4.2. PARTE EXPERIMENTAL

4.2.1. Metodología experimental

Debido a los bajos valores de concentración de PEG-25 PABA esperados en la orina y a la gran cantidad de sustancias potencialmente interferentes presentes en la matriz, se recomienda una etapa de EFS con el fin de realizar una preconcentración y una limpieza previa a su determinación. En una primera etapa se estudió el comportamiento del PEG-25 PABA en diferentes sorbentes así como los disolventes de lavado y de elución.

Posteriormente se estudió la separación, mediante cromatografía líquida, del PEG-25 PABA del resto de interferentes todavía existentes tras la etapa de EFS. Después de la optimización del procedimiento cromatográfico, el método se aplicó al análisis de muestras de orina (de cuatro voluntarios) libres de PEG-25 PABA, fortificadas a diferentes niveles de concentración.

Finalmente, con el fin de obtener las curvas de excreción urinaria, el porcentaje excretado y el tiempo necesario para la completa excreción por vía urinaria del PEG-25 PABA, tres voluntarios se aplicaron una crema solar conteniendo una cantidad conocida de PEG-25 PABA y se estudiaron sus cinéticas de excreción urinaria hasta que no se detectó el analito en orina.

4.2.2. Aparatos y material

Las muestras de orina se filtraron mediante una placa porosa de vidrio (tamaño de poro 10–16 μm) de Schott Duran (Mainz, Alemania) empleando una bomba de vacío N86KT.18 de KNF Laboport (Trenton, NJ, USA).

Para la EFS de las muestras de orina se usaron microcolumnas de 1 ml Bond Elut con 100 mg de relleno de sílice (Si) de Varian (Lake Forest, CA, USA).

Para la determinación de PEG-25 PABA se empleó un sistema de cromatografía líquida equipado con una bomba isocrática 515 de Waters (Eschborn, Alemania), un inyector automático AS100 de Termo (Allschwil, Suiza) y un detector de fluorescencia serie 200 de Perkin Elmer (Norwalk CT, USA).

Para la separación cromatográfica se empleó una columna de exclusión molecular PLGel Mixed-D (30 cm x 7,5 mm diámetro interno y 5 μm de tamaño de partícula) y una precolumna PLGel Guard (5 cm x 7,5 mm diámetro interno y 5 μm de tamaño de partícula), ambas de Polymer Laboratories (Church Stretton, Reino Unido).

Para los estudios preliminares se emplearon un espectrofluorímetro F4500 de Hitachi (Tokio, Japón) y un espectrofotómetro UV/vis de Agilent (Madrid).

4.2.3. Reactivos y muestras

Como patrón se usó PEG-25 PABA ($R > 99\%$) proporcionado por Basf Española S.A. (Barcelona).

Se emplearon los siguientes reactivos: N,N-Dimetilformamida (DMF) y etanol (EtOH) grado HPLC de Scharlab Chemie S.A. (Barcelona), dihidrógeno fosfato sódico monohidratado de Merck (Darmstadt, Alemania), hidróxido sódico de Scharlau Chemie S.A. (Barcelona) y agua desionizada.

Se preparó una crema solar según un protocolo de fabricación de cosméticos proporcionado por la empresa Guinama (Alboraya) (ver Apéndice III.2) conteniendo un 8% de PEG-25 PABA, cuyos ingredientes, a excepción del PEG-25 PABA, fueron adquiridos en la misma empresa.

Se recogieron muestras de orina de tres voluntarios que previamente se aplicaron aproximadamente 2 mg cm^{-2} del producto solar en los brazos, piernas y parte superior de la espalda. Se controló su excreción urinaria desde el momento de su aplicación hasta que la concentración de PEG-25 PABA en orina fue no detectable.

Para realizar el estudio de exactitud se tomaron ocho muestras de orina exentas de PEG-25 PABA de cuatro voluntarios y fueron fortificadas antes de su análisis con diferentes concentraciones (11 a 100 ng ml^{-1}) de PEG-25 PABA.

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1. Elección de las condiciones de retención/elución en el proceso de extracción en fase sólida

Se estudiaron los siguientes sorbentes (100 mg) para realizar la EFS: octadecil (C18), aminopropil (NH₂), trimetil aminopropil (SAX), ácido propilsulfónico (PRS), sílice (Si) y carbón activo (C).

Los experimentos se llevaron a cabo mediante el siguiente procedimiento: Se preparó una disolución patrón de PEG-25 PABA (65 µg ml⁻¹) en tampón fosfato (10 g l⁻¹) a pH 6 (por semejanza con el pH de la orina). Se pasaron 2 ml de dicha disolución de PEG-25 PABA a través de cada sorbente en estudio y se midió la absorbancia de la fracción no eluida a la longitud de onda correspondiente al máximo de absorción del PEG-25 PABA (308 nm).

Los sorbentes en C18, SAX y NH₂ retuvieron menos del 50 % del total de PEG-25 PABA, mientras que empleando los rellenos C, PRS y Si se obtuvieron retenciones cuantitativas.

Se realizó un nuevo estudio para seleccionar el disolvente de elución más adecuado para los tres sorbentes que presentaron una retención cuantitativa. Se hicieron pasar 2 ml de la disolución de PEG-25 PABA antes mencionada (pH 6) por cada sorbente. Se aplicó una etapa de lavado con 10 ml de agua desionizada (no se observaron pérdidas de analito) y se secaron mediante el paso de aire. A continuación se hicieron pasar 2 ml de los disolventes en estudio a través de los distintos sorbentes y se midió la absorbancia de la fracción eluida a 308 nm. La elución del sorbente de C y del de Si se estudió empleando como disolventes EtOH, metanol, acetonitrilo y DMF. Ninguno ofreció buenos resultados para el sorbente de C, mientras que únicamente la DMF permitió la elución cuantitativa del PEG-25 PABA en el sorbente Si. Se pudo conseguir una elución cuantitativa del PEG-25 PABA del sorbente PRS empleando una disolución 0,25 M de hidróxido sódico.

Por tanto, solamente se consiguió la retención y elución cuantitativa del PEG-25 PABA empleando los rellenos Si o PRS. El uso de PRS presenta algunos inconvenientes adicionales comparado con el de Si, ya que el medio básico que se necesita en la etapa de elución acorta drásticamente la vida útil del relleno, además disminuye la señal fluorescente del analito y causa inestabilidad de la señal de fluorescencia (probablemente debida a

la degradación del éster por hidrólisis básica). Por tanto, se empleó el sorbente Si, con DMF como eluyente.

Se estudiaron las propiedades fluorescentes del PEG-25 PABA en DMF y se seleccionó una longitud de onda de excitación de 300 nm y una longitud de onda de emisión de 350 nm. El espectro de fluorescencia del PEG-25 PABA en DMF no presenta cambios significativos durante más de dos días a temperatura ambiente, lo que pone de manifiesto la estabilidad del analito en este medio.

Se realizaron diversos experimentos previos con el fin de comprobar el buen funcionamiento de la microcolumna de EFS y su validez para el problema analítico planteado. Se estudió el intervalo lineal que proporciona el procedimiento de extracción empleando disoluciones patrón de PEG-25 PABA (25–750 ng ml⁻¹) preparadas en una disolución tampón fosfato de 10 g l⁻¹ de pH 6. Se usó una sola microcolumna para todos los experimentos. Se hicieron pasar 25 ml de estas disoluciones patrón a través del cartucho Si, a continuación 10 ml de agua desionizada para lavar y así eliminar los restos de sales y, finalmente, 4 ml de DMF para eluir al PEG-25 PABA. La disolución eluida se recogió en un matraz aforado y se diluyó a 5 ml con DMF. Por último, se midió la fluorescencia de las disoluciones directamente, ya que las mezclas DMF/agua disminuyen la emisión radiante.

Como se puede apreciar en la figura 4.2, existe una buena linealidad sin pérdidas o acumulaciones de analito entre sucesivas extracciones.

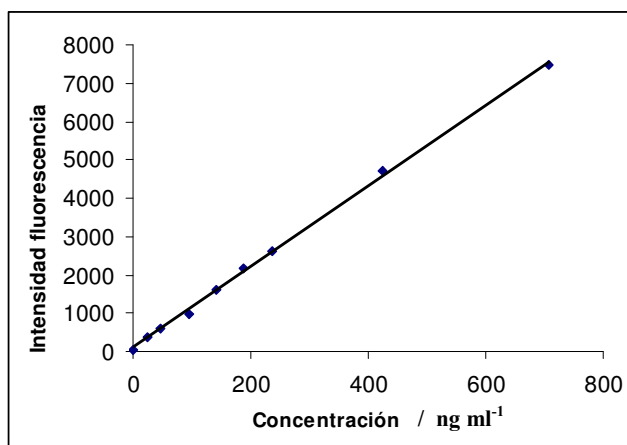


Fig. 4.2. Recta de regresión obtenida para el PEG-25 PABA por fluorescencia en régimen estático después de la etapa de EFS

La recta de regresión obtenida fue:

Int. fluorescencia= $(10,5 \pm 0,1) \cdot \text{Concentración} + (110 \pm 40)$ $R^2 = 0,9987$
(Concentración expresada en ng ml^{-1})

4.3.2. Detección de posibles errores debidos a la matriz de la orina

Con el fin de estudiar las interferencias causadas por la matriz de la orina se hizo pasar a través del cartucho Si 25 ml de orina humana, exenta de PEG-25 PABA (blanco), y se realizó el mismo procedimiento que con las disoluciones patrón.

Al medir la disolución eluida (en DMF) se observó una pequeña señal de fluorescencia, por tanto se estudió la posibilidad de aplicar una segunda etapa de lavado antes de la elución con DMF empleando 10 ml de los disolventes que presentaban bajo poder de elución del analito (agua, EtOH, metanol y acetonitrilo) según los experimentos realizados en el apartado 4.3.1. Ninguno de los disolventes estudiados permitió eluir las interferencias de la matriz de la orina y la señal de fluorescencia permaneció, impidiendo la determinación directa de PEG-25 PABA después de la etapa de EFS.

Para solucionar este problema se estudió la posibilidad de analizar los extractos obtenidos en la EFS por cromatografía líquida.

4.3.3. Elección de las condiciones de la separación cromatográfica

La separación cromatográfica del PEG-25 PABA de los interferentes de la matriz de la orina no se pudo conseguir utilizando una columna C18 con las fases móviles estudiadas (DMF pura y DMF/agua 90:10). No se estudiaron porcentajes mayores de agua en la fase móvil ya que la señal analítica disminuía drásticamente.

No obstante, como el PEG-25 PABA presenta un tamaño molecular mayor que muchos de los componentes de la orina, pero menor que otras macromoléculas, se estudió la posibilidad de llevar a cabo la separación cromatográfica empleando una columna analítica de exclusión molecular. De esta manera se consiguió una buena resolución cromatográfica empleando DMF como fase móvil.

Para estudiar el procedimiento cromatográfico, se pasaron a través del sistema de EFS 25 ml de una orina exenta de PEG-25 PABA, 10 ml de agua (etapa de lavado) y 4 ml de DMF (etapa de elución). La fracción eluida se recogió en un matraz aforado y se diluyó a 5 ml con DMF. Se inyectaron en el sistema cromatográfico 50 μl de esta disolución (blanco de PEG-25 PABA) y de una disolución patrón de PEG-25 PABA (160 ng ml^{-1}) en DMF (ver apartado 4.2.2). Se usó como fase móvil DMF. Se estudiaron caudales entre 0,5 y 2 ml min^{-1} y se seleccionó un caudal de 2 ml min^{-1} ya que se obtenían menores tiempos de retención y de anchura de pico, manteniendo la presión en valores no excesivamente elevados (2500 psi).

En la figura 4.3 se muestran los cromatogramas obtenidos para la disolución patrón (línea superior) y para la muestra de orina blanco (línea inferior) después de haber realizado la etapa de EFS.

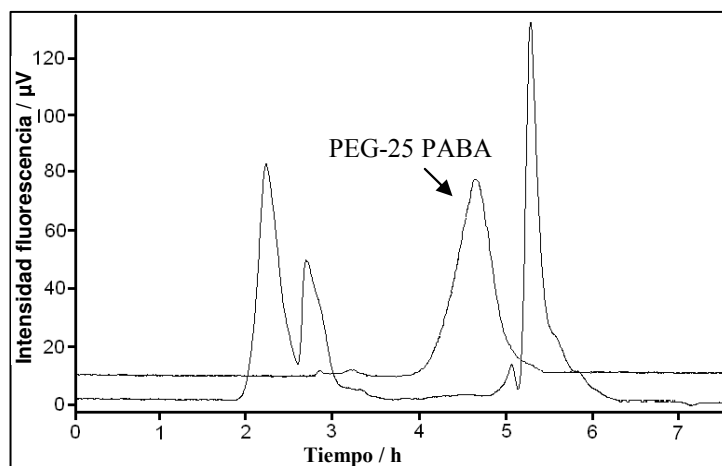


Fig. 4.3. Cromatogramas correspondientes a la inyección de la disolución patrón (160 ng ml^{-1}) (línea superior) y al blanco (orina exenta de PEG-25 PABA línea inferior) después de la extracción en fase sólida

Como se puede observar en la figura 4.3, el tiempo de retención del PEG-25 PABA es aproximadamente 4,5 min y existe una buena resolución cromatográfica respecto a los picos correspondientes a la matriz, a excepción de un pequeño pico que aparece a 5,05 min, cuya contribución puede ser eliminada si se emplea como señal analítica la altura del pico del PEG-25 PABA en lugar de su área.

El perfil cromatográfico de todas las orinas estudiadas fue muy similar, por lo que estas condiciones se consideraron adecuadas para cualquier muestra de orina.

4.3.4. Estudio de la estabilidad de las muestras de orina con el tiempo

Debido a las especiales características de las muestras biológicas, es necesario realizar estudios inter-día de los resultados obtenidos, no sólo para evaluar la reproducibilidad del método analítico, sino también para evaluar la posible degradación de la muestra.

Para ello, se preparó una orina fortificada con 150 ng ml^{-1} de PEG-25 PABA y se separó en dos fracciones. Una de estas fracciones se almacenó a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ en la oscuridad y la otra en nevera a $7 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Ambas se analizaron durante los tres días siguientes a su preparación. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 4.1. Estudio de la estabilidad del PEG-25 PABA en muestras de orina con el tiempo y la temperatura

	Días transcurridos			
	0	1	2	3
	Concentración encontrada de PEG-25 PABA (ng ml^{-1})			
T= $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$	152 \pm 3	152 \pm 7	110 \pm 9	115 \pm 5
T= $7 \text{ }^{\circ}\text{C}$	152 \pm 3	150 \pm 8	147 \pm 3	135 \pm 7

Como se puede observar, las muestras de orina se mantienen estables un día más después de su obtención si se mantiene a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y durante dos días si se mantiene a $7 \text{ }^{\circ}\text{C}$. En periodos superiores se produce un error relativo superior al 10%.

Por otro lado, se realizó un calibrado en el mismo día (día 0). Durante los tres días sucesivos se volvió a medir el mismo calibrado y se comparó con otro preparado y medido en el respectivo día. La comparación se realizó mediante un test "t" de Student de comparación de pendientes para las parejas de pendientes obtenidas cada día para el calibrado del día 0 y el preparado el mismo día. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 4.2. Estudio de la estabilidad del PEG-25 PABA en DMF con el tiempo

Día	Calibrado preparado mismo día de medida	Calibrado preparado día 0	t_{exp} (95%)
	Pendiente / ($\mu V s ml ng^{-1}$)	Pendiente / ($\mu V s ml ng^{-1}$)	
0	454 \pm 3		-
1	440 \pm 9	447 \pm 3	1,27
2	444 \pm 5	449 \pm 9	0,84
3	430 \pm 10	450 \pm 10	2,44

En el Apéndice II.4 se describe el test utilizado.

La t_{crit} tabulada es 2,45 para un nivel de confianza del 95% y 5 puntos experimentales.

Como se puede observar la t_{cal} es menor que la teórica, por lo que se concluye que el PEG-25 PABA es estable en DMF al menos durante los tres días siguientes a su preparación.

El coeficiente de variación inter-día para las pendientes es 2%.

4.3.5. Método propuesto para la determinación de PEG-25 PABA en orina de usuarios de productos cosméticos para la protección solar

En base a los estudios precedentes, se propone el siguiente procedimiento experimental:

Filtrar las muestras de orina empleando una placa porosa de vidrio y una bomba de vacío.

Realizar el siguiente procedimiento por triplicado:

Pasar 25 ml de la orina filtrada a través del cartucho de EFS (relleno sílice) (etapa de carga), previamente acondicionado con 1 ml de EtOH y 1 ml de agua desionizada.

Pasar 10 ml de agua desionizada a través del cartucho de EFS (etapa de lavado).

Pasar 4 ml de DMF a través del cartucho de EFS (etapa de elución del PEG-25 PABA), recoger la fracción eluida en un matraz aforado y diluir a 5 ml con DMF.

Se preparan disoluciones patrón conteniendo de 20 a 1000 ng ml⁻¹ en DMF.

Tanto las disoluciones patrón como las muestras se inyectan en el sistema cromatográfico (volumen de inyección de 50 μ l). Se emplea DMF como fase móvil y un caudal de 2 ml min⁻¹. La detección se realiza a una longitud de onda de emisión de 300 nm y de excitación de 350 nm (rendijas de 15 nm).

4.3.6. Parámetros analíticos del método propuesto

Estudio de la exactitud

Para verificar la exactitud del método propuesto se prepararon y analizaron 8 orinas fortificadas con cantidades conocidas de PEG-25 PABA a diferentes niveles de concentración. Para ello se emplearon orinas exentas de PEG-25 PABA de cuatro voluntarios de diferente edad y sexo. En la siguiente tabla se muestra la edad y sexo de los diferentes voluntarios, así como la concentración de PEG-25 PABA añadida y la concentración obtenida.

Tabla. 4.3. Edad y sexo de los diferentes voluntarios, concentración de PEG-25 PABA añadida y concentración obtenida en las diferentes muestras de orina. La incertidumbre de los resultados se estima mediante su desviación estandar

Voluntario	Edad / años	Genero	Concentración real / (ng ml ⁻¹)	Concentración obtenida / (ng ml ⁻¹)
1	26	Hombre	19	18 ± 1
			64	62 ± 5
2	27	Mujer	82	79 ± 2
			100	99 ± 4
3	17	Mujer	11	10 ± 1
			36	35 ± 2
4	23	Hombre	57	56 ± 3
			77	77 ± 4

Los resultados obtenidos fueron comparados mediante un modelo de regresión lineal, representando en abscisas la concentración real y en ordenadas la concentración hallada al aplicar el método propuesto y empleando el test descrito en el Apéndice II.5.

La ecuación obtenida fue $y = (0,993 \pm 0,008) \cdot x - (0,9 \pm 0,5)$; $R^2=0,9996$, siendo **y** los resultados obtenidos y **x** los valores reales.

El valor de $(t_{exp})_a$ fue de 1,81 mientras que el de $(t_{exp})_b$ fue de 0,88 (ver Apéndice II.5). Como el valor crítico del parámetro **t** de Student para un nivel de confianza del 95% y 8 puntos experimentales es de 2,45, se puede concluir que los resultados obtenidos por el método propuesto son estadísticamente exactos, para el conjunto de muestras estudiado.

Precisión

La desviación estándar relativa de los valores de concentración obtenidos para las muestras analizadas fue del orden del 3–10%, con un valor medio del 6%; lo que indica un buen nivel de precisión teniendo en cuenta que el PEG-25 PABA se encuentra a nivel de trazas en las muestras.

Parámetros cromatográficos

Los resultados obtenidos al inyectar por quintuplicado una disolución patrón de PEG-25 PABA de 112 ng ml^{-1} mostraron un tiempo de retención de $4,531 \pm 0,002 \text{ min}$. Los coeficientes de variación del área y de la altura fueron del orden del 1%.

Parámetros de calibración

En la tabla 4.4 se indican los parámetros de calibración del método.

Tabla 4.4. Parámetros de calibración del método de determinación de PEG-25 PABA en orina

Intervalo lineal	$< 1000 \text{ ng ml}^{-1}$
Intervalo de trabajo	$< 500 \text{ ng ml}^{-1}$
Recta de calibración	$\text{Área} = (1000 \pm 1000) + (450 \pm 5) \cdot \text{Conc.}$ (Conc. en ng ml^{-1} y Área en $\mu\text{V s}$)
R^2	0,9998
Sensibilidad ($b \pm s_b$)	$450 \pm 5 \mu\text{V s ml ng}^{-1}$
LD instrumental ($3 \cdot s_{y/x}/b$)	13 ng ml^{-1}
LD en las muestras	$2,6 \text{ ng ml}^{-1}$

Los parámetros analíticos son apropiados para el problema analítico planteado, con un límite de detección de 2,6 ng de PEG-25 PABA por ml de muestra de orina.

4.3.7. Aplicación del método propuesto al estudio de la excreción urinaria de PEG-25 PABA en usuarios de productos solares

El método propuesto se empleó para determinar el contenido de PEG-25 PABA en muestras de orina de tres voluntarios (un hombre y dos mujeres, de edades comprendidas entre 17 y 55 años) que se aplicaron un producto solar conteniendo PEG-25 PABA, con el fin de comprobar la utilidad del método propuesto.

El experimento se realizó siguiendo la metodología descrita a continuación:

Se recogieron muestras de orina de cada voluntario a primera hora de la mañana (blanco). Después, los voluntarios se aplicaron una dosis de crema solar (conteniendo el 8% de PEG-25 PABA) aproximada de 2 mg cm⁻² en los brazos, piernas y espalda. Cabe destacar que la cantidad total de crema aplicada en cada voluntario fue diferente (20,5, 10,9 y 10,1 g para los voluntarios 1, 2 y 3, respectivamente) ya que la superficie corporal estimada difiere en cada caso (1,03, 0,55 y 0,49 m², respectivamente). Los voluntarios esperaron 15 minutos antes de vestirse para evitar, en la medida de lo posible, pérdidas de producto.

Se analizó la primera muestra de orina (correspondiente a la excreción anterior a la aplicación de la crema) y no se encontraron cantidades detectables de PEG-25 PABA. Después, en cada evacuación urinaria se midió el volumen total excretado y se recogió una porción de 80 ml para el análisis. Las muestras se almacenaron en nevera hasta su análisis.

A modo de ejemplo, se muestra un cromatograma de la orina de cada voluntario:

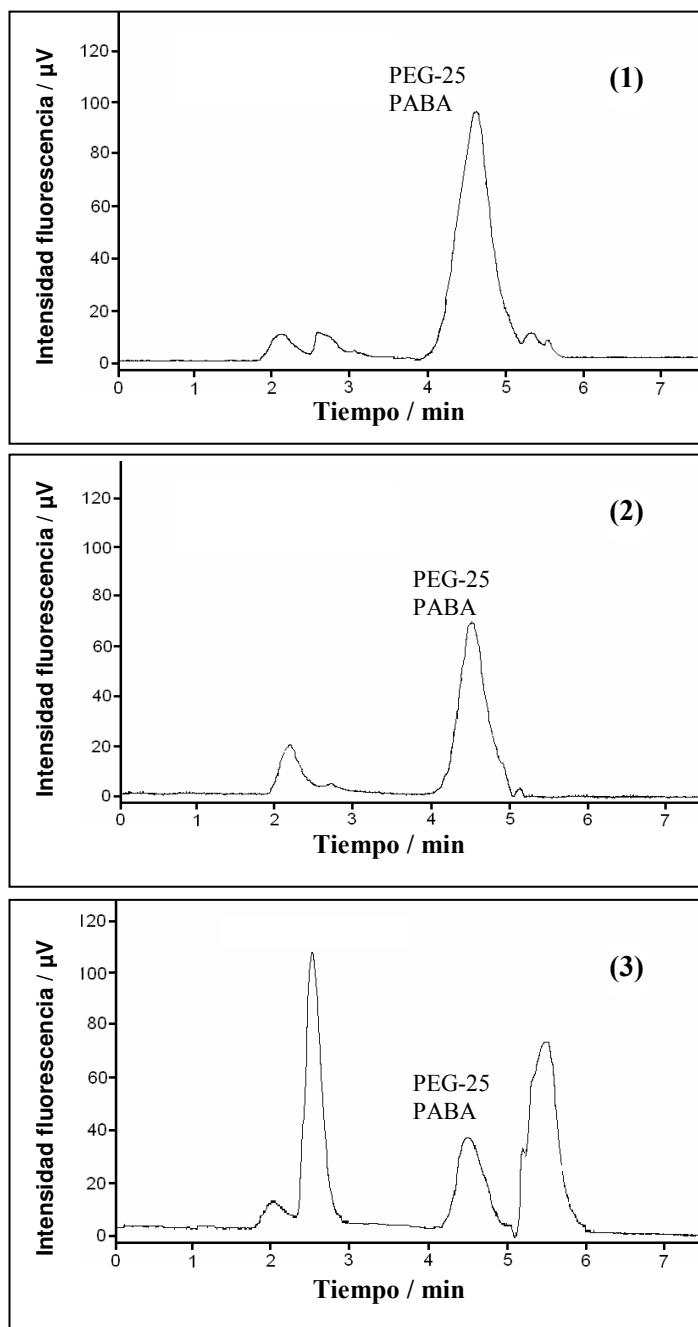


Fig. 4.4. Cromatogramas de muestras de orina de los tres voluntarios (1-3) en estudio

La concentración máxima detectada de PEG-25 PABA en las muestras de orina fue 210 ng ml^{-1} para el voluntario 1, 89 ng ml^{-1} para el 2 y 107 ng ml^{-1} para el 3.

El coeficiente de variación medio fue del 6%.

Para mostrar los resultados de una manera más clara, en la figura 4.5 se muestran las cantidades totales excretadas (μg totales) de PEG-25 PABA en función del tiempo (en horas) transcurrido desde la aplicación de la crema para cada voluntario.

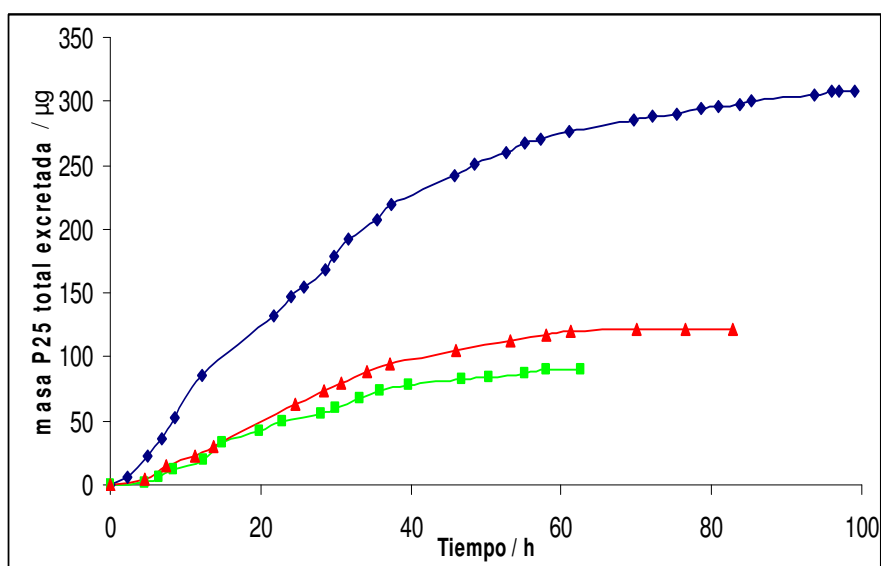


Fig. 4.5. Cinéticas de excreción urinaria del PEG-25 PABA para los tres voluntarios estudiados. Voluntario 1 (♦), voluntario 2 (■) y voluntario 3 (▲)

Como se aprecia en la figura, la excreción por vía urinaria del PEG-25 PABA finaliza entre 60 y 90 horas después de la aplicación de la crema. El porcentaje total de PEG-25 PABA excretado fue del 0,019% para el voluntario 1, del 0,011% para el 2 y del 0,014% para el 3, lo que supone un porcentaje medio del $0,015 \pm 0,004\%$.

4.4. CONCLUSIONES

Se ha desarrollado un método analítico que permite determinar PEG-25 PABA en la orina de los usuarios de productos cosméticos.

El análisis se puede realizar satisfactoriamente a pesar de los niveles bajos a los que se encuentra el PEG-25 PABA en la orina, ya que el método propuesto presenta un límite de cuantificación muy bajo ($8,6 \text{ ng ml}^{-1}$).

El método analítico proporciona resultados estadísticamente exactos. Además, los resultados presentan una precisión del 6%.

En los resultados obtenidos para los estudios de excreción de los tres voluntarios se puede apreciar que el organismo excreta el PEG-25 PABA a través de la orina en 60–90 horas después de la aplicación del producto solar y el porcentaje de excreción urinaria es del orden del 0,015% del total aplicado.

Capítulo 5

Desarrollo de un método analítico para la determinación de polietilen glicol 25 p-aminobenzoato en estudios basados en la simulación *in vitro* del proceso de absorción percutánea, empleando cromatografía líquida con detección fluorimétrica

5.1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO DEL TRABAJO

Como se mencionó en el Capítulo 4, el polietilen glicol 25 p-aminobenzoato (PEG-25 PABA) se utiliza en la actualidad como filtro solar, en sustitución del PABA, para evitar algunos efectos no deseados de éste, tales como la irritación de la piel y las manchas que produce sobre la ropa.

En el Capítulo 4 se describió un método analítico que demostró la presencia de PEG-25 PABA a niveles de trazas en la orina de varios voluntarios que se aplicaron un producto cosmético para la protección solar conteniendo PEG-25 PABA, lo que indicaba que había habido absorción a través de la piel.

El objetivo del trabajo correspondiente al presente Capítulo fue desarrollar un método *in vitro* que permitiera determinar el grado de penetrabilidad de este filtro solar a través de la piel; objetivo que se enmarca en la justificación general de la Tesis Doctoral, descrita al inicio de la Memoria.

El método estudiado se basa en la simulación *in vitro* del proceso de absorción percutánea, empleando una celda de difusión y realizando la determinación en el líquido receptor mediante cromatografía líquida con detección fluorimétrica. En los estudios realizados se ha utilizado piel humana.

También se ha desarrollado un método analítico para determinar los restos de PEG-25 PABA remanentes en el compartimento dador y en la epidermis utilizada en el estudio *in vitro* que permite realizar estudios de recuperación. En este caso se requiere una extracción en fase sólida (EFS) seguida de cromatografía líquida de exclusión con detección fluorimétrica.

Finalmente, se ha estudiado la cinética de absorción percutánea del PEG-25 PABA empleando diferentes vehículos.

5.2. PARTE EXPERIMENTAL

5.2.1. Metodología experimental

Se desarrollaron dos métodos analíticos para la determinación de PEG-25 PABA: uno para analizar el líquido receptor (basado en una cromatografía líquida con detección fluorimétrica) y otro método para el análisis del

compartimento dador y de la epidermis (basado en una extracción con etanol auxiliada por ultrasonidos, posteriormente una etapa de extracción en fase sólida (EFS) y finalmente determinación por cromatografía líquida de exclusión molecular con detección fluorimétrica). Se estudiaron las variables instrumentales y se validaron ambos métodos.

En una primera etapa se llevó a cabo la preparación de la piel humana y el montaje de las celdas de difusión. Al final del experimento se realizó el estudio de la integridad de las epidermis utilizadas mediante la determinación del marcador rojo de fenol (RF) en el líquido receptor.

Mediante la aplicación de los métodos propuestos se obtuvieron las curvas cinéticas de absorción percutánea del PEG-25 PABA en tres vehículos (emulsión aceite/agua (o/a), gel y disolución acuosa), así como las cantidades remanentes de PEG-25 PABA en el compartimento dador y en la epidermis.

Para la obtención de las curvas cinéticas de absorción percutánea se realizaron dos tipos de experimentos. En primer lugar se trabajó empleando dosis infinitas (300 mg). De este modo se pueden obtener los parámetros de permeabilidad para cada vehículo utilizado. En segundo lugar, se realizaron los estudios de difusión empleando dosis finitas (2 mg cm^{-2}) con el fin de obtener las curvas cinéticas y los porcentajes de absorción percutánea en unas condiciones equiparables a las reales.

Asimismo, se determinó el coeficiente de reparto octanol/agua del PEG-25 PABA con el fin de conocer su grado de afinidad con los estratos lipídicos (ya que presentan una polaridad semejante a la del octanol).

5.2.2. Aparatos y material

Las celdas de difusión empleadas fueron fabricadas por VidraFoc® (Barcelona, España) utilizando un diseño del grupo de investigación de los profesores Dra. Marina Herráez y Dr. Octavio Díez del departamento de Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Valencia (Díez-Sales et al., 1991; Borrás-Blasco et al., 2004; Díez-Sales et al., 2005), con cuya colaboración hemos contado en este trabajo.

Se utilizó un baño termostático J.P Selecta® (Barcelona) modelo Precistern y un agitador magnético sumergible Variomag® modelo Telesystem fabricado por H+P Labortechnik AG (Wasserburg, Alemania).

Para la determinación de PEG-25 PABA se empleó un sistema de cromatografía líquida equipado con una bomba isocrática 515 de Waters (Eschborn, Alemania), un inyector automático AS100 de Termo (Allschwil, Suiza) y un detector de fluorescencia serie 200 de Perkin Elmer (Norwalk CT, USA).

Se utilizó una columna LiChrospher® RP-18 (12,5 cm x 4 mm diámetro interno y 5 µm de tamaño de partícula) de Merck (Darmstadt, Alemania) para el análisis de líquido receptor y una columna Plgel MIXED-D (30 cm x 7,5 mm diámetro interno y 5 µm de tamaño de partícula) con precolumna Plgel Guard (5 cm x 7,5 mm diámetro interno y 5 µm de tamaño de partícula) de Polymer Laboratories (Church Stretton, Shropshire, Reino Unido) para el análisis de fluido dador y de epidermis.

Para el tratamiento de las muestras de epidermis se emplearon cartuchos de extracción en fase sólida Bond Elut de 1 ml conteniendo 100 mg de relleno tipo sílice (Si) (Varian).

Para la determinación del marcador rojo de fenol (RF) en el líquido receptor se utilizó el procedimiento desarrollado y descrito en el Capítulo 3.

Para la medida del pH se empleó un pHmetro Crison modelo micropH 2001.

Finalmente, para la determinación del coeficiente de reparto octanol/agua del PEG-25 PABA se utilizó un agitador Unitronic 320OR (PSelecta, Barcelona).

5.2.3. Reactivos

Se emplearon los siguientes reactivos: PEG-25 PABA R>99% de Basf (Ludwigshafen, Alemania) y rojo de fenol (RF) R>99%, ácido clorhídrico 37% d=1,19 g ml⁻¹ grado análisis, etanol absoluto (EtOH) grado HPLC, N,N-dimetilformamida (DMF) grado HPLC y cloruro sódico grado análisis de Scharlab (Barcelona). También se utilizó hidróxido sódico grado análisis (Probus S.A., Badalona), dihidrogenofosfato sódico monohidrato grado análisis (Merck, Darmstadt, Alemania), monohidrogenofosfato disódico anhidro grado análisis (Panreac, Barcelona) y 1-octanol grado ACS (Fluxa Chemika, Buchs, Suiza). El agua desionizada se obtuvo mediante un sistema NANOpure II (Boston, USA).

Se preparó una crema sintética conteniendo un 8% de PEG-25 PABA, siguiendo un protocolo de fabricación de la empresa Guinama (Alboraya,

Valencia), que se detalla en el Apéndice III.2 de esta Memoria, utilizando ingredientes cosméticos suministrados por la misma empresa.

Del mismo modo se preparó un gel solar con un 8% de PEG-25 PABA siguiendo el protocolo de fabricación de la misma empresa, que se detalla en el Apéndice III.3.

El fluido receptor empleado en las celdas de difusión se preparó mezclando 1,92 ml de NaH_2PO_4 9,078 g l^{-1} y 8,08 ml de Na_2HPO_4 9,464 g l^{-1} para obtener una disolución tampón de pH 7,4, que contenía un 0,92% de NaCl. De esta forma se simulan las características de la sangre.

5.2.4. Preparación de la piel humana y las celdas de difusión. Toma de muestra

Todos los estudios de difusión se realizaron empleando epidermis humana abdominal procedente de mujeres caucásicas, de edad comprendida entre 30 y 40 años, obtenidas de operaciones de cirugía estética.

La preparación de la piel y de las celdas de difusión se realizaron siguiendo los procedimientos descritos en el Capítulo 4 (apartados 3.2.4. y 3.2.5).

Las membranas epidérmicas se situaron entre el compartimento dador y el receptor de las celdas de difusión. El vehículo en estudio se añadió en el compartimento dador y las celdas, tal como se indicó en el Capítulo 4, se taparon y se mantuvieron a 37 °C durante el experimento. Al concluir el experimento se añadió 1 ml de una disolución de RF 0,05% en el compartimento dador para comprobar la integridad de la epidermis empleada.

Las muestras de líquido receptor se tomaron cada 1–2 horas durante 24–48 h. El volumen de muestra tomado fue de 0,2 ml. El volumen de muestra extraído se repuso con fluido receptor nuevo, también termostatzado a 37 °C. Esta dilución del líquido receptor de la celda de difusión (cuyo volumen es de 6 ml) se tuvo en cuenta para el cálculo de las cantidades finales acumuladas de PEG-25 PABA.

Además, se recogió la epidermis utilizada junto con los restos de vehículo y de rojo fenol presentes en el compartimento dador para realizar la determinación de PEG-25 PABA. De esta manera se pudo obtener la cantidad total de PEG-25 PABA recuperada (la presente en el líquido receptor más la del compartimento dador junto con la de la epidermis).

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1. Elección de las variables experimentales del sistema de simulación *in vitro*

En la realización de los experimentos se consideró conveniente utilizar únicamente la epidermis, tal y como se explicó en el Capítulo 3 (apartado 3.3.1.)

La superficie de la epidermis en contacto con la formulación cosmética a estudiar (vehículo) es del orden de 0,78 cm².

Los vehículos estudiados contenían un 8% de PEG-25 PABA, inferior al máximo autorizado por la legislación (10% de acuerdo con la Directiva Europea de Productos Cosméticos).

El fluido receptor es una disolución de tampón fosfato, pH=7,4, debido a la naturaleza hidrofílica del PEG-25 PABA. Además, debe ser semejante a la sangre en cuanto a pH y concentración salina.

Se realizaron dos tipos de estudios: a dosis infinita y a dosis finita (similar a la real). Se estudiaron tres tipos de formulaciones (vehículos): emulsión aceite/agua, gel o disolución acuosa, todos ellos conteniendo un 8 % de PEG-25 PABA (ver Apéndices III.2 y III.3).

Para llevar a cabo los estudios mediante la técnica de dosis infinita se introdujeron en el compartimento dador (tiempo cero) 300 mg del vehículo en estudio, equivalente a 24 mg de PEG-25 PABA.

Para llevar a cabo los estudios mediante la técnica de dosis finita se introdujeron en el compartimento dador 1,56 mg del vehículo en estudio, lo que supuso del orden de 2 mg cm⁻², que es la cantidad de protector solar recomendada (y con la que se recomienda realizar los estudios para determinar el factor de protección solar).

5.3.2. Estudio de la integridad de la celda. Determinación del marcador rojo de fenol (RF) en muestras de líquido receptor

Para evaluar la integridad de las celdas estudiadas se utilizó rojo de fenol como marcador, según lo indicado en el Capítulo 3 (apartado 3.3.2), con algunas modificaciones derivadas de la experiencia adquirida en la realización de los estudios allí descritos.

Para la determinación de rojo de fenol se utilizó el método propuesto en el apartado 3.3.2.)

Se llevó a cabo de modo habitual la toma de muestra de todas las celdas y, al terminar el experimento, se añadió 1 ml de la disolución de RF 0,05% (preparada empleando líquido receptor) en el compartimento dador. Se esperó una hora y se determinó el rojo de fenol en el líquido receptor (compartimento receptor). El criterio utilizado fue considerar como no válidas las celdas en la que la cantidad de rojo de fenol en el líquido receptor fuese superior al 0,1% de la cantidad aplicada. Puesto que el compartimento receptor tiene un volumen de 6 ml, sólo serán válidas las celdas en las que se encuentre una concentración de RF inferior a 83 ng ml^{-1} . Este nivel de concentración es superior al límite de detección del método propuesto (20 ng ml^{-1}) en el apartado 3.3.2 para la determinación de RF en sistemas de simulación *in vitro*.

A modo de ejemplo, en la siguiente figura se muestran dos celdas de difusión después de los ensayos de permeabilidad cutánea. Una se ha mantenido íntegra durante todo el experimento (cantidades no detectadas de RF en el líquido receptor) y la otra presenta alguna microrotura o mal sellado, ya que se detectaron $14 \mu\text{g ml}^{-1}$ de RF en el líquido receptor.



Fig. 5.1. Celdas de difusión tras el estudio de absorción percutánea y el ensayo de integridad basado en el análisis de RF. Izquierda: celda desechable ($14 \mu\text{g ml}^{-1}$ de RF en líquido receptor); derecha: celda útil (cantidades no detectadas de RF en el líquido receptor)

5.3.3. Estudio de la absorción percutánea del PEG-25 PABA

5.3.3.1. Estudio de las condiciones experimentales en la determinación de PEG-25 PABA

Al igual que en el problema analítico planteado en el Capítulo 4 para el análisis de orina, en este caso tampoco es posible utilizar la detección espectrofotométrica UV/vis para la determinación de PEG-25 PABA, ya que no permitiría alcanzar el límite de detección requerido en ensayos de permeabilidad cutánea. En este caso, y dado que la muestra es el líquido receptor, cabría esperar que no se presentasen tantas interferencias de matriz como en el caso de la orina. Se consideró la utilización de la cromatografía líquida convencional con una columna C18 y detección fluorimétrica, sin previa extracción.

Estudio de la composición de la fase móvil

Se realizaron estudios preliminares para seleccionar la composición de la fase móvil inyectando un patrón de PEG-25 PABA en líquido receptor. Se ensayaron mezclas de EtOH y agua en diferentes proporciones y con un mismo caudal de 1 ml min^{-1} : 50:50, 40:60, 35:65, 30:70. Se escogió un porcentaje de EtOH del 35% que proporcionaba una buena separación del frente de elución sin excesivo ensanchamiento. Esta composición se prefirió también a su equivalente preparada con EtOH y líquido receptor, ya que proporcionaba mayor sensibilidad.

Estudio del caudal de fase móvil

Se realizaron también experimentos modificando el caudal. El aumento del caudal permitía obtener picos más estrechos, escogiéndose finalmente un caudal de $1,9 \text{ ml min}^{-1}$, que es el mayor caudal que permite el equipo utilizado (presión de 4800 psi, inferior a la máxima recomendada de 5400 psi).

En la figura 5.1 se muestra un cromatograma obtenido en las condiciones seleccionadas, a las longitudes de onda de máxima excitación y emisión.

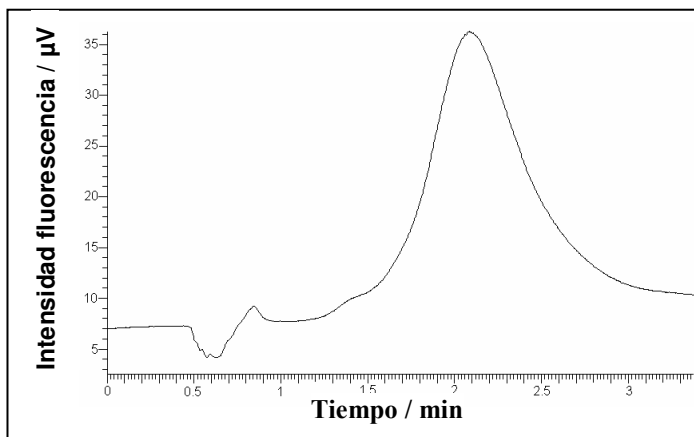


Fig. 5.2. Cromatograma obtenido para una disolución patrón de PEG-25 PABA de $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ a un caudal de $1,9 \text{ ml min}^{-1}$, fase móvil EtOH:H₂O (35:65 v/v) y detección fluorimétrica ($\lambda_{\text{exc}}=314 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=361 \text{ nm}$).

5.3.3.2. Método analítico propuesto para la determinación de PEG-25 PABA absorbido percutáneamente a través de piel humana

En base a los estudios precedentes, se recomienda el siguiente procedimiento experimental:

Preparar la piel y la celda de difusión tal y como se describe en el apartado 5.2.4.

Aplicar 300 mg (dosis infinita, equivalente a 24 mg de PEG-25 PABA) o bien 1,56 mg (dosis finita, 2 mg cm^{-2}) del producto solar sobre la piel, en el compartimento dador y conservar la celda a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ y en la oscuridad.

Tomar un volumen suficiente de líquido receptor e inyectar $50 \mu\text{l}$ directamente en el sistema cromatográfico, empleando disoluciones patrón de PEG-25 PABA (conteniendo entre $0,3$ y $10 \mu\text{g ml}^{-1}$) preparadas en líquido receptor.

Utilizar los siguientes parámetros instrumentales:

Columna C18 (12,5 cm x 4 mm diámetro interno), caudal $1,9 \text{ ml min}^{-1}$, longitud de onda de excitación 314 nm y de emisión 361 nm, potencia máxima y rendijas de excitación y de emisión de 15 nm.

Cada muestra se inyecta por triplicado.

Al final del experimento añadir 1 ml de la disolución de RF (0,05 %), esperar 1 hora y determinar el contenido de RF en líquido receptor (compartimento receptor) mediante el método descrito en el apartado 3.3.2.2.

5.3.3.3. Estudio de la estabilidad del PEG-25 PABA en el líquido receptor

Con el fin de comprobar que el PEG-25 PABA no se degradaba durante el proceso de toma de muestra, se preparó una disolución patrón de $2,77 \mu\text{g ml}^{-1}$ en líquido receptor y se introdujo en el baño a 37°C durante 48 horas (condiciones de las celdas *in vitro*). Posteriormente, se analizó la disolución patrón mediante el método propuesto. El resultado obtenido expresado como valor promedio \pm su desviación estándar de 5 determinaciones, fue de $2,83 \pm 0,05 \mu\text{g ml}^{-1}$.

Ambos valores son estadísticamente comparables para un nivel de confianza del 95%, ya que $t_{\text{cal}} = 2,08 < t_{\text{crit}} = 4,30$ para un nivel de confianza del 95% y 5 determinaciones, como se puede deducir de la aplicación del test descrito en el Apéndice II.2.

Por tanto, la concentración de PEG-25 PABA permanece estable durante todo el proceso *in vitro*.

5.3.3.4. Estudio del soporte de la piel

Para ayudar a mantener íntegra y bien extendida la piel durante los experimentos *in vitro*, es habitual situar la epidermis sobre un soporte de papel de filtro en medio de los dos compartimentos de la celda. Antes se ha de comprobar que este papel de filtro no retiene las moléculas de PEG-25 PABA, ya que, si lo hiciera, supondría un freno adicional externo a la epidermis humana.

Para ello se preparó una disolución patrón de $0,70 \mu\text{g ml}^{-1}$ y se depositó 1 ml en un vial, en el cual se introdujo un papel de filtro de 4 cm^2 . Se dejó reposar durante 48 horas para que se equilibrase y repartiera el PEG-25 PABA entre el papel y la disolución. Finalmente, mediante el método propuesto se determinó la concentración de PEG-25 PABA en la disolución remanente. El resultado obtenido, expresado como valor promedio de 5 determinaciones \pm su desviación estándar, fue de $0,68 \pm 0,02 \mu\text{g ml}^{-1}$. Ambos valores son estadísticamente comparables para un nivel de confianza del 95%, ya que $t_{\text{cal}} = 1,73 < t_{\text{crit}} = 4,30$ para un nivel de confianza

del 95% y 5 resultados, como se puede deducir de la aplicación del test descrito en el Apéndice II.2.

Se comprueba así que el PEG-25 PABA no ha sido absorbido significativamente por el papel de filtro en las condiciones ensayadas. Por tanto, se decidió emplear papel de filtro como soporte inerte en todos los montajes *in vitro*.

5.3.3.5. Parámetros analíticos del método

Estudio de la exactitud

Se preparó una crema solar exenta de PEG-25 PABA equivalente a la utilizada posteriormente en los ensayos percutáneos. Se adicionaron 300 mg de esta crema en dos celdas de difusión, se mantuvieron en funcionamiento (agitación constante, oscuridad y 37 °C) durante 48 horas y se recogieron los distintos líquidos receptores. Tras comprobar que las celdas de difusión habían mantenido íntegras sus epidermis (mediante la determinación de RF), se mezclaron los líquidos receptores para conseguir un fluido más representativo (blanco exento de PEG-25 PABA). La inyección directa de líquido receptor no daba señal, lo que demostró que no existían interferencias constantes. Para evaluar las posibles interferencias proporcionales, a partir del blanco se preparó un calibrado de adición estándar y se comparó con un calibrado de disoluciones de PEG-25 PABA en líquido receptor. Las disoluciones de calibrado contenían entre 0,7 $\mu\text{g ml}^{-1}$ y 7 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de PEG-25 PABA.

Las rectas obtenidas fueron las siguientes:

Calibrado líquido receptor:

Área= (518000±6000). Concentración + (20000±20000); $R^2=0,9995$

(concentración expresada en $\mu\text{g ml}^{-1}$ y área expresada en $\mu\text{V s}$)

Adición estándar:

Área= (519000±6000). Concentración + (20000±20000); $R^2=0,9994$

(concentración expresada en $\mu\text{g ml}^{-1}$ y área expresada en $\mu\text{V s}$)

Las pendientes son estadísticamente comparables para un nivel de confianza del 95% y 5 puntos experimentales de cada calibrado, ya que aplicando el test descrito en el Apéndice II.4, el valor de t_{cal} de la pendiente

es 0,26 y t_{crit} es 2,45. Se comprueba así que no existen errores proporcionales. Las ordenadas son igualmente comparables (t_{cal} ordenada es 0,31); lo que confirma la ausencia de errores constantes.

Por tanto, el método propuesto proporciona resultados estadísticamente exactos.

Precisión

El coeficiente de variación de los valores de concentración obtenidos para las muestras analizadas fue del orden del 2–7 %, con un valor medio del 5%.

Parámetros cromatográficos

El coeficiente de variación del área del pico cromatográfico es del orden del 2,4% (5 lecturas de un patrón de 3 $\mu\text{g ml}^{-1}$).

El tiempo de retención del PEG-25 PABA es de $2,09 \pm 0,02$ min (5 lecturas de un patrón de 3 $\mu\text{g ml}^{-1}$).

Parámetros de calibración

En la siguiente tabla se indican los parámetros de calibración del método.

Tabla 5.1. Parámetros de calibración obtenidos en la determinación de PEG-25 PABA en líquido receptor

Intervalo lineal	< 55 $\mu\text{g ml}^{-1}$
Intervalo de trabajo	< 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$
Recta de calibración	Área = (497000 ± 8000) · Conc + (30000 ± 10000) (Concentración en $\mu\text{g ml}^{-1}$ y área expresada en $\mu\text{V s}$)
R^2	0,9995
Sensibilidad ($b \pm s_b$)	497000 ± 8000 $\mu\text{V s ml } \mu\text{g}^{-1}$
LD ($3 \cdot s_{y/x} / b$)	0,05 $\mu\text{g ml}^{-1}$

Para evaluar la reproducibilidad entre días se preparó y se midió un calibrado diferente durante 5 días distintos y se observó la variación de los valores de la pendiente. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 5.2. Reproducibilidad entre días de la pendiente de la recta de calibración del PEG-25 PABA en líquido receptor

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Pendiente / (ml μg^{-1})	519000	517000	497000	476000	528000
Media \pm s	510000 \pm 20000				
CV / %	4				

s: desviación estándar

Como se puede apreciar el coeficiente de variación entre días para la pendiente de los calibrados de PEG-25 PABA es de un 4%.

5.3.4. Estudio de la determinación del PEG-25 PABA remanente en la epidermis y en la crema

Una vez terminado el experimento de absorción percutánea *in vitro*, se desarrolló un método analítico con el fin de poder evaluar el porcentaje de recuperación de PEG-25 PABA remanente en el compartimento dador y en la epidermis conjuntamente.

En un primer momento se empleó el método anteriormente descrito para determinarlo en el líquido receptor, pero no resultó útil debido a la presencia de sustancias interferentes, provenientes de la epidermis, que coelúa con el PEG-25 PABA. Los componentes de la emulsión o el gel no interfería.

Para solucionar este problema se diseñó una estrategia más selectiva, consistente en realizar una extracción en fase sólida y posteriormente llevar a cabo la determinación mediante cromatografía líquida de exclusión molecular con detección fluorimétrica.

Para ello se realizó una etapa de lixiviación conjunta del PEG-25 PABA de la crema o el gel y de la piel, utilizando como disolvente etanol y aplicando ultrasonidos para la aceleración de la etapa. Se realizó un estudio del tiempo de lixiviación en el baño de ultrasonidos para garantizar la total

extracción del PEG-25 PABA, y posteriormente se llevó a cabo la etapa de extracción en fase sólida.

Los patrones se prepararon en EtOH y se comprobó que era necesario aplicarles también la etapa de extracción en fase sólida, ya que se observó un efecto matriz al emplear patrones preparados directamente en EtOH. Finalmente, se estudió la exactitud del nuevo método.

5.3.4.1. Estudio del tiempo de lixiviación en el baño de ultrasonidos

Para asegurar la total lixiviación de PEG-25 PABA del vehículo remanente en el compartimento dador y de la epidermis en las disoluciones etanólicas, se estudió el tiempo necesario de irradiación con ultrasonidos.

En primer lugar, se recogieron los restos del vehículo remanente en el compartimento dador junto con la epidermis empleada en un estudio de absorción percutánea y se les añadió etanol hasta completar un volumen de 25 ml. A continuación se determinó la concentración de PEG-25 PABA a tiempo cero y a los 15, 30, 45 y 60 minutos de irradiación ultrasónica.

En la siguiente figura se muestran las áreas obtenidas para el pico del PEG-25 PABA a los diferentes tiempos de irradiación en el baño de ultrasonidos.

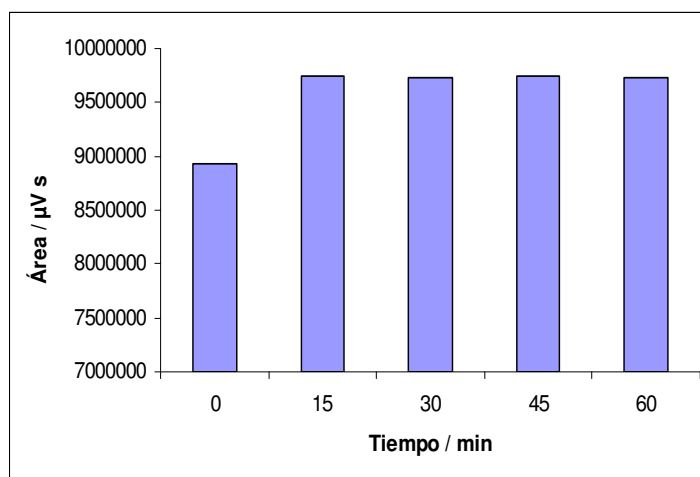


Fig. 5.3. Áreas obtenidas para PEG-25 PABA después de diferentes tiempos de agitación en el baño de ultrasonidos. Se empleó como vehículo una emulsión aceite/agua conteniendo un 8% de PEG-25 PABA

Como se puede observar, sin aplicar ultrasonidos el área obtenida es menor que con aplicación de 15 minutos de ultrasonidos. La irradiación en el baño de ultrasonidos permite lixiviar con mayor eficacia los restos de PEG-25 PABA de la epidermis y de la emulsión. Al aumentar el tiempo de actuación de los ultrasonidos no se consigue aumentar la señal. En el caso de emplear como vehículo el gel se obtienen idénticos resultados. Por tanto, se utilizó 15 minutos como tiempo óptimo de aplicación de los ultrasonidos.

5.3.4.2. Método analítico propuesto para la determinación de PEG-25 PABA en el vehículo remanente en el compartimento dador y en la epidermis

Tras finalizar el experimento de absorción percutánea *in vitro*, recoger el vehículo remanente en el compartimento dador y la epidermis y depositarlos en un vaso de precipitados con 20 ml de EtOH, irradiar con baño de ultrasonidos 15 minutos, y trasvasar a un matraz de 25 ml aforando con EtOH.

Tomar 1 ml de disolución etanólica y pasarlo a través del cartucho de sílice. A continuación aplicar una etapa de lavado con 2 ml de agua, eluir con aproximadamente 4 ml de dimetilformamida y aforar a 5ml con DMF.

Preparar disoluciones patrón de PEG-25 PABA de 1 a 8 $\mu\text{g ml}^{-1}$ en etanol y realizar la etapa de extracción en fase sólida de igual manera que en las disoluciones de muestra.

Llevar a cabo el análisis mediante cromatografía líquida de exclusión molecular con detección fluorimétrica.

Inyectar 50 μl , tanto las disoluciones patrón como las muestras en el sistema cromatográfico descrito con anterioridad (fase móvil de 100% DMF a un caudal de 2 ml min^{-1}).

Las longitudes de onda de excitación y de emisión son de 300 nm y 350 nm, respectivamente (rendijas de 15 nm e intensidad media).

5.3.4.3. Parámetros analíticos del método propuesto

Estudio de la exactitud

Se aplicaron 1,6 mg de crema solar exenta de PEG-25 PABA en una celda de difusión que se mantuvo en funcionamiento (agitación constante, oscuridad y 37 °C) durante 48 horas y se recogió la epidermis con los restos de crema y de RF, tras comprobar que las celdas de difusión habían mantenido íntegra su epidermis. A partir de este blanco se preparó un calibrado de adición estándar y se comparó con un calibrado normal (en etanol). Los calibrados contenían concentraciones entre 1 y 7 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de PEG-25 PABA.

Las rectas obtenidas fueron las siguientes:

Calibrado etanol:

Área= (1160000 \pm 20000). Concentración + (70000 \pm 80000); $R^2=0,9994$

(concentración expresada en $\mu\text{g ml}^{-1}$ y área expresada en $\mu\text{V s}$)

Adición estándar:

Área= (1130000 \pm 30000). Concentración + (60000 \pm 90000); $R^2=0,9991$

(concentración expresada en $\mu\text{g ml}^{-1}$ y área expresada en $\mu\text{V s}$)

Las pendientes son estadísticamente comparables para un nivel de confianza del 95% y 5 puntos experimentales de cada calibrado, ya que aplicando el test descrito en el Apéndice II.4 el valor de t_{cal} de la pendiente es 2,00 y t_{crit} es 2,45. Así se comprueba que no existen errores proporcionales. Las ordenadas son igualmente comparables (t_{cal} ordenada es 0,19) lo que confirma la ausencia de errores constantes.

Por tanto, el método propuesto proporciona resultados estadísticamente exactos.

Precisión

El coeficiente de variación de los valores de concentración obtenidos para las muestras analizadas fue del orden del 1–4 %, con un valor medio del 3%.

Parámetros cromatográficos

El tiempo de retención para una disolución patrón de PEG-25 PABA de 3 $\mu\text{g ml}^{-1}$ tras 5 inyecciones consecutivas fue $4,50 \pm 0,02$ y el coeficiente de variación del área del pico fue del 1%.

Parámetros de calibración

En la tabla 5.3 se indican los parámetros de calibración del método.

Tabla 5.3. Parámetros de calibración obtenidos en la determinación de PEG-25 PABA en compartimiento dador y epidermis

Intervalo lineal	< 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$
Intervalo de trabajo	1-7 $\mu\text{g ml}^{-1}$
Recta de calibración	Área = (1130000 \pm 20000).Conc + (-60000 \pm 80000) (Conc. expresada en $\mu\text{g ml}^{-1}$ y área expresada en $\mu\text{V s}$)
R ²	0,9994
Sensibilidad (b \pm s _b)	1130000 \pm 20000 $\mu\text{V s ml } \mu\text{g}^{-1}$
LD (3.s _{y/x} /b)	0,1 $\mu\text{g ml}^{-1}$

Para evaluar la reproducibilidad entre días se preparó y se midió un calibrado diferente durante 5 días distintos y se observó la variación de los valores de la pendiente. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 5.4. Reproducibilidad entre días de la pendiente de la recta de calibración del PEG-25 PABA

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Pendiente / ml μg^{-1}	1130000	1110000	1180000	1160000	1100000
Media \pm s	1130000 \pm 30000				
CV / %	3				

s: desviación estándar

Como se puede apreciar, el coeficiente de variación entre días para la pendiente de los calibrados de PEG-25 PABA es del 3%.

5.3.5. Obtención experimental del coeficiente de reparto octanol/agua del PEG-25 PABA

El coeficiente de reparto octanol/agua proporciona una orientación del grado de afinidad del compuesto por la barrera cutánea (Díez-Sales et al., 1996, Jager et al., 2006). El empleo de octanol se justifica por tener una polaridad similar a la de los estratos lipídicos propios de la piel.

En una primera etapa se acondicionó el octanol. Para ello, se introdujeron en un embudo de decantación 200 ml de octanol y 20 ml de agua desionizada, se agitó vigorosamente y durante el día se fue agitando cada hora durante 24 horas. De esta manera se consiguió saturar el octanol de agua. Al cabo de las 24 horas se eliminó la fase acuosa.

Por otro lado se preparó un patrón de PEG-25 PABA en agua de $218 \mu\text{g ml}^{-1}$. Se tomaron 2 ml de patrón acuoso y 18 ml de octanol (saturado en agua) y se vertieron en un tubo de ensayo provisto de tapón de rosca. Esta operación se realizó por triplicado. Se eligió una concentración de PEG-25 PABA y un volumen de octanol elevados para intentar favorecer un reparto más similar del PEG-25 PABA entre las dos fases debido a su marcado carácter hidrófilo.

Los tres tubos de ensayo se sometieron a agitación mecánica constante (60 ciclos por minuto) durante 48 h, transcurridas éstas se dejó decantar y se tomó una muestra de la disolución acuosa, en la que se determinó el contenido de PEG-25 PABA mediante el método cromatográfico propuesto para el análisis del líquido receptor.

Para el cálculo del coeficiente de reparto (CR) se utilizó la siguiente expresión (Díez-Sales et al., 1996):

$$CR = \frac{\left(C_1 \times \frac{V_a}{V_o} \right) - \left(C_2 \times \frac{V_a}{V_o} \right)}{\left(C_1 \times \frac{V_a}{V_o} \right) - \left(C_2 \times \frac{V_a}{V_o} \right) + C_2}$$

Donde C_1 es la concentración inicial del patrón ($218 \mu\text{g ml}^{-1}$), C_2 es la concentración en la fase acuosa después de la decantación, V_a es el volumen de fase acuosa (con patrón) introducida en el tubo de decantación (2 ml) y V_o es el volumen de octanol introducido (18 ml).

El coeficiente de reparto obtenido de esta manera, expresado como valor promedio de tres experimentos \pm su desviación estándar fue de $0,033 \pm 0,002$.

Habitualmente se suele expresar el CR en su forma logarítmica, $\text{Log CR} = -1,48 \pm 0,04$. A la vista del valor obtenido se puede afirmar que el PEG-25 PABA presenta un marcado carácter hidrófilo y muy poca afinidad por el octanol; por lo que es de esperar una escasa afinidad por los estratos lipídicos cutáneos (ver apartado 5.3.6.3).

5.3.6. Aplicación de los métodos propuestos al estudio de la cinética de absorción percutánea de PEG-25 PABA a través de piel humana

5.3.6.1. Estudio cinético de la absorción percutánea de PEG25-PABA empleando diferentes vehículos

Se estudiaron las cinéticas de absorción percutánea *in vitro* de PEG-25 PABA empleando los tres vehículos en estudio (emulsión aceite/agua (o/a), gel y disolución acuosa), tanto con dosis finita como infinita. Se determinó el marcador RF en todas las celdas y se desecharon todas las que contuvieron un porcentaje en el líquido receptor mayor que el 0,1% de la cantidad introducida en el compartimento dador.

A partir de los resultados del análisis de las diferentes muestras a cada tiempo, se puede representar la cantidad de PEG-25 PABA que ha penetrado a través de la epidermis en función del tiempo desde el momento en que se adicionó el producto (tiempo cero).

Este tipo de procesos de absorción basados en la difusión directa se rigen por la segunda ley de Fick (ver Capítulo 1, apartado 1.3.1).

Los datos de las cantidades acumuladas por cm^2 (Q) a cada tiempo se ajustaron al modelo no lineal resultante de la segunda ley de Fick mediante el software Sigma Plot 8.0 package (Jandel Scientific Corporation) para la obtención de los siguientes parámetros: coeficiente de partición (K), coeficiente de difusión (D), coeficiente de permeabilidad (K_p), flujo (J) y tiempo de latencia (t_l).

Como se explica en el Capítulo 1 (apartado 1.4), el K indica el grado de afinidad del compuesto entre la membrana y el vehículo dador, D la facilidad con la que el compuesto difunde a través de la membrana, J la velocidad con que el compuesto atraviesa la membrana en función de la concentración del mismo en el producto aplicado, K_p la facilidad con la que el compuesto atraviesa la membrana (este valor no depende de la concentración del compuesto ya que $J = K_p \times \text{Concentración}$) y t_l es el tiempo necesario en alcanzar el estado estacionario.

Para cada celda de difusión se obtiene la cinética a partir de una serie de datos de Q en función del tiempo. Tras el ajuste matemático se obtienen los parámetros de permeabilidad. Por tanto, se puede calcular la media aritmética de dichos valores para las cinéticas obtenidas utilizando un mismo vehículo. A los valores resultantes de la media aritmética se les catalogó como “valores promedio”.

Por otro lado, es muy habitual presentar los parámetros de permeabilidad obtenidos a partir de una sola cinética representativa de todo el proceso, denominada “cinética media”. Esa cinética se construye obteniendo la Q para cada tiempo como media aritmética de los valores a ese tiempo de todas las cinéticas obtenidas para ese vehículo.

Mediante la técnica de la dosis infinita se obtuvieron cuatro curvas cinéticas para cada tipo de vehículo.

En la figura 5.4 se muestran las curvas obtenidas aplicando 300 mg (dosis “infinita”) de PEG-25 PABA al 8% en agua como vehículo.

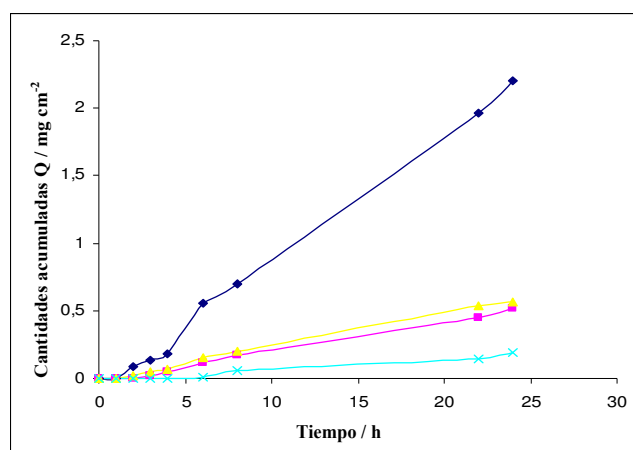


Fig. 5.4. Curvas obtenidas aplicando 300 mg de una disolución acuosa de PEG-25 PABA al 8%, utilizando como membrana epidermis humana

En la tabla 5.5 se muestran los parámetros de permeabilidad para el PEG-25 PABA en el vehículo agua, tanto de valores promedio como los obtenidos a partir de la cinética media.

Tabla 5.5. Parámetros de permeabilidad obtenidos para el PEG-25 PABA en disolución acuosa

Parámetros permeabilidad	Valores cinética media	Valores promedios
K	$(4 \pm 1) \times 10^{-3}$	$(5 \pm 3) \times 10^{-3}$
D / cm h ⁻¹	0,13±0,04	0,13±0,09
K _p / cm h ⁻¹	$(5 \pm 2) \times 10^{-4}$	$(5 \pm 4) \times 10^{-4}$
J / mg cm ⁻² h ⁻¹	0,04±0,01	0,04±0,03
t _i / h	1,2±0,3	2±2

En la figura 5.5 se muestran las curvas obtenidas aplicando 300 mg (dosis infinita) de PEG-25 PABA al 8% en emulsión aceite/agua (o/a) como vehículo.

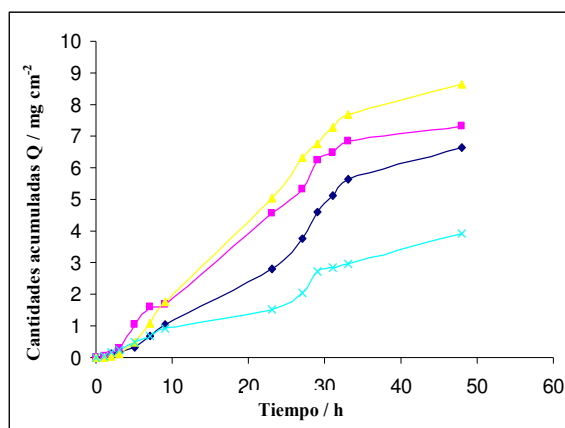


Fig. 5.5. Curvas obtenidas aplicando 300 mg de una emulsión (o/a) de PEG-25 PABA al 8%, utilizando como membrana epidermis humana

En la tabla 5.6 se muestran los parámetros cinéticos promedios y los obtenidos a partir de la cinética media para el PEG-25 PABA en el vehículo crema o/a.

Tabla 5.6. Parámetros de permeabilidad obtenidos para el PEG-25 PABA en crema o/a

Parámetros permeabilidad	Valores cinética media	Valores promedios
K	$(2,7 \pm 0,9) \times 10^{-2}$	$(4 \pm 3) \times 10^{-2}$
D / cm h ⁻¹	0,08 ± 0,02	0,2 ± 0,3
K _p / cm h ⁻¹	$(2 \pm 1) \times 10^{-3}$	$(2,3 \pm 0,9) \times 10^{-3}$
J / mg cm ² h ⁻¹	0,18 ± 0,08	0,19 ± 0,07
t _i / h	2,0 ± 0,6	2 ± 2

En la figura 5.6 se muestran las curvas obtenidas aplicando 300 mg (dosis “infinita”) de PEG-25 PABA al 8% en gel como vehículo.

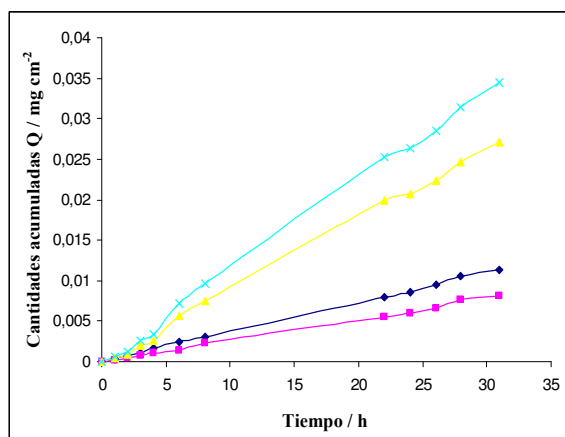


Fig. 5.6. Curvas obtenidas aplicando 300 mg de un gel de PEG-25 PABA al 8%, utilizando como membrana epidermis humana

En la tabla 5.7 se muestran los parámetros cinéticos promedios y los obtenidos a partir de la cinética media para el PEG-25 PABA en el vehículo gel.

Tabla 5.7. Parámetros de permeabilidad obtenidos para el PEG-25 PABA en gel

Parámetros permeabilidad	Valores cinética media	Valores promedios
K	$(2\pm 1) \times 10^{-5}$	$(2\pm 1) \times 10^{-5}$
D / cm h ⁻¹	0,3±0,2	0,6±0,6
K _p / cm h ⁻¹	$(7\pm 6) \times 10^{-6}$	$(7\pm 3) \times 10^{-6}$
J / mg cm ⁻² h ⁻¹	$(6\pm 5) \times 10^{-4}$	$(6\pm 3) \times 10^{-4}$
t _i / h	0,5±0,3	0,5±0,2

Como se puede apreciar, existe una gran diferencia entre los parámetros de permeabilidad obtenidos para los vehículos agua, crema o/a y gel. La velocidad de paso del PEG-25 PABA a través de la piel (flujo, J) es de 6×10^{-4} mg cm⁻² h⁻¹ para el vehículo gel. En cambio, para la disolución acuosa es 67 veces mayor y para la crema o/a es 317 veces mayor. Por tanto, el flujo es aproximadamente 5 veces mayor para el vehículo crema que para la disolución acuosa.

Estas diferencias significativas también se aprecian en los valores de las constantes de permeabilidad, K_p. En la figura 5.7 se muestran comparativamente los K_p para los tres vehículos en estudio.

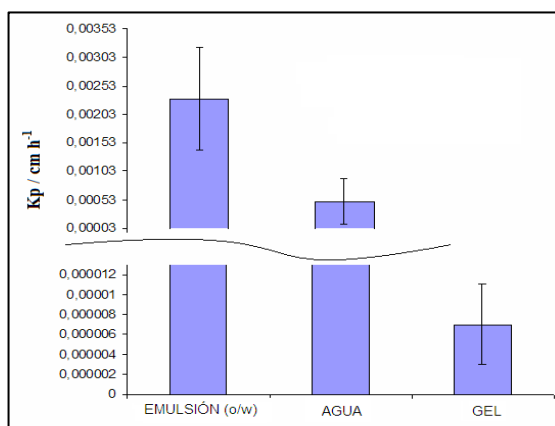


Fig. 5.7. Comparación de los coeficientes de permeabilidad (K_p) obtenidos para los vehículos emulsión o/a, agua y gel

Mediante la técnica de la dosis finita se obtuvieron tres curvas cinéticas representativas para cada tipo de vehículo.

En la figura 5.8 se muestran las curvas obtenidas aplicando 1,56 mg (dosis finita, 2 mg cm^{-2}) de PEG-25 PABA al 8% en agua como vehículo.

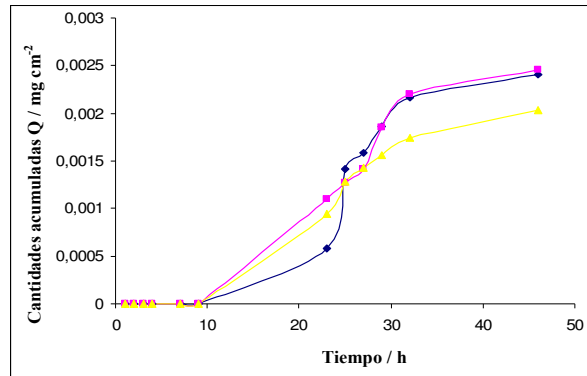


Fig. 5.8. Curvas obtenidas aplicando 2 mg cm^{-2} de una disolución acuosa de PEG-25 PABA al 8%, utilizando como membrana epidermis humana

En la figura 5.9 se muestran las curvas obtenidas aplicando una dosis finita de 2 mg cm^{-2} de PEG-25 PABA al 8% en una emulsión o/a como vehículo.

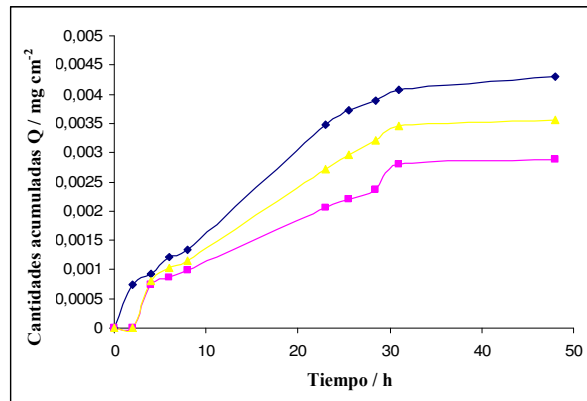


Fig. 5.9. Curvas obtenidas aplicando 2 mg cm^{-2} de una emulsión o/a de PEG-25 PABA al 8%, utilizando como membrana epidermis humana

En el caso de la utilización del gel como vehículo no se obtuvieron valores detectables de PEG-25 PABA en el líquido receptor a lo largo de las primeras 48 horas en el caso de la aplicación de la dosis finita.

A partir de las curvas halladas, se obtienen los siguientes porcentajes de absorción percutánea del PEG-25 PABA en las diferentes formulaciones cosméticas en unas condiciones equiparables a las reales.

Tabla 5.8. Porcentajes de absorción percutánea de PEG-25 PABA obtenidos a las 48 horas para los diferentes vehículos en estudio

Vehículo	Absorción percutánea (48 h) / %
Crema	2,0±0,4
Agua	1,1±0,1
Gel	No detectado

Cabe destacar que, utilizando como vehículo la emulsión o/a, se obtiene un porcentaje de absorción percutánea el doble que en el caso de la disolución acuosa.

Estos resultados están en concordancia con los parámetros obtenidos mediante la dosis infinita, ya que con la dosis finita también se observa una mayor absorción utilizando la crema en vez del agua, y muy por debajo (en este caso, no detectado) utilizando el gel como vehículo.

Por otro lado, se aprecia que gran parte del proceso de penetración del PEG-25 PABA se produce durante las primeras 33 horas, ya que posteriormente no se aprecian aumentos significativos en las cantidades totales acumuladas, tanto en el caso de la utilización de la emulsión como de la disolución acuosa (dosis finitas).

Según los resultados obtenidos, tanto en los estudios empleando dosis infinita como finita, el vehículo más idóneo para la formulación del filtro UV PEG-25 PABA sería el gel, tanto desde el punto de vista de la seguridad del usuario (menor absorción percutánea) como de la eficacia (mayor permanencia en la superficie epidérmica).

Por otra parte, la mayor absorción percutánea en el vehículo emulsión o/a puede ser debido a la presencia de promotores, tales como propilenglicol, ácidos grasos y tensioactivos (presentes en la base autoemulsionable utilizada).

En cambio, el vehículo gel presenta una serie de características especiales. Por un lado tenemos un medio mucho más viscoso que la

loción acuosa, lo que limita en gran medida la difusión de las moléculas de PEG-25 PABA del vehículo a la epidermis. A la vista de los resultados obtenidos, esta etapa debe ser la limitante en el proceso total. De forma adicional, esta difusión tan lenta hacia la epidermis podría también deberse en parte a la interacción molecular entre las cadenas del polímero del gel y las cadenas etoxiladas del PEG-25 PABA.

Todas las celdas de difusión empleadas en los anteriores estudios se mantuvieron íntegras durante todo el ensayo, ya que se empleó el rojo de fenol como marcador y no se detectó en el líquido receptor.

5.3.6.2. Estudio de la recuperación del total de PEG-25-PABA aplicada

Se determinó la cantidad remanente en el vehículo y en la epidermis obteniéndose una recuperación de la cantidad aplicada entre el 92 y el 109%.

Tabla 5.9. Resultados obtenidos de recuperación de PEG-25 PABA en las celdas de difusión después del estudio de la absorción percutánea

Vehículo	Celdas	Recuperación en restos del compartimento dador y epidermis / %	Recuperación final (incluyendo líq.receptor) / %
Agua	A.1	95±4	96
	A.2	91±3	92
	A.3	108±4	109
Emulsión	E.1	91±2	93
	E.2	93±3	95
	E.3	103±4	105
Gel	G.1	98±2	98
	G.2	95±2	95
	G.3	104±3	104

5.3.6.3. Discusión de los resultados

A continuación se comparan los resultados obtenidos para el filtro PEG-25 PABA con los encontrados en la bibliografía para otro filtro solar de la misma familia, el ácido p-aminobenzoico (PABA). El PEG-25 PABA contiene como núcleo el PABA incorporando tres cadenas polietoxiladas.

El PABA presenta una solubilidad de 1 g en 170 ml de agua a 25 °C (Index Merck). En cambio, según las especificaciones del fabricante (BASF, Ludwigshafen (Alemania)), el PEG-25 PABA es miscible con agua. Ese carácter hidrófilo se ve marcado, además, por los respectivos coeficientes de reparto octanol/agua (CR). Para el PEG-25 PABA se obtuvo experimentalmente un Log CR= -1,48±0,04. En cambio, para el PABA se

encuentra en la bibliografía que $\text{Log CR}=0,58$ (Jager et al., 2006). Por tanto, se puede decir que el PEG-25 PABA presenta menos afinidad por el octanol que el PABA. Aparentemente, este comportamiento favorece más el paso a través de los estratos lipídicos cutáneos del PABA en comparación con el PEG-25 PABA.

A pesar de que el PEG-25 PABA tiene menos afinidad por los estratos lipídicos y tiene un tamaño molecular mayor que el PABA, presentan coeficientes permeabilidad (K_p) muy semejantes.

Según Jager et al., 2006, el PABA presenta un K_p de $(1,2\pm 0,5) \times 10^{-8} \text{ cm s}^{-1}$, o lo que es lo mismo $0,0004 \text{ cm h}^{-1}$. Este resultado se ha obtenido utilizando celdas de difusión, aplicando el PABA en una disolución acuosa tampón acetato a pH 5 y utilizando como membrana estrato córneo humano. Este valor es comparable al obtenido en este trabajo para el PEG-25 PABA aplicado en agua ($0,0005 \text{ cm h}^{-1}$). Esto se puede explicar basándose en la posibilidad de que el PEG-25 PABA se pueda autoemulsionar aprovechando sus cadenas polietilénicas. De esta manera se facilita su difusión a través de la piel, según lo indicado por Couteau et al., 2001.

Según Wester et al., 1998 el PABA presenta una absorción percutánea del $15\pm 8\%$. El vehículo empleado fue etanol, lo que explica el valor tan elevado de absorción percutánea hallado, ya que el etanol presenta un marcado efecto promotor de la absorción (Pons y Parra, 1995).

5.4. CONCLUSIONES

El método *in vitro* propuesto permite conocer el grado de penetración cutánea del PEG-25 PABA en productos solares sin presentar interferencias. Además, se ha desarrollado un método analítico que permite determinar el porcentaje de recuperación total del PEG-25 PABA inicialmente aplicado.

Los parámetros de sensibilidad, límite de detección y precisión en la determinación de PEG-25 PABA son apropiados en ambos métodos para los niveles de concentración encontrados en sus respectivas matrices.

Los resultados muestran la aplicabilidad de los métodos para el estudio de la biocinética de este compuesto.

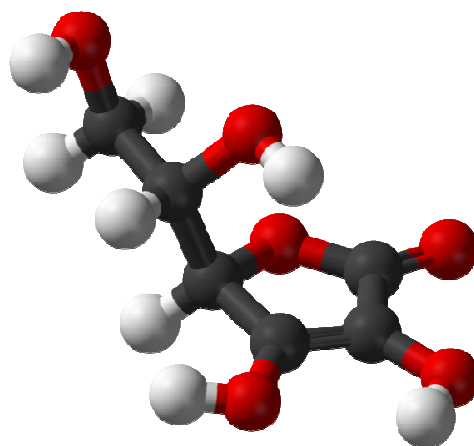
Se observa que el PEG-25 PABA presenta una menor absorción percutánea si se formula en forma de gel, minimizando en gran medida la

presencia de PEG-25 PABA en la circulación sistémica. Además, se mejora su eficacia, ya que el producto sigue en las capas externas de la epidermis, donde realmente realiza su acción protectora de la radiación UV.

El desarrollo de métodos que permitan el estudio de los procesos de absorción/excreción de los filtros solares en el cuerpo humano permitirá contribuir al diseño de nuevos filtros y formulaciones que presenten poca absorción percutánea.

PARTE 2

Determinación de principios activos despigmentantes en productos cosméticos para el blanqueamiento de la piel



JUSTIFICACIÓN de la Segunda Parte

En la Segunda Parte de la presente Tesis Doctoral se han desarrollado métodos analíticos que permiten la determinación de diversos ingredientes empleados en las modernas formulaciones cosméticas para el blanqueamiento de la piel.

Mediante estos métodos se puede realizar el control de calidad de la producción. Este control es necesario para asegurar que el producto cosmético presenta la concentración de activos despigmentantes necesaria para conseguir la eficacia esperada, pero no sobrepasando estos niveles de concentración para no comprometer la seguridad de los usuarios, ya que una concentración excesiva puede favorecer la aparición de efectos secundarios no deseados (alergias, irritación...).

Además, se han desarrollado métodos analíticos que permiten el control de sustancias como hidroquinona y resorcinol en dichos productos cosméticos, estando ambas sustancias prohibidas actualmente por la legislación, ya que no se consideran seguras para los usuarios. De esta manera se puede controlar la aparición de fraudes por el uso indebido de dichas sustancias, pudiendo proceder a la retirada del producto por las autoridades competentes.

Capítulo 6

Introducción de la Parte 2

6.1. INTERÉS COSMÉTICO DE LOS AGENTES DESPIGMENTANTES

Las manchas en la piel son uno de los problemas estéticos más importantes en la actualidad. Aunque normalmente no son perjudiciales para la salud, muchas personas afectadas por este problema acuden a especialistas para intentar eliminar estas marcas antiestéticas de su piel (Rothe de Arocha, 2003; Cayce et al., 2004; Soler, 2004).

Las manchas son cúmulos de melanina (ver figura 6.1). La melanina es la sustancia natural encargada de proteger al organismo de la radiación UV y es la responsable de la pigmentación color café de la piel. Estos cúmulos de melanina se forman debido a una hiperactividad de las células encargadas de su síntesis. Éstos se denominan melanocitos y se encuentran en la epidermis.



Fig. 6.1. Mancha cutánea

La melanina se sintetiza a partir de la tirosina (Pons y Parra, 1995; Soler, 2004), transformándose en 3,3-dihidroxifenilalanina (dopa) y ésta en dopaquinona, para finalmente producirse la melanina. El cobre juega un papel muy importante como factor coenzimático de la tirosinasa y también de la dopacromotautomerasa, estando ambas enzimas directamente involucradas en el proceso de formación de melanina.

La aparición de manchas puede deberse a una exposición a la radiación UV solar, pudiendo provocar las llamadas “manchas solares”; por el paso de los años, produciendo las “manchas seniles”; o por un problema hormonal, durante el embarazo o por la toma de algún medicamento como los anticonceptivos, pudiendo aparecer los “melasmas” (Grimes, 1995; Kauh y Zachian, 1999; Rendon, 2004; Ting y Barankin, 2005) (también llamados “cloasmas”).

Otro factor importante es la genética heredada, predisponiendo al sujeto a padecer estas alteraciones o dotándole de pecas o lunares.

Las zonas del cuerpo más afectadas suelen ser el rostro, las manos y el escote, ya que se trata de las zonas más desprotegidas y expuestas al sol.

Este desorden puede reducirse mediante el uso de los llamados productos cosméticos para el blanqueamiento de la piel. Estos productos contienen diferentes compuestos químicos, que producen un aclarado de la piel, de modo que inhiben la biosíntesis de melanina a través de varios mecanismos, dependiendo del agente despigmentante en cuestión (Cabanés et al., 1994; Briganti et al., 2003; Petit y Piérard, 2003a; Kim y Uyama, 2005).

Los productos cosméticos para el blanqueamiento de la piel suelen también incorporar productos químicos exfoliantes como los α -hidroxiácidos (ácido glicólico, láctico o málico) o β -hidroxiácidos (ácido salicílico). Su misión es realizar una limpieza profunda eliminando las células muertas de la piel, favoreciendo así la acción de los agentes despigmentantes (Ghadishah y Gorchynski, 2002; Bernett y Herderson, 2003; Monheit, 2004). Además, suelen incorporar distintos filtros UV para proteger la zona a tratar de la radiación solar y evitar la reaparición o intensificación de las manchas (Piamphongsant, 1998).

6.2. Tipos de agentes despigmentantes

Entre los agentes despigmentantes más utilizados cabe destacar el ácido ascórbico (AA), el ácido azelaico (AZ), el ácido fítico (AFI), el ácido kójico (AK), el retinol (RE), la arbutina (AR) y la hidroquinona (HQ) (y sus éteres monometílico (HQMM), monoetilico (HQME) y monobencílico (HQMB)) (Chisvert et al., 2007).

Debido a la facilidad de oxidación del AK, se suele también emplear un derivado mucho más estable, el denominado kójico dipalmitato (KD). También, el AA se oxida con facilidad. Para evitar en lo posible su degradación se han desarrollado diferentes derivados como el ascorbil palmitato (AP), el ascorbil fosfato (AF) (sódico o magnésico) y el ascorbil glucósido (AG). Cabe destacar, que dichos derivados presentan diferente solubilidad que los compuestos originales, permitiendo así una mayor flexibilidad a la hora de formular nuevos preparados cosméticos.

A continuación se muestran los nombres químicos y la nomenclatura INCI (Nomenclatura Internacional de Ingredientes Cosméticos) de los agentes despigmentantes más empleados.

Tabla 6.1. Listado de agentes despigmentantes.

Nombre químico	Nomenclatura INCI*
L-ácido ascórbico	Ácido ascórbico
Ácido nonanodioico	Ácido azelaico
Myo-inositol 1, 2, 3, 4, 5, 6-hexakis(dihidrogenofosfato)	Ácido fítico
5-hidroxi-2-hidroximetil-4-pirona	Ácido kójico
4-hidroxifenil-β-D-glucopiranosido	Arbutina
Ácido 2-fosfo-L-ascórbico sal sódica o magnésica	Ascorbil fosfato sódico o magnésico
Ácido 2-glucósido-L-ascórbico	Ascorbil glucósido
Ácido 6-O-palmitoil-L-ascórbico	Ascorbil palmitato
Hidroquinona (y sus éteres)	Hidroquinona (y sus éteres)
5-hidroxi-2-hidroximetil-4-pirona éster dipalmítico	Kójico dipalmitato
Retinol	Retinol

*Nomenclatura Internacional de Ingredientes Cosméticos.

A continuación se describen con mayor detalle los distintos agentes despigmentantes de mayor interés.

Hidroquinona y derivados

La HQ y sus éteres HQMM, HQME y HQMB fueron los primeros agentes despigmentantes utilizados. Su eficacia está sobradamente demostrada (Yoshimura et al., 2002; Petit y Piérard, 2003b; Rendon, 2004; Abramovits et al., 2005). Su intervalo de concentración habitual se sitúa entre el 2% y el 5%. Su mecanismo de acción es la interferencia en la formación, mecanización y degradación de los melanosomas (orgánulos del melanocito).

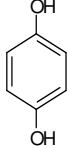
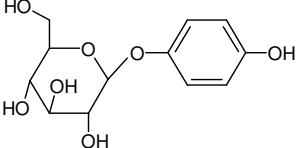
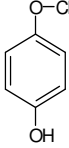
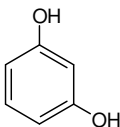
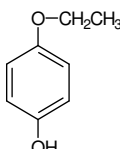
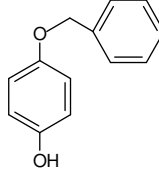
<p>Hidroquinona (HQ)</p> 	<p>Arbutina (AR)</p> 	<p>Hidroquinona monometil eter (HQMM)</p> 
<p>Resorcinol (RS)</p> 	<p>Hidroquinona monoetil eter (HQME)</p> 	<p>Hidroquinona monobencil eter (HQMB)</p> 

Fig. 6.2. Estructura química de los agentes despigmentantes de la familia de la HQ

A pesar de la eficacia que presentan estos agentes despigmentantes, su uso debe realizarse con mucha precaución ya que se han descrito diversos efectos secundarios. La hidroquinona es el principio despigmentante que más problemas ha presentado. Existen múltiples evidencias de casos de ocronosis tras su utilización prolongada (Findlay y Debeer, 1980; Schulz et al., 1988; Jordaan y Mulligan, 1990; Weiss et al., 1990; Jordaan y Vanniekerk, 1991; Adebajo, 2002). Además, puede ocasionar serios desórdenes cutáneos (irritación, alergias, dermatitis...) (Mahe et al., 1994; Sylla et al., 1994; Del Giudice et al., 2003; Mahe et al., 2003). Por otro lado, se ha demostrado la absorción percutánea de HQ (Wester et al., 1998) y su presencia en los fluidos biológicos (Deisinger et al., 1996), de forma que se agrava su potencial toxicidad. Finalmente, diversos autores han puesto de manifiesto las propiedades cancerígenas a largo plazo de esta molécula (Kari et al., 1992; Joseph et al., 1998; Harvey et al., 2002; Do Ceu Silva et al., 2003; Gaskell et al., 2004; Kooyers y Westerhof, 2004; Eastmond et al., 2005; Gaskell et al., 2005; Terasaka et al., 2005; Li et al., 2006).

Por todo ello, en el marco de la Unión Europea el uso de hidroquinona en productos cosméticos en general está prohibido desde marzo de 2000 por la Directiva 2000/6/CE, quedando su uso restringido a los colorantes de oxidación para el tinte del cabello con una concentración máxima permitida

del 0,3% y a los sistemas de uñas artificiales con una concentración máxima del 0,02%. No obstante, sí que está permitido su uso en especialidades farmacéuticas, las cuales se utilizan en los casos más extremos.

El resorcinol (RS) es un isómero de la HQ, que presenta los hidroxilos en posición meta. Se incluía anteriormente en las formulaciones cosméticas para el blanqueamiento de la piel ya que presenta propiedades como exfoliante químico y una cierta acción bactericida (Hernández-Pérez, 1990; Baumann, 2002). Además, también se le ha atribuido cierto poder despigmentante (Kubo et al., 1994; Sakuma et al., 1999). Actualmente se prohíbe su uso en productos cosméticos en general y sólo se permite en colorantes de oxidación para el tinte del cabello (concentración máxima autorizada del 5%) y en lociones para el cabello y champúes (concentración máxima autorizada del 0,5%) (Directiva 76/768/CEE, 1976). La prohibición se basa en estudios que demuestran su toxicidad sistémica y el riesgo de provocar dermatitis de contacto (Hernández-Pérez, 1990; Guerra et al., 1992; Baumann, 2002; Sosted et al., 2004).

A pesar de su prohibición, recientemente se detectaron fraudes por uso de hidroquinona y resorcinol en cosméticos que habían producido problemas dermatológicos en usuarios. Gracias a la detección y cuantificación de estos principios activos, en la que participó el grupo de investigación en el que se integra el doctorando, se pudo ordenar judicialmente la retirada del producto del mercado.

La arbutina (AR) es el derivado glucosilado de la HQ (ver figura 6.2), se trata de un agente despigmentante eficaz (Maeda y Fukuda, 1991; Nishimura et al., 1995a; Tanimoto et al., 2006). Su mecanismo de acción es la competición con la dopa por los receptores de la tirosinasa (proceso clave en la formación de la melanina). Este derivado es muy utilizado actualmente. Se introduce en las formulaciones cosméticas como producto de síntesis artificial o mediante extractos vegetales naturales que contienen la molécula (*Arctostaphylos uva ursi* y *Arbutus unedo*). En comparación con la HQ, la AR no presenta efectos adversos tras su uso y no existen restricciones legales para su utilización.

Ácido kójico y kójico dipalmitato

El AK es otro de los despigmentantes más utilizados de eficacia comprobada (Maeda y Fukuda, 1991); se suele formular en un intervalo de concentración entre el 0,05% y 4%. Su actividad es consecuencia de su

acción quelante del cobre y de la inhibición resultante del sistema tirosinasa. Según Cabanes et. al., 1994, el AK inhibe la actividad catecolasa de la tirosinasa.

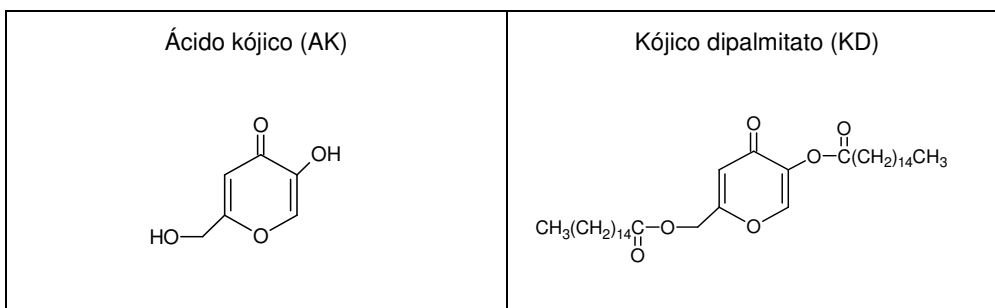


Fig. 6.3. Estructura química del ácido kójico (AK) y del kójico dipalmitato (KD)

A pesar de su amplia utilización, presenta dificultades para conseguir su correcta estabilización en las formulaciones cosméticas, y que posee una gran facilidad para oxidarse, viéndose acelerada la reacción en presencia de luz, calor e iones metálicos (Nishimura et al., 1995b; Majmudar et al., 1998; Gallarate et al., 2004). Existen estudios que prueban que su actividad inhibidora de la tirosinasa decrece rápidamente al cabo de un día si permanece expuesto al aire (Kim et al., 2004).

Recientemente, el AK está siendo sustituido en las formulaciones cosméticas por su éster dipalmitico (KD) (ver figura 6.3).

El KD es un principio activo con propiedades despigmentantes de carácter liposoluble, mucho más estable a la luz, al calor y a los iones metálicos que el AK. Se suele introducir en las modernas formulaciones cosméticas en un rango de concentraciones entre el 1% y el 5%. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la tirosinasa (Rothe de Arocha, 2003), ya que el KD puede ser transformado en AK por la esterasa tras su absorción por las células de la piel, actuando como un AK generado *in situ* (Aparecida-Nicoletti et al., 2002).

El AK es menos agresivo que la HQ, pero no está exento de efectos secundarios. Se han descrito casos de alergia por contacto tras su uso (Nakagawa et al., 1995) y se han observado propiedades cancerígenas en ratas de laboratorio en estudios de ingestión oral (Fujimoto et al., 1998; Takizawa et al., 2003; Takizawa et al., 2004). En cambio, en la búsqueda

bibliográfica realizada no se han encontrado datos de ningún tipo de efecto adverso tras el uso de KD en humanos.

No existen restricciones legales para el uso de AK ni de KD en cosméticos.

Ácido ascórbico y derivados

El AA es uno de los principios activos más interesantes, ya que además de presentar una acción despigmentante sobre la piel, le aporta luminosidad, previene las arrugas, estimula la formación de colágeno (Humbert et al., 2003; Chiu y Kimball, 2003; Raschke et al., 2004; Farris, 2005) y tiene unos importantes efectos antioxidantes y antirradicales libres (Kroyer, 1999; Fujinami et al., 2001; Raschke et al., 2004; Farris, 2005; Masatsuji-Kato et al., 2005). Por todo ello, el AA es un importante agente antienvjecimiento.

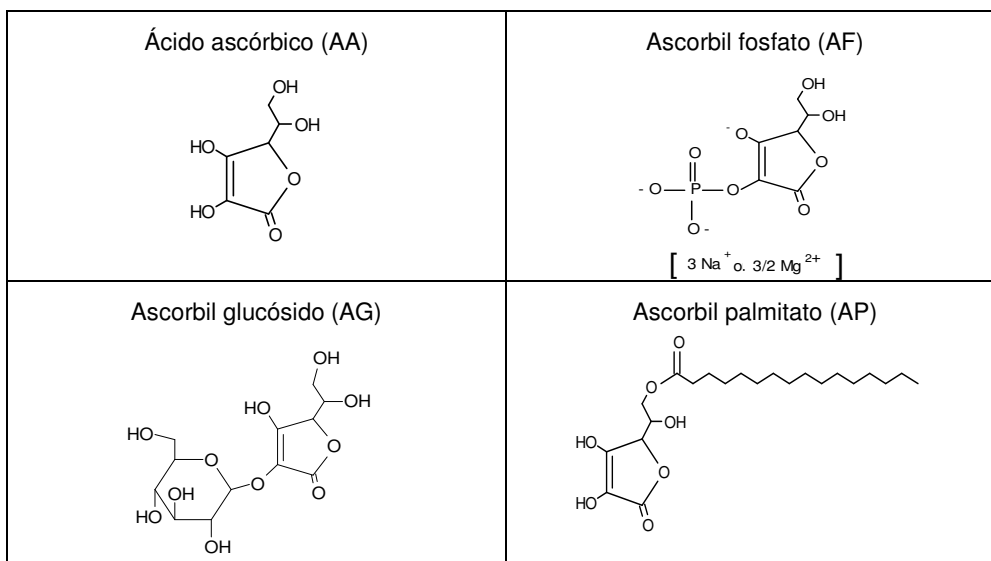


Fig. 6.4. Estructura química de los agentes despigmentantes de la familia del ácido ascórbico (AA)

Las propiedades despigmentantes del AA se deben a su capacidad para inhibir el sistema enzimático tirosinasa, crucial para el proceso de síntesis de melanina por los melanocitos. Además, presenta una buena eficacia

para el aclarado de las manchas ya formadas. Existen varios artículos publicados sobre la acción despigmentante del AA (Espinal-Perez et al., 2004; Raschke et al., 2004; Farris, 2005; Ehrlich et al., 2006).

No obstante, el uso del AA en los productos cosméticos se ve limitado por la gran inestabilidad que presenta la molécula, ya que se degrada por la luz, el calor, la presencia de oxígeno y de metales (Austria et al., 1997; Gallarate et al., 1999; Farahmand et al., 2006). Para evitar el deterioro del producto y asegurar la presencia del principio activo en el cosmético se han utilizado dos estrategias. Por un lado se han diseñado nuevas formulaciones con diferentes matrices para conseguir estabilizar el ácido ascórbico. Así, en la bibliografía se pueden encontrar trabajos en los que, con este fin, se proponen emulsiones multifase agua/aceite/agua (Gallarate et al., 1999) y aceite/agua/aceite (Farahmand et al., 2006).

Por otro lado, existen diferentes derivados del ácido ascórbico que presentan una mejor estabilidad y son fácilmente incorporables en los productos cosméticos. Los más utilizados son el AF, el AG y el AP.

Como se muestra en la figura 6.4 el AP presenta un grupo palmitato en la posición 6 que le confiere su carácter lipófilo. El AP es más estable que el AA (Austria et al., 1997), pero no garantiza su estabilidad en el producto acabado (Austria et al., 1997; Spiclin et al., 2001; Spiclin et al., 2003) ya que, al igual que el AA, presenta el grupo enediol desprotegido. Actualmente se utiliza como antioxidante (Lanigan, 1999; Fujinamiet al., 2001).

El AF en su forma sódica o magnésica es uno de los derivados del AA más estudiado. Se trata de una molécula de carácter hidrófilo. Existen diversos trabajos que avalan su estabilidad tanto en disolución como en distintas emulsiones (Austria et al., 1997; Spiclin et al., 2001; Spiclin et al., 2003). Como se puede observar en la figura 6.4 el grupo fosfato se encuentra enlazado en la posición 2, quedando así protegido el grupo enediol. El AF presenta una notable actividad despigmentante (Sakuma et al., 1993; Tagawa et al., 1993; Kameyama et al., 1996; Majmudar et al., 1998; Kawada et al., 2002; Miyamoto et al., 2002), estimula la formación de colágeno (Marionnet et al., 2005) y actúa contra los radicales libres (Fujinami et al., 2001; Masatsuji-Kato et al., 2005). Como se puede observar el AF tiene las mismas propiedades que el AA, lo que es debido a que el grupo fosfato es eliminado en las células cutáneas por la enzima fosfatasa, liberándose *in situ* el AA (Sakuma et al., 1993; Kumano et al., 1998).

El AG es otro derivado de carácter hidrófilo que presenta su grupo glucósido en la posición 2, lo que le confiere una gran estabilidad. Según

datos suministrados por fabricantes, el AG es muy estable al calor, al pH y a la presencia de cationes cobre. El AG también presenta actividad despigmentante (Kumano et al., 1998; Hakozaiki et al., 2006), estimula la formación de colágeno (Marionnet et al., 2005) y posee actividad antirradicales libres (Kumano et al., 1998; Fujinami et al., 2001; Masatsujikato et al., 2005). El grupo glucósido del AG es eliminado por la enzima α -glucosidasa en las células cutáneas, liberándose *in situ* el AA (Kumano et al., 1998).

Tanto la utilización del AA como la de sus derivados en productos cosméticos se considera segura (Lanigan, 1999; Andersen, 2005) y los tratamientos con AA son bien tolerados (Humbert et al., 2003; Espinal-Pérez et al., 2004; Ehrlich et al., 2005). Sólo se ha descrito un caso de aparición de efectos secundarios tras la utilización del AA en un voluntario de entre un total de 16 (Espinal-Pérez et al., 2004). En la búsqueda bibliográfica realizada no se ha encontrado constancia de ningún otro caso de aparición de efectos perjudiciales para los usuarios de cosméticos, tanto en el uso de AA como en el de sus derivados.

Ácido azelaico, ácido fítico y retinol

El AZ también es muy utilizado por sus propiedades despigmentantes (Graupe et al., 1996; Breathnach, 1996). Su mecanismo de acción esta basado en su poder quelante del cobre inhibiendo la actividad del conjunto tirosinasa, actuando complementariamente como un agente citotóxico del melanocito. Las concentraciones habitualmente empleadas no suelen provocar graves efectos adversos (Draelos, 2004); sólo se han detectado eritemas moderados e irritaciones transitorias.

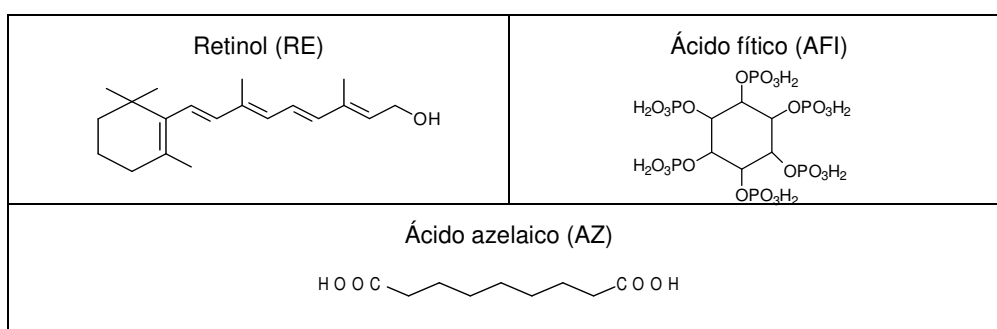


Fig.6.5. Estructura química del ácido azelaico (AZ), ácido fítico (AFI) y retinol (RE)

El AFI, al igual que el AZ, posee propiedades despigmentante (Soler, 2004), gracias a su poder quelante del cobre. Su concentración habitual oscila entre el 1 y el 2% y no se han detectado efectos secundarios tras su uso, ya que no es irritante.

El RE es un principio activo muy utilizado en cosmética. Además de su actividad blanqueante y sus propiedades exfoliantes, es un potente activo antiedad (Kawada, 2008; Miller 2008). Si se aplica en concentraciones demasiado elevadas puede provocar irritación, aunque generalmente es bien tolerado.

Hoy en día se cuenta con diferentes principios activos eficaces, pero son las combinaciones entre ellos las que están dando los mejores resultados (Perez-Bernal et al., 2000; Holder y Richards, 2004; Stratigos y Katsambas, 2004; Rendon y Gaviria, 2005).

Por todo ello, es de gran interés la puesta a punto de métodos analíticos que permitan realizar un control de calidad de los productos cosméticos para el blanqueamiento de la piel, para poder garantizar tanto la eficacia del producto como la seguridad de los usuarios.

6.3. Antecedentes y estado actual de la determinación de agentes despigmentantes en productos cosméticos para el blanqueamiento de la piel

En una búsqueda bibliográfica empleando las bases de datos Analytical Abstracts, Web of Knowledge y ScienceFinder Scholar, desde el año 1976 hasta abril de 2008, se han encontrado 46 publicaciones referentes a la determinación de agentes despigmentantes en productos cosméticos. En la siguiente tabla se muestran estas publicaciones con los agentes despigmentantes determinados y la técnica analítica empleada.

Tabla 6.2. Artículos publicados en los que se determinan agentes despigmentantes en productos cosméticos (orden cronológico)

Autor	Analito ^a	Matriz	Preparación de la muestra	Técnica analítica ^b
Vicente et al., 1985	AP			CL-UV/vis, columna C18
Firth y Rix, 1986	HQ	Crema		CL-UV/vis, columna C18, fase móvil isocrática metanol:agua
Herpol-Borremans y Masse, 1986	HQ y sus éteres			CL-UV/vis, columna C18 a 36 °C, fase móvil isocrática metanol:agua
Gagliardi et al., 1987	HQ y sus éteres		Se disuelve en MeOH, se calienta a 50°C y se centrifuga	CL-UV/vis, columna C18, fase móvil isocrática acetonitrilo:agua
Teglia, 1989	AR, HQ			CL-UV/vis, columna C18
Kikuchi et al., 1990	AF			CL-UV/vis, columna C18, la separación se lleva a cabo mediante pares iónicos
Sakodinskaya et al., 1992	HQ y sus éteres	Crema	Se agita con metanol:agua en caliente y se filtra	Cromatografía micelar electrocinética
Irache et al., 1993	AA			CL-UV/vis, columna C18
Feroli et al., 1994	AZ		Etapas de derivatización del analito (incorporando un cromóforo)	CL-UV/vis
Gatti et al., 1995	AZ	Loción y polvos	Se disuelve en metanol, se centrifuga y se filtra. Se realiza la derivatización del analito (incorporando un fluoróforo).	CL-FL
Semenzato et al., 1995	AF	Crema	Se diluye en tetrahidrofurano:tampón fosfato pH 4	CL-UV/vis, columna NH ₂ , fase móvil acetonitrilo:tampón fosfato pH 4
Wang, 1995	HQ y sus éteres	Crema		Voltametría, electrodos de pasta de carbón
Scalia et al., 1997	AZ		Se realiza una etapa de extracción en fase sólida (SAX)	CL-UV/vis, columna C18, fase móvil acetonitrilo:tampón fosfato
Brandolini et al., 1998	AA			Electroforesis

(Continúa)

Tabla 6.2. (Continuación)

Autor	Analito ^a	Matriz	Preparación de la muestra	Técnica analítica ^b
Sottofattori et al., 1998	AF,AP	Creimas	Se disuelve en tetrahidrofurano: tampón fosfato pH 3,5	CL-UV/vis, columna CN, fase móvil con gradiente metanol:tampón fosfato pH 3,5
Borremans et al., 1999	HQ			CL-UV/vis
Shih y Zen, 1999a	AK	Creimas y lociones	Se disuelve en agua, se filtra y se ajusta a pH=10	Voltametría
Shih y Zen, 1999b	AF			Voltametría
Cruz-Vieira y Fatibello-Filho, 2000	HQ	Creimas	Se disuelve en metanol	Voltametría cíclica, biosensor
Desiderio et al., 2000	HQ y sus éteres	Creimas	Se mezcla en metanol:agua, se calienta y se filtra	Electrocromatografía capilar, columna capilar C18, uso de tampón acetato amónico pH 6 y acetonitrilo
Fatibello-Filho y Cruz-Vieira, 2000	HQ	Creimas	Se disuelve en metanol	Voltametría cíclica, biosensor
Shih y Zen, 2000	AR	Creimas	Se disuelve en agua y se ajustan a pH=10	Voltametría
Sottofattori y Anzoldi, 2000	AF,AP, AK	Creimas		CL-UV/vis, columna CN
Masse et al., 2001	AR y AK	Creimas	Se dispersa en acetonitrilo, se aplica ultrasonidos y se centrifuga	CL-UV/vis, columna diol, fase móvil acetonitrilo: tampón fosfato pH 2,5
Shih, 2001	AK,AF	Creimas y lociones	Se extrae con agua y se filtra	CL-UV/vis, columna C18, fase móvil metanol: tampón fosfato pH 5 (empleo de pares iónicos)
Mansour y Ibrahiem, 2002	AZ			CL-UV/vis, longitud de onda de medida de 220 nm.
Zhang et al., 2002	HQ		Se disuelve en etanol y se aplica ultrasinidos	CG-EM
Chang y Chang, 2003	AR,AF, AA	Creimas, geles y lociones	La separación cromatográfica se lleva a cabo mediante pares iónicos	CL-UV/vis, columna C18, fase móvil metanol: tampón fosfato pH 2,5 (empleo de pares iónicos)

(Continúa)

Tabla 6.2. (Continuación)

Autor	Analito ^a	Matriz	Preparación de la muestra	Técnica analítica ^b
Rueda et al., 2003	HQ	Cremas		FI-Amperometría, electrodo de grafito
Corominas, 2004	HQ			Quimioluminiscencia
Hg et al., 2004	AP			Cromatografía capa fina con detección fluorimétrica, se emplea cloroformo
Huang et al., 2004	AG,AR, HQ,AK, AF		Se extrae con un tampón fosfato de pH=2,5	CL-UV/vis, columna C18, fase móvil metanol: tampón fosfato pH 2,5
Liu, 2004	AR, AK, AF			CL-UV/vis
Chang y Chang, 2005	AA,AF, AP		Electrodo compuestos por una resina epoxídica y grafito	Voltametría
García et al., 2005	HQ			CL-UV/vis
Lin et al.,2005a	AR	Cremas y lociones	Se diluye con agua	Microdiálisis-CL-UV/vis, fase móvil metanol: tampón fosfato pH 5,5
Lin et al., 2005b	HQ		Se diluye con agua	Microdiálisis-CL-UV/vis
Shih et al., 2005	AR			FIA-Electrodo
López-García et al., 2005	HQ	Cremas y geles	Método 1: Se disuelve en la fase móvil. Método 2: Se disuelve en en ácido sulfúrico 0,05 M	Método 1: CL-UV/vis, columna C18 a 25 °C, fase móvil metanol: agua Método 2: Espectrometría UV derivada
Xie et al., 2005	AK		Se extrae con metanol:agua y se aplica ultrasonidos	CL-UV/vis, columna C18, fase móvil metanol: tampón fosfato (empleo de pares iónicos)
Lin et al., 2006	AG			Microdiálisis-CL-UV/vis
Maia et al., 2006	AA			CL-UV/vis, columna C18
Varvaresou et al., 2006	AF			CL-UV/vis, columna C18 (separación por pares iónicos)
*Balaguer et al., 2007	KD	Cremas	Se disuelve en tetrahidrofurano	CL-UV/vis, columna de exclusión molecular, fase móvil tetrahidrofurano

(Continúa)

Tabla 6.2. (Continuación)

Autor	Analito ^a	Matriz	Preparación de la muestra	Técnica analítica ^b
*Balaguer et al., 2008	AF, AG, AA, AP	Cremas	Se disuelve en etanol: tampón fosfato pH 3 (conteniendo NaCl), se aplica ultrasonidos y se filtra	CL-UV/vis, fase móvil con gradiente etanol:tampón fosfato
*Chisvert et al., 2008	HQ, RS, AZ, AK, AR	Cremas	Se disuelve en dimetilformamida, se aplica ultrasonidos, se filtra y se derivatiza	CG-EM

* Artículos publicados por el grupo de investigación en el que se ha desarrollado esta Tesis Doctoral

^a HQ, hidroquinona; AR, arbutina; AZ, ácido azelaico; AK, ácido kójico; KD, kójico dipalmitato; RS, resorcinol; AA, ácido ascórbico; AG, ascorbil glucósido; AF, ascorbil fosfato; AP, ascorbil palmitato

^b CL-UV/vis, cromatografía líquida con detección espectrofotométrica UV/vis; CL-FL, cromatografía líquida con detección fluorimétrica; CG-EM, cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas; FIA, análisis por inyección en flujo; C18, relleno octadecilo en base sílice; CN, relleno cianopropilo en base sílice; NH₂, relleno amino propilo en base sílice

En ninguno de los métodos anteriores a esta Tesis Doctoral se utilizaron disolventes inocuos, sino disolventes orgánicos de elevada toxicidad.

Existe un método oficial de análisis para la identificación y determinación de HQ (Directiva 95/32/EEC), que data de cuando todavía no estaba prohibido su uso. Se basa en una cromatografía en capa fina para la identificación y una cromatografía líquida con detección UV/vis para su determinación. En ambos casos se utilizan disolventes orgánicos de elevada toxicidad (cloroformo, dietiléter, metanol, tetrahidrofurano). Para el uso de estos métodos no se requerían límites de detección excesivamente bajos puesto que la hidroquinona no estaba prohibida. También hay que considerar que sólo se separaba la hidroquinona de la matriz de la muestra y no de otros despigmentantes ya que se utilizaba sola en las formulaciones.

Por otro lado, cabe destacar que no existen métodos oficiales para la identificación ni determinación en productos cosméticos del resto de los analitos objeto de estudio en este trabajo, a excepción de un método para la determinación de resorcinol en champúes y lociones capilares, basado en la separación en capa fina, raspado, extracción con metanol y determinación por cromatografía de gases tras sililación (Directiva 82/434/EEC).

Cabe destacar que el control analítico de la composición de las cremas despigmentantes es muy importante, puesto que debe garantizarse al consumidor que el producto sea eficaz, es decir, que contenga una concentración mínima necesaria para que sea efectiva, y que el producto sea seguro para su salud, no sobrepasando unos determinados niveles de concentración para minimizar los posibles efectos secundarios. Además, es imprescindible que los productos cumplan la legislación actual; por tanto, es necesaria la identificación de sustancias prohibidas en cremas despigmentantes, como la hidroquinona y el resorcinol, así como la cuantificación del resto de agentes despigmentantes para su control de calidad.

Capítulo 7

Desarrollo de un método analítico para la determinación de hidroquinona, ácido kójico, ácido azelaico, resorcinol y arbutina en productos cosméticos para el blanqueamiento de la piel mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y mediante cromatografía líquida con detección espectrofotométrica UV/vis

Parte de este capítulo ha sido aceptado para su publicación en NCP-Boletín de la Sociedad Española de Químicos Cosméticos, y otra parte ha sido enviada a Analytica Chimica Acta, y se encuentra en proceso de censura.

7.1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO DEL TRABAJO

Entre los agentes despigmentantes más empleados hasta el momento en los productos cosméticos para el blanqueamiento de la piel se encuentra el ácido kójico (AK), el ácido azeláico (AZ), la arbutina (AR) y la hidroquinona (HQ). El resorcinol (RS) también presenta propiedades despigmentantes, aunque ha sido más utilizado por sus propiedades exfoliantes. A continuación se muestran las estructuras químicas de estos compuestos.

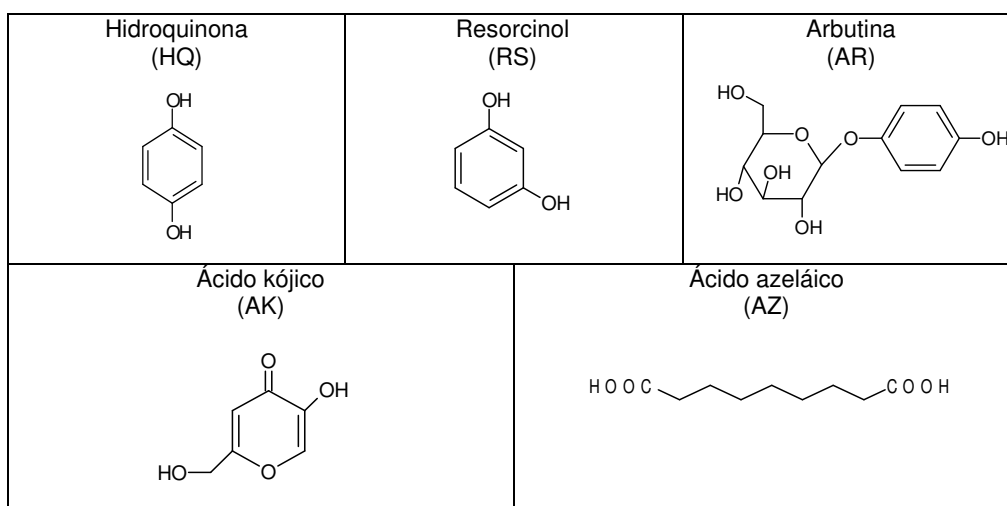


Fig.7.1. Estructura química de la hidroquinona (HQ), resorcinol (RS), arbutina (AR), ácido kójico (AK) y ácido azeláico (AZ)

A pesar de su eficacia, el uso de estos compuestos puede ocasionar ciertos problemas. Como se expone en el capítulo 6 de la presente Tesis Doctoral, la HQ en productos cosméticos para el blanqueamiento de la piel está prohibida por la Directiva 2000/6/CE desde marzo de 2000. Esta decisión se encuentra respaldada por numerosos estudios que prueban sus propiedades cancerígenas a largo plazo (ver apartado 6.2). El RS también se encuentra igualmente prohibido ya que presenta toxicidad sistémica y un riesgo elevado de provocar dermatitis de contacto. Por otro lado, el AK presenta una gran facilidad de degradación y puede causar reacciones alérgicas. En el caso del AZ sólo se han descrito moderados efectos secundarios, tales como eritemas o irritaciones transitorias. Por el momento, no hay constancia de efectos adversos tras el uso de AR.

El control analítico de este tipo de productos es muy necesario, no sólo por los efectos perjudiciales que pueden presentar (sobre todo si se encuentran a concentraciones mayores que las recomendadas), sino también para comprobar que los compuestos se encuentran en los niveles de concentración necesarios que aseguren su eficacia. Además, es importante asegurar que los productos para el blanqueamiento de la piel no incluyen en su formulación sustancias prohibidas como HQ y RS.

Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue desarrollar métodos cromatográficos (cromatografía líquida (CL) con detección por espectrofotometría UV/vis y cromatografía de gases (CG) con detección por espectrometría de masas (EM)) para la determinación simultánea de AK y AR que, a menudo, se utilizan combinados en los productos despigmentantes, así como la determinación conjunta de éstos con HQ y RS, con fin de detectar posibles fraudes, ya que no están permitidos por la legislación actual, además se incorporó el AZ en el estudio por CG. Este objetivo se enmarca dentro de la justificación general de la segunda parte de la Tesis Doctoral descrita al inicio de dicha parte.

No existen métodos oficiales para la determinación de estos analitos en productos cosméticos despigmentantes, tan sólo existe un método oficial para la determinación de HQ (Directiva 95/32/EEC), pero empleando disolventes de elevada toxicidad y no teniendo en cuenta la posible interferencia de otros agentes despigmentantes que pudieran estar presentes. También existe un método oficial para la determinación de RS, pero solamente destinado al análisis de champúes y lociones capilares.

Cabe destacar que en la bibliografía no existen precedentes de su determinación conjunta.

7.2. PARTE EXPERIMENTAL

7.2.1. Metodología experimental

La metodología experimental para el desarrollo del método basado en cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas se puede resumir en tres etapas principales. En primer lugar se estudiaron los parámetros experimentales que influyen en la determinación cromatográfica con objeto de conseguir la resolución de los analitos en los menores tiempos de retención posibles y con adecuada repetibilidad de tiempos y valores de las áreas. Dado que los analitos son poco volátiles,

es necesario derivatizarlos en forma de trimetilsililéteres, de modo que también se estudió la cantidad necesaria de reactivo derivatizante para llevar a cabo la derivatización de los analitos. Por último, una vez desarrollado el método, se estudiaron sus parámetros analíticos y se analizaron diferentes muestras comerciales.

Para el desarrollo del método cromatográfico con detección espectrofotométrica en el UV/vis se hizo un estudio de las variables cromatográficas con objeto de conseguir la mayor resolución en los menores tiempos de retención posibles; se utilizaron distintas condiciones de elución y dos columnas de diferente longitud. Posteriormente se analizaron las muestras mediante el método propuesto.

Por último se compararon estadísticamente los resultados obtenidos por ambos métodos.

7.2.2. Aparatos y material

Se utilizó un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas Agilent (horno modelo 6890N, inyector automático modelo 7683 y detector modelo 5973N) (Mississauga, ON, Canada).

Se empleó una columna capilar Phenomen ZB-5ms (30 m longitud, 250 μm de diámetro interno y 0,25 μm de espesor de película, relleno 5% fenil, 95% dimetilpolisiloxano) de Phenomenex (Torrance, USA).

Se utilizó un cromatógrafo de líquidos marca Hitachi (bomba modelo L-7100, detector UV/vis modelo DAD L-7455) (Tokio, Japón), y una válvula de inyección Rheodyne® con bucle de 20 μl , así como una columna 60 RP-Select B LichroCART® (250 mm x 4 mm diámetro interno y 5 μm de tamaño de partícula) y una columna C₁₈ LichroCART® (125 mm x 4 mm diámetro interno y 5 μm de tamaño de partícula) de Merck (Darmstadt, Alemania).

Se utilizó un baño de ultrasonidos Selecta (Barcelona) para facilitar la extracción de los analitos.

7.2.3. Reactivos y muestras

Se emplearon los siguientes reactivos: arbutina (AR) (R>99%) (Bioland Ltd, Chungnam, Korea) y ácido kójico (AK) (R=99,2%), hidroquinona (HQ)

(R>99%), resorcinol (RS) (R>99%), ácido azelaico (AZ) (R>99%) y cafeína (CAF) (utilizado como patrón interno) (R=99,4%) (Guinama, Valencia).

Además, se empleó N,N-dimetilformamida (DMF) grado HPLC, etanol absoluto (EtOH) grado HPLC y ácido acético glacial grado HPLC (Scharlau Chemie, S.A Barcelona) y N,O-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) conteniendo 1% de trimetilclorosilano (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania).

Se utilizó helio, grado CG (Carbueros Metálicos S.A, Paterna (Valencia)).

El agua desionizada se obtuvo a través de un sistema NANOpure II de Barnstead (Boston, EEUU).

Se analizaron 9 muestras cosméticas comerciales. Por razones de confidencialidad no se indican los nombres de las casas comerciales.

Además, se analizaron 2 especialidades farmacéuticas (sí que está permitido el uso de HQ), *LicoStrata Gel* de Industrial Farmacéutica Cantabria (Santander, España) (muestra 10); *Pigmentasa Crema* de Laboratorios Viñas (Barcelona) (muestra 11).

Además, se preparó y analizó una muestra sintética fabricada en el laboratorio siguiendo un protocolo de fabricación de la empresa Guinama (Alboraya) descrito en el Apéndice III.4 (muestra 12). Para su elaboración se emplearon ingredientes de grado cosmético adquiridos en dicha empresa.

7.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.3.1. Determinación de hidroquinona (HQ), ácido kójico (AK), ácido azelaico (AZ), resorcinol (RS) y arbutina (AR) mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)

7.3.1.1. Estudio de los parámetros experimentales

Se estudiaron diversos parámetros propios de la cromatografía de gases tales como el caudal de portador, temperatura del horno, modo de inyección: con o sin división de flujo (*split/splitless*). También se estudió el modo de detección, evaluando las posibilidades de la detección en modo TIC (*Total Ion Chromatogram*) o SIM (*Selected Ion Monitoring*).

Tras observar que los analitos no eran suficientemente volátiles para su determinación directa por cromatografía de gases, se estudió la posibilidad de derivatizarlos. Para ello se propone el uso de BSTFA en medio DMF. De esta manera los grupos hidroxilo de los analitos incorporan un grupo trimetilsil, lo que les confiere una mayor volatilidad que permite su determinación por cromatografía de gases.

Debido a la toxicidad y precio del BSTFA empleado como reactivo derivatizante se realizaron estudios para intentar utilizar la cantidad mínima necesaria para llevar a cabo la derivatización de todos los analitos en cualquier muestra.

Para el estudio se pesaron 0,2 g de una de las muestras y se disolvieron en DMF con la ayuda de un baño de ultrasonidos. Se adicionaron alícuotas de todos los analitos en estudio para tener al menos $60 \mu\text{g ml}^{-1}$ de cada uno de ellos y finalmente se aforó a 10 ml con DMF. A continuación, se mezclaron $200 \mu\text{l}$ de la disolución de la muestra (ya filtrada) con $50 \mu\text{l}$ de una disolución de cafeína de $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ (como patrón interno) y se adicionaron volúmenes variables entre 25 hasta $200 \mu\text{l}$ de reactivo derivatizante, completando hasta $450 \mu\text{l}$ con DMF en todos los viales. Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

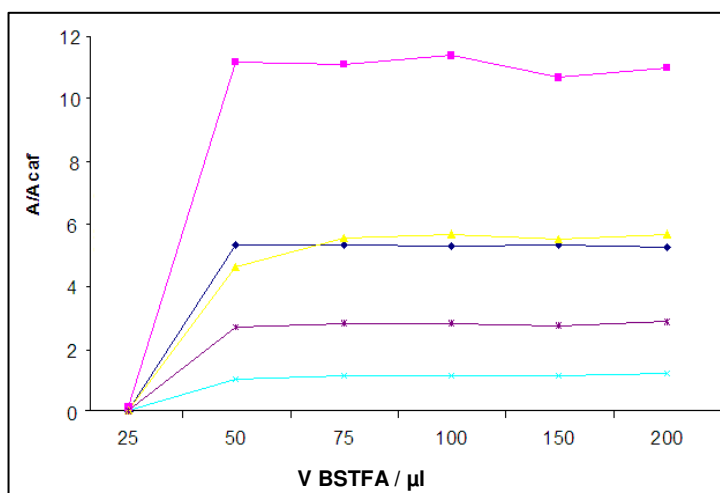


Fig. 7.2. Efecto del volumen de reactivo derivatizante en el cociente de las áreas de los analitos (A) y el patrón interno (A_{caf}) en CG-EM. (■) HQ; (▲) AK; (◆) RS; (*) AR; (x) AZ. Condiciones experimentales: $Q = 1 \text{ ml min}^{-1}$, $T_{\text{inicial}} = 120 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $\Delta T = 20 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ y $T_{\text{final}} = 280 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{interfase}}$ y $T_{\text{inyector}} = 280 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $V_{\text{inyección}} = 3 \mu\text{l}$ (modo *splitless*), detector en modo TIC

Como se puede apreciar, la cantidad mínima necesaria para derivatizar los analitos es de 75 μl puesto que no se observa un aumento de la señal al aumentar el volumen de reactivo derivatizante en ninguno de los analitos.

No obstante, con el fin de asegurar la derivatización de todos los analitos en cualquier muestra, se prefirió escoger un volumen de 100 μl para posteriores experimentos.

Efecto del caudal y de la temperatura

En estudios preliminares se observó que partiendo de una temperatura inicial de 120 $^{\circ}\text{C}$ y alcanzando finalmente los 280 $^{\circ}\text{C}$ se conseguía la elución de todos los analitos de la columna, pero con el fin de optimizar su separación cromatográfica en el menor tiempo posible se ensayaron diferentes rampas de temperatura (5, 10, 15 y 20 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$).

Los resultados se presentan en la figura 7.3.

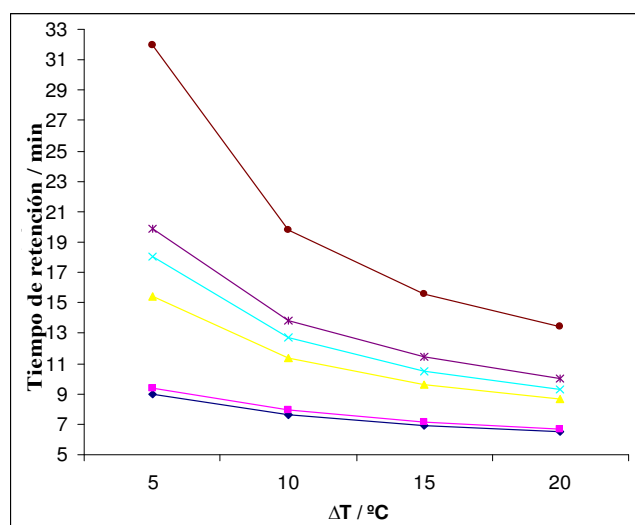


Fig. 7.3. Efecto del gradiente temperatura en el tiempo de retención de los analitos en CG-EM. (■) HQ; (▲) AK; (◆) RS; (*) AR; (x) AZ. $Q = 0,6 \text{ ml min}^{-1}$, $T_{\text{inicial}} = 120^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{final}} = 280^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{interfase}}$ y $T_{\text{inyección}} = 280^{\circ}\text{C}$, $V_{\text{inyección}} = 3 \mu\text{l}$ (modo *splitless*), detector en modo TIC

Tras observar una separación óptima, aún en las condiciones más drásticas, se realizó el estudio del caudal, incrementándolo a 0,8 y 1 ml

min⁻¹, empleando gradientes de temperatura de 15 y 20 °C min⁻¹. Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

Tabla 7.1. Estudio de las condiciones de separación de los analitos mediante CG-EM

Analito	Q = 0,8 ml min ⁻¹		Q = 1,0 ml min ⁻¹	
	ΔT=15 °C min ⁻¹ t _R / min	ΔT=20 °C min ⁻¹ t _R / min	ΔT=15 °C min ⁻¹ t _R / min	ΔT=20 °C min ⁻¹ t _R / min
RS	6,53	6,15	6,26	5,92
HQ	6,72	6,31	6,45	6,07
AK	9,19	8,26	8,9	8,01
AZ	10,08	8,93	9,79	8,68
CAF	10,65	9,41	10,35	9,15
AR	14,98	12,89	14,63	12,53
Resolución HQ, RS	1,91	1,48	2,29	1,50

Como se observa en la tabla 7.1, la resolución entre HQ y RS, que es el par de picos más cercanos entre sí, es buena y equivalente en las condiciones de ΔT=20 °C min⁻¹, Q=0,8 ml min⁻¹ y ΔT=20 °C min⁻¹, Q=1 ml min⁻¹.

Finalmente, se escogieron las condiciones de Q=1 ml min⁻¹ y ΔT=20 °C min⁻¹ ya que permitían la misma resolución y menores tiempos de desarrollo cromatográfico.

Por último, se estudió el modo de detección con el fin de mejorar la sensibilidad. En el modo SIM se consiguió una disminución de los límites de detección, que en algunos casos fue de hasta 6 veces respecto al modo TIC. Esto es debido al descenso del ruido de la línea base.

Por otro lado, se estudió el modo de inyección. Se seleccionó el modo *split* (división de flujo) ya que el equipo utilizado es de uso general y este modo de trabajo permite una mayor duración de la fuente en buen estado, sin necesidad de realizar limpiezas frecuentes. Se escogió una división de flujo de 1:20, que es el valor mínimo que se aconseja para el instrumento utilizado.

7.3.1.2. Método propuesto para la determinación de HQ, AK, AZ, RS y AR mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)

En base a los estudios precedentes, se propone el siguiente procedimiento experimental:

Homogeneizar la muestra y pesar entre 0,01-0,1 g en un matraz aforado de 10 ml (por triplicado) y disolver en aproximadamente 5 ml de DMF. Para acelerar la solubilización se puede emplear un baño de ultrasonidos. A continuación aforar con DMF. Finalmente, filtrar e introducir 200 µl en el vial de inyección.

Preparar disoluciones patrón conteniendo entre 5 y 130 µg ml⁻¹ de cada analito en DMF. De estas disoluciones tomar 200 µl e introducir en los viales de inyección.

Añadir a todos los viales 50 µl de cafeína de 700 µg ml⁻¹ preparada en DMF y 100 µl de reactivo BSTFA. Cerrar, agitar e inyectar en el sistema cromatográfico.

Emplear un volumen de inyección de 3 µl, en modo *split* (20:1). Trabajar con un caudal de He de 1 ml min⁻¹. La detección se lleva a cabo en modo SIM, monitorizando las siguientes relaciones masa-carga (m/z):

Tabla 7.2. Masas seleccionadas para el modo de detección SIM

Analitos	m/z		
RS	239	254	
HQ	239	254	
AZ	201	317	
AK	147	271	
AR	254	361	450
CAF	109	194	

La temperatura del inyector y de la interfase es de 280 °C.

Emplear el siguiente programa de temperatura: 120 °C (3 min), 20 °C min⁻¹, 280 °C (10 min).

A continuación se muestra un cromatograma obtenido de un patrón multicomponente.

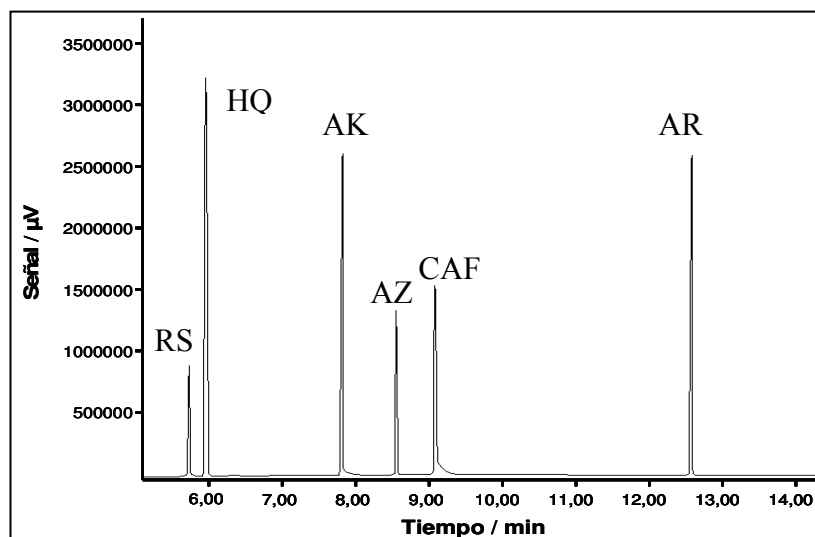


Fig. 7.4. Cromatograma de una disolución patrón multicomponente conteniendo $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ de HQ, AK, AZ, AR y $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ de RS; $107 \mu\text{g ml}^{-1}$ de CAF como patrón interno

7.3.1.3. Parámetros analíticos del método

Parámetros cromatográficos

Se estimó la precisión de las lecturas de los tiempos de retención y de las áreas mediante 5 medidas de una disolución patrón multicomponente de $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ de HQ, RS, AK, AZ y RS. A continuación se indican los resultados obtenidos que muestran una buena precisión en ambos casos y donde t_R es el tiempo de retención, s es la desviación típica de los resultados, A es el área del analito y A_{PI} la del patrón interno.

Tabla 7.3. Estudio de la repetibilidad de los valores de los tiempos de retención y del cociente de las áreas

	RS	HQ	AK	AZ	AR
$t_R \pm s / \text{min}$	$5,613 \pm 0,001$	$5,793 \pm 0,001$	$7,861 \pm 0,003$	$8,559 \pm 0,002$	$12,370 \pm 0,003$
$A/A_{PI} \pm s$	$1,662 \pm 0,007$	$1,35 \pm 0,02$	$3,60 \pm 0,03$	$0,573 \pm 0,004$	$0,291 \pm 0,003$

El coeficiente de variación para el cociente de áreas está entre 0,4% y 1,5%. Por tanto, presenta una buena precisión para llevar a cabo el análisis de este tipo de muestras.

Parámetros de calibración

En la tabla siguiente se indican los parámetros de las rectas de regresión obtenidas en el intervalo de concentraciones utilizado (5–125 $\mu\text{g ml}^{-1}$, excepto para RS que fue 1–25 $\mu\text{g ml}^{-1}$). **a** y **s_a** son la ordenada en el origen y su desviación típica; **b** y **s_b** son la pendiente y su desviación típica; **r** es el coeficiente de regresión y **s_{y/x}** la desviación típica de los residuales.

Tabla 7.4. Rectas de regresión representativas obtenidas para los analitos estudiados

	a ± s_a	b ± s_b / ml μg^{-1}	r²	s_{y/x}
RS	$-0,008 \pm 0,004$	$0,0501 \pm 0,0003$	0,9995	0,008
HQ	$-0,05 \pm 0,06$	$0,0622 \pm 0,0008$	0,9998	0,010
AK	$-0,02 \pm 0,05$	$0,0289 \pm 0,0006$	0,9995	0,009
AZ	$0,009 \pm 0,005$	$0,0097 \pm 0,0004$	0,9997	0,004
AR	$0,06 \pm 0,01$	$0,0356 \pm 0,0008$	0,9998	0,011

La sensibilidad del método, estimada mediante el valor de la pendiente de las curvas de calibración, se puede observar en la tabla anterior. Oscila entre 0,0097 y 0,0622 $\text{ml } \mu\text{g}^{-1}$.

En la siguiente tabla se muestran los límites de detección instrumentales estimados mediante el criterio $3 s_{y/x} / b$.

Tabla 7.5. Valores de los límites de detección para los diferentes analitos

Analito	LD / $\mu\text{g ml}^{-1}$
RS	0,5
HQ	0,5
AK	0,9
AZ	1,3
AR	1,0

Cabe destacar los límites de detección relativamente bajos obtenidos para la hidroquinona y el resorcinol, $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ y $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$, respectivamente (ambas sustancias prohibidas en productos cosméticos en general).

Estudio de la exactitud

Se aplicó el método propuesto a una muestra sintética preparada en el laboratorio según el protocolo descrito en el Apéndice III.4.

En la siguiente tabla se indican los valores de concentración hallados (**C**) y los valores reales (**C_{real}**).

Tabla 7.6. Comparación de los valores obtenidos en el análisis de la muestra sintética con los reales

	RS	HQ	AK	AZ	AR
C \pm s / %	0,62 \pm 0,03	0,99 \pm 0,03	1,10 \pm 0,04	2,21 \pm 0,05	2,32 \pm 0,02
C _{real}	0,60	1,01	1,07	2,17	2,31
Error / %	3	-2	3	2	0,4

Como se puede observar, el error relativo se encuentra entre 0,4 y 3%, lo que permite llevar a cabo de forma exacta la determinación de los analitos en este tipo de matrices.

A continuación se muestra el cromatograma obtenido de la muestra sintética.

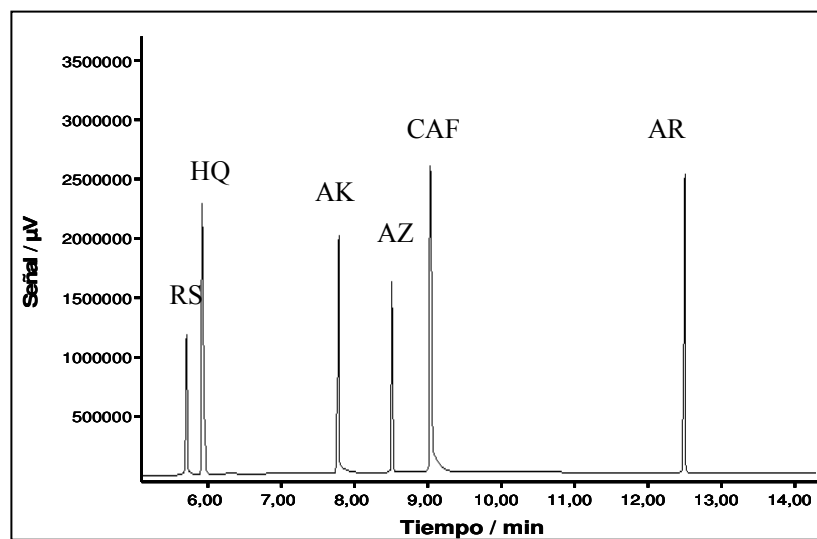


Fig. 7.5. Cromatograma correspondiente a la muestra sintética

7.3.1.4. Aplicación del método propuesto al análisis de productos cosméticos para el blanqueamiento de la piel comerciales

Se analizaron 11 muestras de cremas despigmentantes comerciales. En la figura 7.6 se muestran los cromatogramas de todas las muestras.

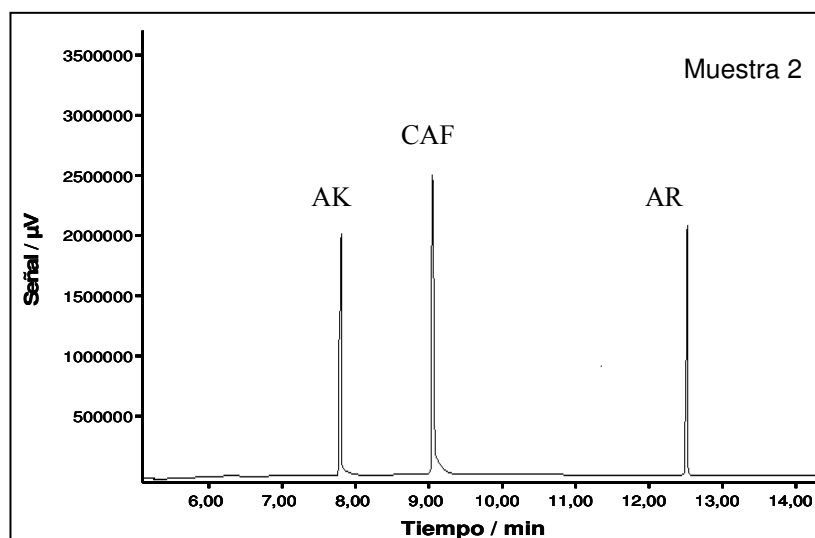
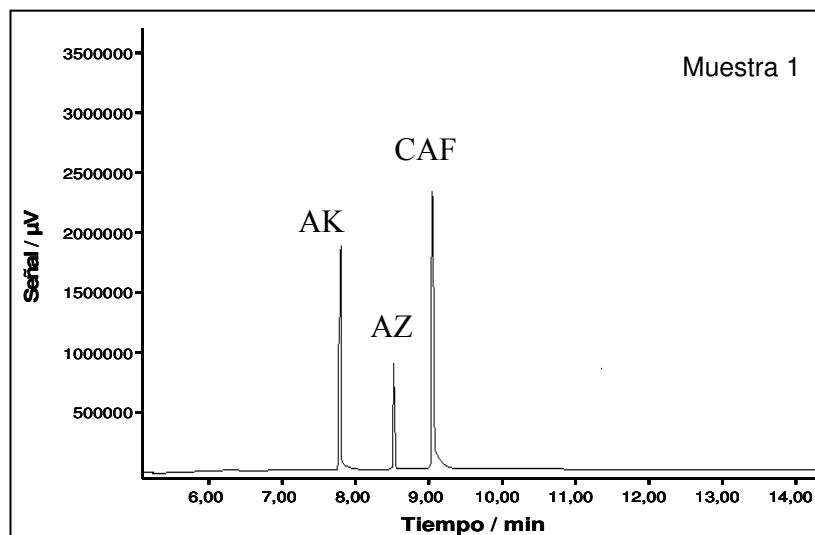


Fig. 7.6. Cromatogramas correspondientes a cada una de las muestras analizadas

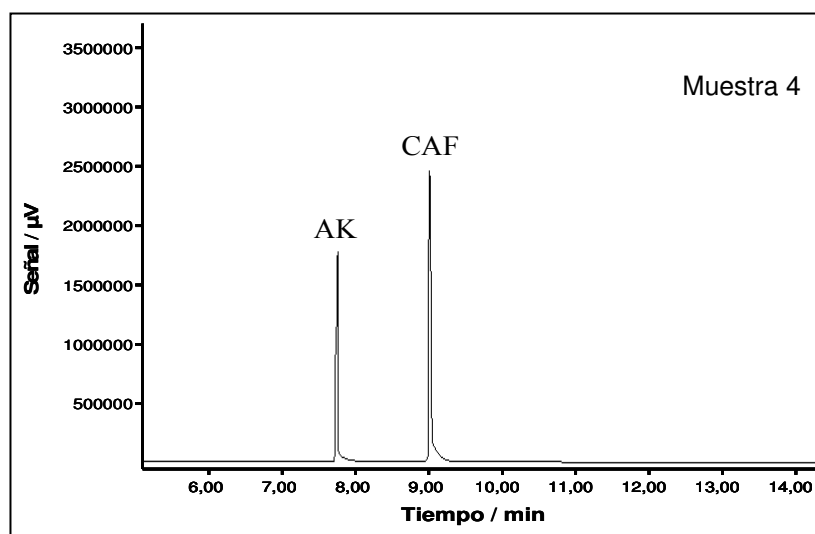
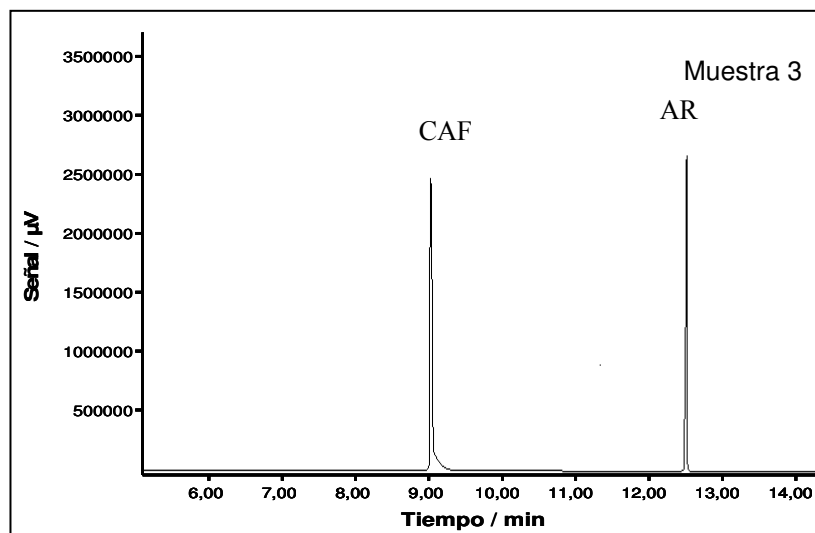


Fig. 7.6. (Continuación)

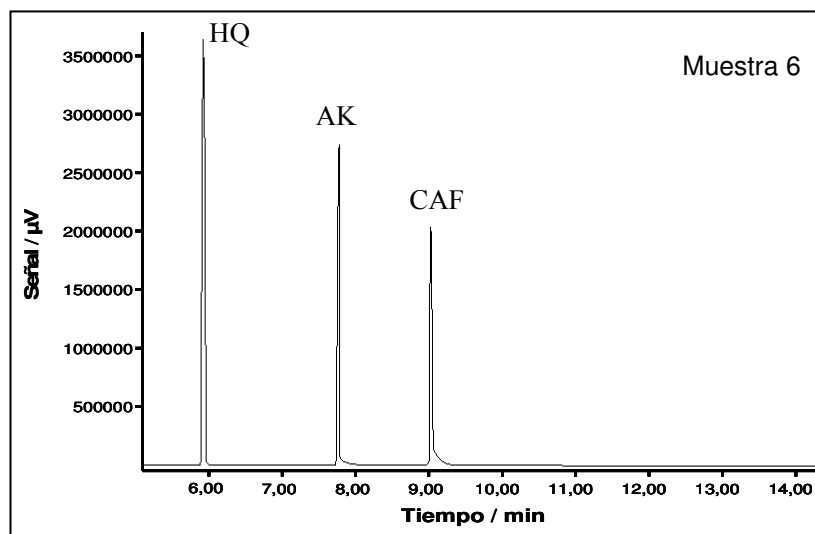
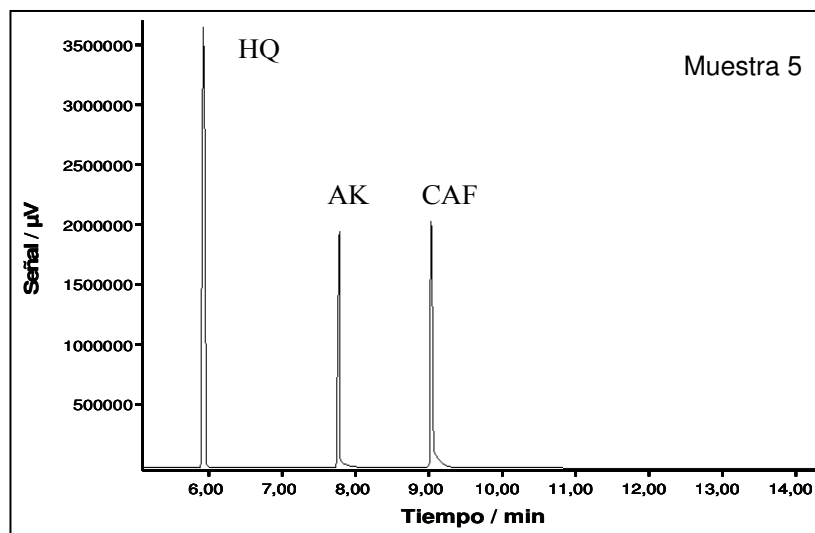


Fig. 7.6. (Continuación)

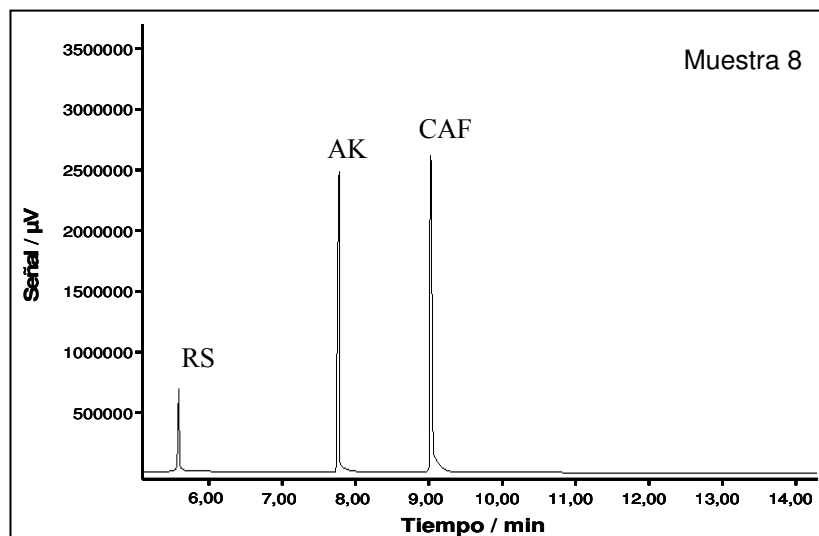
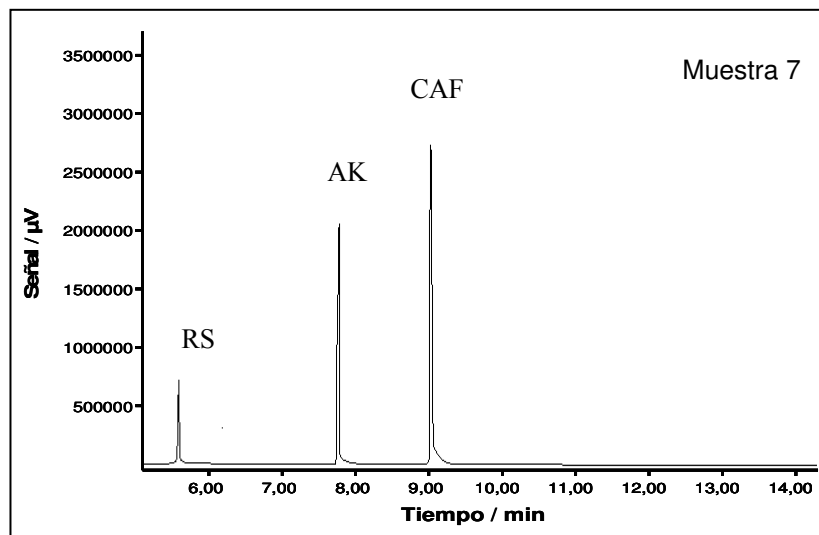


Fig. 7.6. (Continuación)

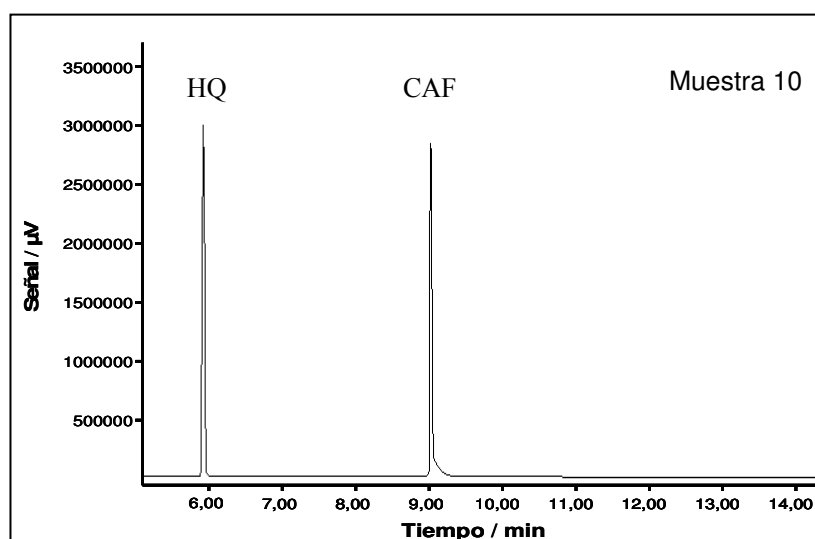
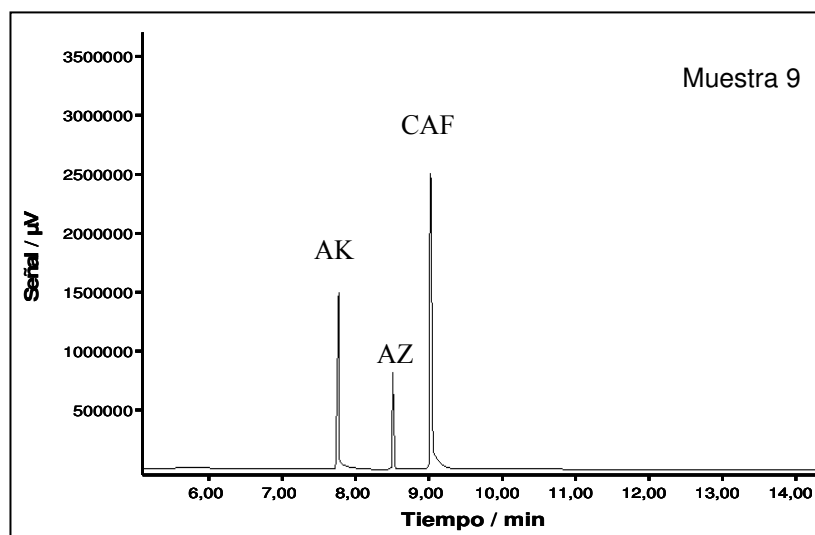


Fig. 7.6. (Continuación)

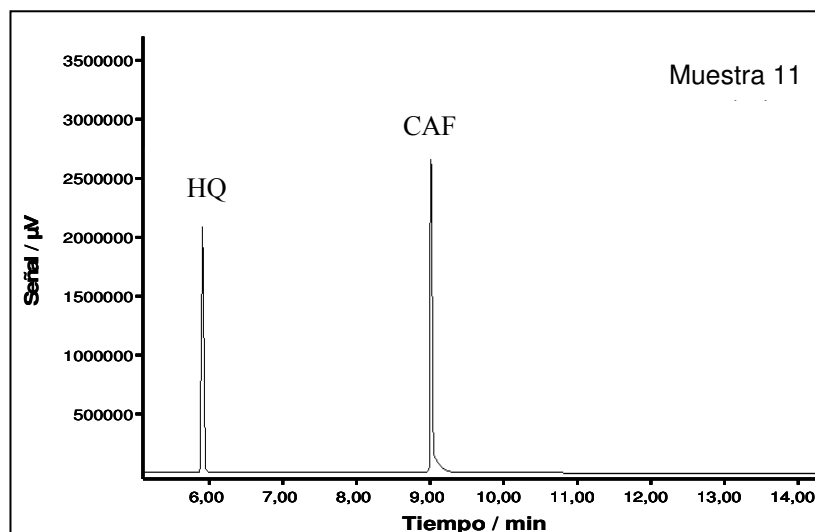


Fig. 7.6. (Continuación)

En la siguiente tabla se indican los resultados obtenidos para cada muestra, así como las desviaciones típicas correspondientes, que muestran buena precisión. La desviación estándar relativa es del orden del 3%.

Tabla 7.7. Resultados obtenidos en el análisis de muestras comerciales mediante CG-EM

MUESTRA	C ± s /% (m/m) ^a				
	RS	HQ	AK	AZ	AR
1	ND ^b	ND	2,51 ± 0,05	4,45 ± 0,04	ND
2	ND	ND	0,86 ± 0,02	ND	1,70 ± 0,04
3	ND	ND	ND	ND	2,0 ± 0,1
4	ND	ND	1,38 ± 0,06	ND	ND
5	ND	8,5 ± 0,4	8,3 ± 0,4	ND	ND
6	ND	9,1 ± 0,1	9,5 ± 0,5	ND	ND
7	0,058 ± 0,002	ND	4,7 ± 0,2	ND	ND
8	0,20 ± 0,03	ND	4,88 ± 0,09	ND	ND
9	ND	ND	1,11 ± 0,06	3,81 ± 0,05	ND
10	ND	2,01 ± 0,06	ND	ND	ND
11	ND	4,00 ± 0,07	ND	ND	ND

^a C: concentración promedio, s: desviación típica de los resultados.

^b ND: no detectado.

7.3.2. Determinación de hidroquinona (HQ), ácido kójico (AK), resorcinol (RS) y arbutina (AR) mediante cromatografía líquida con detección espectrofotométrica UV/vis

En esta parte del trabajo se estudia el uso de la cromatografía líquida en el análisis simultáneo de agentes despigmentantes con el fin de proponer un método con una instrumentación más asequible que la CG-EM. Además, se pretende que sea, en la medida de lo posible, limpio e inocuo, tanto para el operador como para el medio ambiente, ya que en el control de calidad del sector cosmético es necesario llevar a cabo el análisis de un gran número de muestras.

Este estudio se realizó para todos los analitos considerados en el apartado anterior, excepto para el ácido azelaico, por no ser soluble en las condiciones de trabajo.

7.3.2.1. Estudio de los parámetros experimentales

Se estudiaron parámetros que influyen en la separación cromatográfica tales como la composición de la fase móvil, el caudal y el gradiente de elución.

Estudios preliminares

Debido a su inocuidad, se estudió la posibilidad de emplear como fase móvil mezclas EtOH:H₂O, conteniendo una pequeña cantidad de tampón acético/acetato para ajustar el pH. En este sentido, se ensayaron diferentes proporciones de EtOH:tampón acético/acetato al 1% (0:100 a 10:90 (v/v)). Además, se estudiaron diferentes pHs del tampón (2,5 a 5,0). Se empleó una columna LiChrospher® 100 RP-18 (12,5 cm de longitud, 4 mm de diámetro interno y 5 µm de tamaño de partícula)(Merck).

Se prepararon disoluciones patrón multicomponente, utilizando como disolvente, en cada caso, la fase móvil en estudio y conteniendo alrededor de 70 µg ml⁻¹ de HQ, AR, AK y RS. Se obtuvieron los cromatogramas correspondientes realizando la detección a una longitud de onda de 280 nm. En el mejor de los casos, se obtuvo un cromatograma como el que se

obtuvo a continuación, donde se observa una baja resolución de los picos de los analitos estudiados.

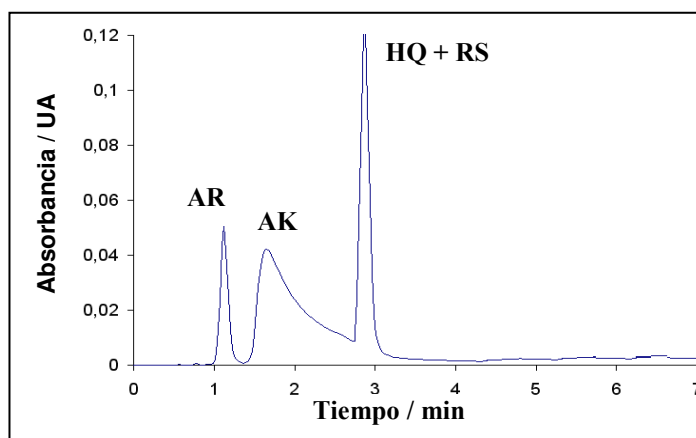


Fig. 7.7. Cromatograma obtenido empleando una columna C18 (125 mm x 4 mm diámetro interno y 5 μm de tamaño de partícula) y fase móvil EtOH:tampón acético/acetato pH 2,5 5:95 (v/v) $Q=1 \text{ ml min}^{-1}$

Como se puede apreciar, la HQ y el RS se eluyen totalmente solapados y en la cola del AK.

Posiblemente no se consigue una separación satisfactoria debido a que los analitos presentan una moderada polaridad que les hace eluirse a tiempos de retención muy bajos en estas condiciones de trabajo.

Por tanto, se optó por probar con una columna más polar (C8) y de mayor longitud. Se utilizó una columna analítica LiChrospher® 60 RP-Select B (25 cm de longitud, 4 mm de diámetro interno y 5 μm de tamaño de partícula)(Merck).

De este modo se realizaron unos ensayos preliminares con la columna C8 en las mejores condiciones obtenidas con la columna C18 (EtOH:tampón acético/acetato pH 2,5 5:95 (v/v), caudal 1 ml min^{-1}). De esta manera se consiguió separar con buena resolución AR, AK y RS; aunque en estas condiciones el pico de la HQ apareció ligeramente solapado con el de AK, por lo que se realizó un estudio de la composición de la fase móvil para mejorar la resolución.

Estudio de la composición de la fase móvil

El procedimiento experimental seguido en este caso fue similar al utilizado con la columna C18. Se trabajó a pH=2,5 y se modificó la concentración de etanol en la fase móvil entre un 5 y un 15% de EtOH trabajando con un caudal fijo de 1 ml min⁻¹. Se observó que con un 15% EtOH los picos se adelantaban, por lo que se eluía la AR con el frente de elución y el resto de componentes de la matriz más hidrosolubles. Con un 5% EtOH el pico del AK presentaba una cola que se veía corregida cuando la fase móvil contenía un 10% de EtOH. A continuación se muestran los cromatogramas obtenidos.

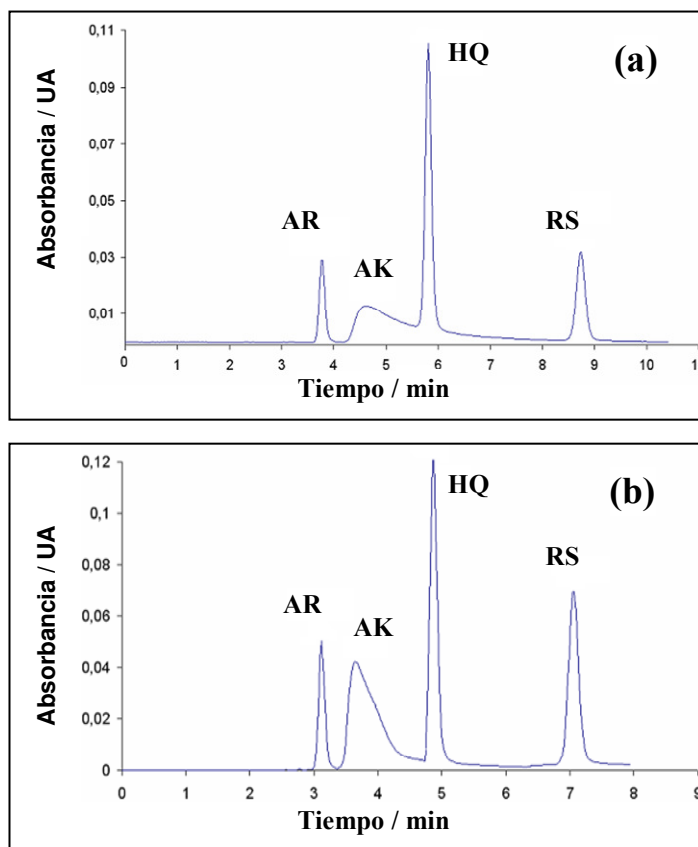


Fig. 7.8. Cromatogramas obtenidos empleando una columna C8, caudal de 1 ml min⁻¹, utilizando como fase móvil (a) EtOH:tampón acético/acetato pH 2,5 5:95 (v/v); (b) EtOH:tampón acético/acetato pH 2,5 10:90 (v/v)

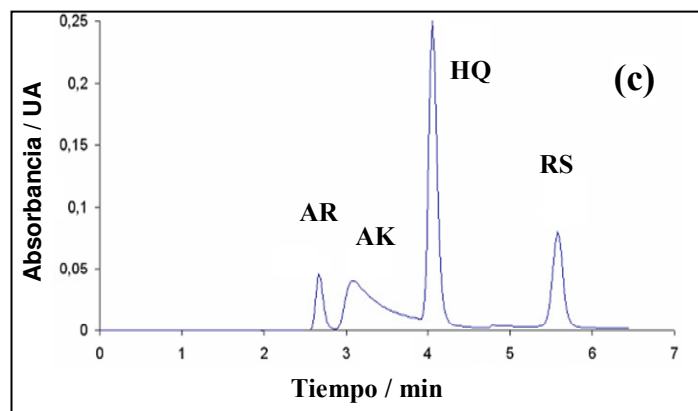


Fig. 7.8. (Continuación)

Finalmente, se ensayaron fases móviles a diferentes pHs con un 10% de EtOH y no se obtuvieron mejoras en la resolución de los picos. Se optó por utilizar un 10% de EtOH y un 90% de tampón pH 2,5 (disolución acuosa de ácido acético al 1%).

Estudio del efecto del caudal

Se realizó un estudio del caudal de la fase móvil, se ensayaron caudales de 0,5, 1, 1,5 y 2 ml min⁻¹. Se observó que con un caudal de 0,5 ml min⁻¹ se obtenían picos muy anchos. Con caudales superiores a 1 ml min⁻¹ se obtenían picos solapados.

Se estudió la posibilidad de realizar un gradiente de caudal, de modo que se utilizaran caudales bajos para los picos que eluyen en primer lugar, y caudales más altos para aquéllos que eluyen posteriormente, con el fin de evitar un ensanchamiento de los picos así como tiempos de análisis largos. No obstante, no se obtuvo mejoría apreciable; por lo que se optó por trabajar con un caudal constante de 1 ml min⁻¹.

7.3.2.2. Método propuesto para la determinación de hidroquinona (HQ), ácido kójico (AK), resorcinol (RS) y arbutina (AR) mediante cromatografía líquida con detección espectrofotométrica ultravioleta/visible (CL-UV/vis)

En base a los estudios precedentes, se propone el siguiente procedimiento experimental:

Homogeneizar la muestra y pesar (por triplicado) aproximadamente 0,1 g en un matraz aforado de 10 ml. Añadir 1 ml de EtOH y 0,5 ml de disolución de ácido acético al 1% (pH=2,5). Para ayudar a la solubilización se puede emplear baño de ultrasonidos. Aforar con la disolución de ácido acético 1% pH=2,5.

Preparar disoluciones patrón conteniendo entre 20 y 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de cada analito en EtOH:tampón acético/acetato pH=2,5 10:90 (v/v) y filtrar las muestras y analizar mediante CL-UV/vis inyectando 20 μl directamente en el cromatógrafo.

Utilizar una columna C8 (250 mm x 4 mm diámetro interno y 5 μm de tamaño de partícula), una fase móvil EtOH:tampón acético/acetato pH=2,5 10:90 (v/v) y un caudal constante de 1 ml min^{-1} .

Efectuar la detección a 265 nm para el AK, 280 nm para la AR, 285 nm para la HQ y 271 nm para el RS.

A continuación se muestra un cromatograma obtenido de un patrón multicomponente.

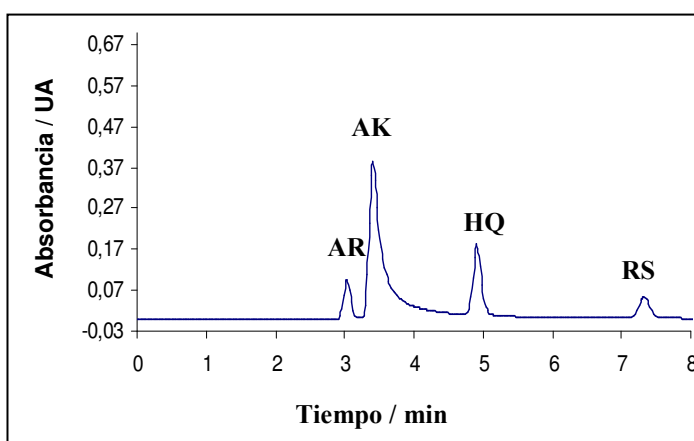


Fig. 7.9. Cromatograma de una disolución patrón multicomponente conteniendo 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de cada analito

7.3.2.3. Parámetros analíticos del método

Parámetros cromatográficos

Se estimó la precisión de las lecturas de los tiempos de retención y de las áreas mediante 5 medidas de una disolución patrón multicomponente de 60 µg ml⁻¹ de HQ, RS, AK y AR. A continuación se indican los resultados obtenidos que muestran una buena precisión en ambos casos, donde t_R es el tiempo de retención y s es la desviación estándar de los valores.

Tabla 7,8, Estudio de la repetibilidad de los valores de los tiempos de retención y de las áreas

	AR	AK	HQ	RS
$t_R \pm s$ / min	3,06 ± 0,01	3,43 ± 0,02	4,81 ± 0,01	7,002 ± 0,009
Área ± s / µV s	274000 ± 2000	1000000 ± 10000	1600000 ± 30000	640000 ± 9000

Lo que supone una desviación estándar relativa (DER) para el cociente de áreas entre 0,6% y 2%. Por tanto, presenta una buena precisión para llevar a cabo el análisis de este tipo de muestras.

Parámetros de calibración

En la tabla siguiente se indican los parámetros de las rectas de regresión obtenidas en el intervalo de concentraciones estudiado (20–100 µg ml⁻¹, 5 patrones). a y s_a son la ordenada en el origen y su desviación estándar; b y s_b son la pendiente y su desviación estándar; r es el coeficiente de regresión y $s_{y/x}$ la desviación estándar de los residuales.

Tabla 7.9. Rectas de regresión obtenidas para los analitos estudiados

	$a \pm s_a$ / µV s	$b \pm s_b$ / µV s ml µg ⁻¹	r^2	$s_{y/x}$ / µV
RS	31000 ± 5000	9260 ± 80	0,99984	4000
HQ	50000 ± 10000	13300 ± 100	0,99976	8000
AK	-153000 ± 9000	27500 ± 200	0,99989	9000
AR	13000 ± 3000	4310 ± 60	0,99958	3000

La sensibilidad del método, estimada mediante el valor de la pendiente de las curvas de calibración, se puede observar en la tabla anterior. Oscila entre 4000 y 30000 $\mu\text{V s ml } \mu\text{g}^{-1}$.

En la siguiente tabla se muestran los límites de detección instrumentales estimados mediante el criterio $3 s_{y/x} / b$.

Tabla 7.10. Valores de los límites de detección para los diferentes analitos

Analito	LD / $\mu\text{g ml}^{-1}$
RS	1,334
HQ	1,774
AK	1,009
AR	1,947

Se consiguen límites de detección instrumentales entre 1,0 y 1,9 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Estos valores son adecuados para la determinación de estos compuestos en productos cosméticos. Incluso se podrían detectar bajas concentraciones de HQ y RS en muestras fraudulentas que contuvieran dichos compuestos en bajas concentraciones.

Estudio de la exactitud

Se aplicó el método propuesto a una muestra sintética preparada en el laboratorio según el protocolo descrito en el Apéndice I.4 (muestra 12). De esta forma se conocen los valores de concentración reales de todos los analitos presentes.

En la siguiente tabla se indican los valores de concentración hallados (**C**) y los valores reales (**C_{real}**).

Tabla 7.11. Comparación de los valores obtenidos en el análisis de la muestra sintética con los reales

	RS	HQ	AK	AR
C \pm s / %	0,56 \pm 0,03	1,05 \pm 0,03	1,04 \pm 0,02	2,35 \pm 0,03
C _{real}	0,60	1,01	1,07	2,31
Error / %	-7	4	-3	2

Como se puede observar el error relativo cometido se encuentra entre el 2 y el 7 %, lo que permite realizar de forma satisfactoria la determinación de los analitos en este tipo de matrices.

A continuación se muestra el cromatograma obtenido de la muestra sintética.

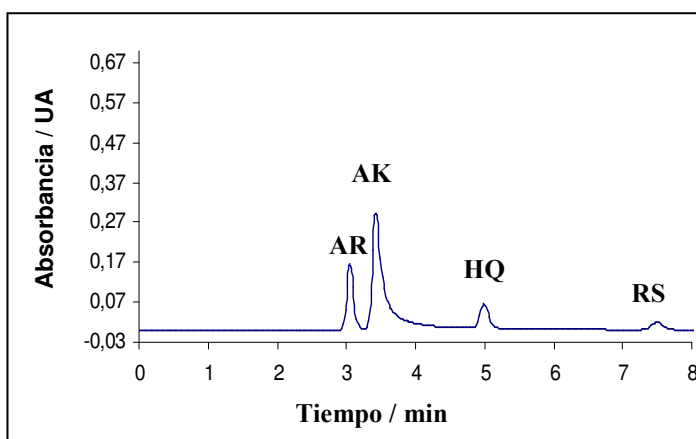


Fig. 7.10. Cromatograma de la muestra sintética

7.3.2.4. Aplicación del método propuesto al análisis de productos para el blanqueamiento de la piel comerciales

Se analizaron las mismas 11 muestras de cremas despigmentantes comerciales previamente analizadas por el método de CG-EM. En la figura 7.7 se muestran los cromatogramas obtenidos mediante el método propuesto de cromatografía líquida para estas muestras. En la siguiente tabla se indican los resultados obtenidos para cada muestra así como las desviaciones estándar correspondientes.

Tabla 7.12. Resultados obtenidos en el análisis de muestras comerciales mediante CL-UV/vis

MUESTRA	C ± s / % (m/m) ^a			
	RS	HQ	AK	AR
1	ND ^b	ND	2,60 ± 0,03	ND
2	ND	ND	0,90 ± 0,05	1,58 ± 0,07
3	ND	ND	ND	1,99 ± 0,05
4	ND	ND	1,33 ± 0,05	ND
5	ND	6,5 ± 0,3	6,8 ± 0,4	ND
6	ND	8,34 ± 0,09	9,1 ± 0,2	ND
7	0,031 ± 0,002	ND	4,3 ± 0,2	ND
8	0,119 ± 0,07	ND	4,0 ± 0,2	ND
9	ND	ND	1,15 ± 0,03	ND
10	ND	1,94 ± 0,02	ND	ND
11	ND	3,91 ± 0,03	ND	ND
Sintética	0,56 ± 0,03	1,05 ± 0,03	1,04 ± 0,02	2,35 ± 0,03

^a C: concentración analito, s: desviación estándar de los resultados (cada muestra se realiza por triplicado).

^b ND: no detectado.

La desviación estándar relativa es del orden del 3%.

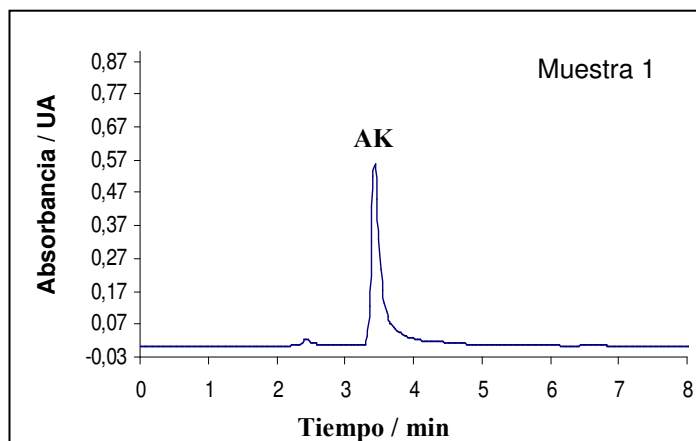


Fig. 7.11. Cromatogramas obtenidos para las muestras analizadas

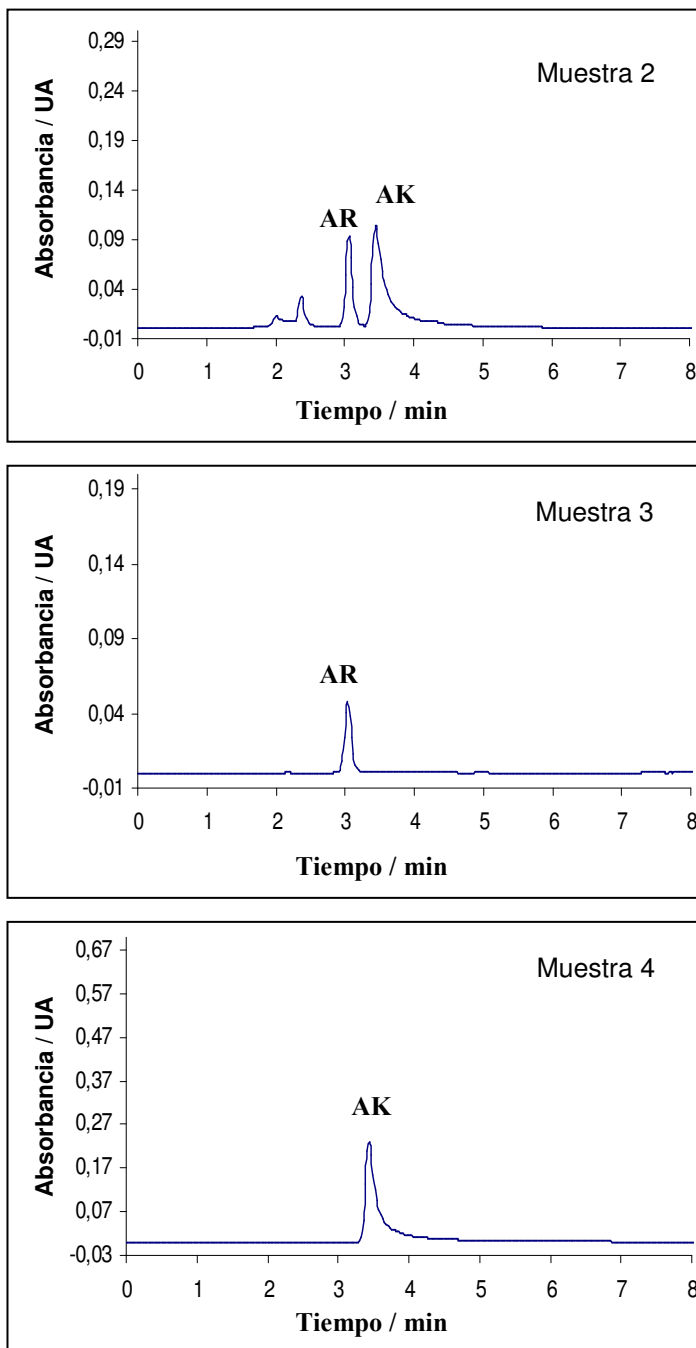


Fig. 7.11. (Continuación)

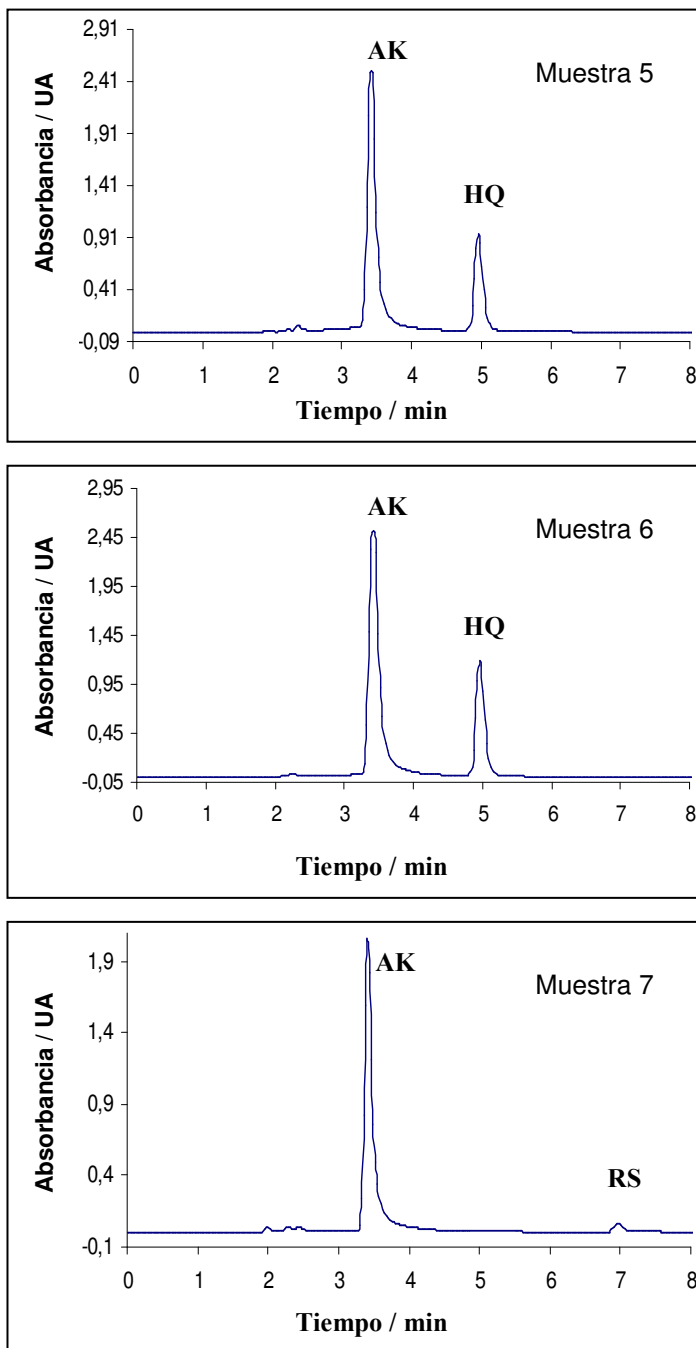


Fig. 7.11. (Continuación)

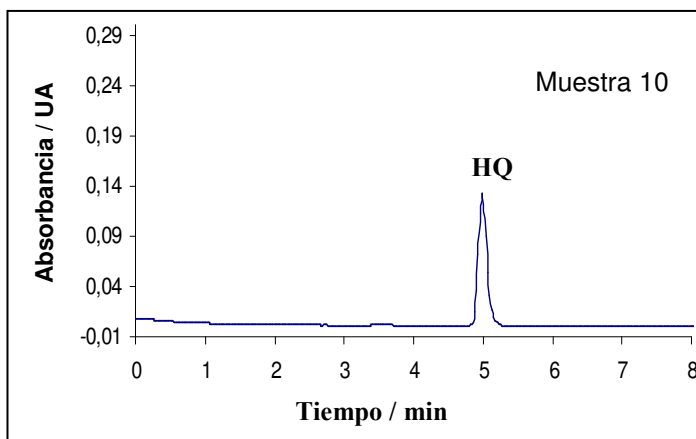
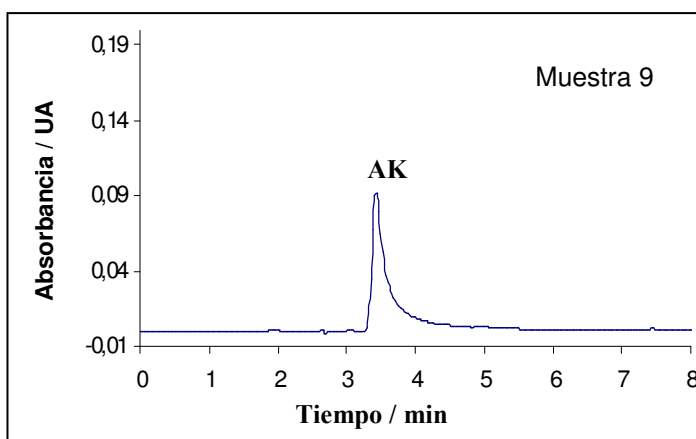
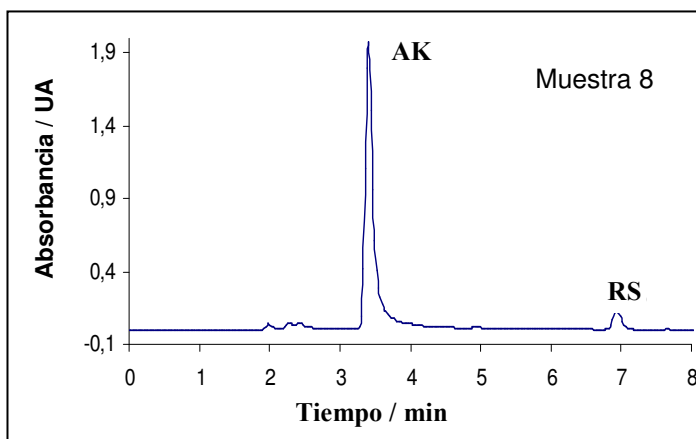


Fig. 7.11. (Continuación)

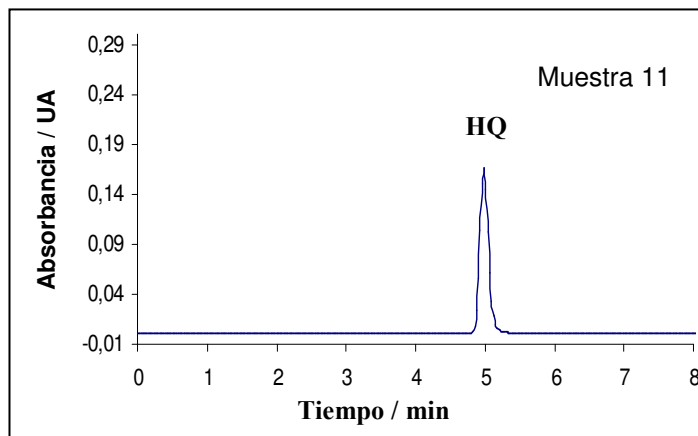


Fig. 7.11. (Continuación)

7.3.3. Comparación entre los métodos propuestos

Los resultados obtenidos mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas se compararon con los obtenidos mediante cromatografía líquida con detección espectrofotométrica UV/vis. Se realizó un test de *t Student* según se describe en el Apéndice II.3. Los valores obtenidos se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 7.13. Comparación de los resultados obtenidos mediante CG-EM y CL-UV

Muestra	Analito	CG-EM C ± s ^a / %	CL-UV C ± s / %	t Student 95%
1	AK	2,51 ± 0,05	2,60 ± 0,03	2,67
2	AK	0,86 ± 0,02	0,90 ± 0,05	1,23
	AR	1,70 ± 0,04	1,58 ± 0,07	2,58
3	AR	2,0 ± 0,1	1,99 ± 0,05	0,15
4	AK	1,38 ± 0,06	1,33 ± 0,05	1,11
5	HQ	8,5 ± 0,4	6,5 ± 0,3	6,93
	AK	8,3 ± 0,4	6,8 ± 0,4	4,59
6	HQ	9,1 ± 0,1	8,34 ± 0,09	9,78
	AK	9,5 ± 0,5	9,1 ± 0,2	1,29
7	RS	0,058 ± 0,002	0,031 ± 0,002	16,53
	AK	4,7 ± 0,2	4,3 ± 0,2	2,45
8	RS	0,200 ± 0,003	0,119 ± 0,007	18,42
	AK	4,88 ± 0,09	4,0 ± 0,2	6,95
9	AK	1,11 ± 0,06	1,15 ± 0,03	1,03
10	HQ	2,01 ± 0,06	1,94 ± 0,02	1,92
11	HQ	4,00 ± 0,07	3,91 ± 0,03	2,04
12	RS	0,62 ± 0,03	0,56 ± 0,03	2,45
	HQ	0,99 ± 0,03	1,05 ± 0,03	2,45
	AK	1,11 ± 0,04	1,04 ± 0,02	2,32
	AR	2,32 ± 0,02	2,35 ± 0,03	1,44

^a **C**: Concentración encontrada y **s**: desviación típica del resultado (análisis realizados por triplicado)

CG-EM: Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

CL-UV: Cromatografía líquida con detección espectrofotométrica en el UV

Para una probabilidad del 95% y 3 valores experimentales para cada resultado la **t** Student crítica es de 2,78. Si **t** supera el valor crítico los resultados comparados no son equivalentes a ese nivel de probabilidad.

Como se puede observar, todos los datos son comparables menos los correspondientes a las muestras 5, 6, 7 y 8, todas ellas de la misma casa comercial. Se puede observar que los resultados obtenidos por cromatografía líquida con detección espectrofotométrica en el UV presentan un error por defecto respecto a los obtenidos por CG-EM, lo que probablemente se debe a que la matriz de estas muestras impide la completa lixiviación de los analitos en EtOH. Este problema de solubilidad no existe en la CG-EM, ya que con el disolvente utilizado (DMF) se consigue la completa disolución de la muestra. Cabría resaltar que, a pesar de ello, el método de cromatografía líquida con detección

espectrofotométrica UV/vis para las muestras 5, 6, 7 y 8 permitió detectar el posible fraude, que fue corroborado por CG-EM ya que en ambos casos se detectaron HQ y RS, estando estas sustancias actualmente prohibidas en productos cosméticos para el blanqueamiento de la piel de acuerdo con la legislación Europea sobre productos cosméticos.

Se realizó una comparación de todos los resultados obtenidos, excluyendo los de las muestras 5, 6, 7, 8 mediante un modelo de regresión lineal empleando el test descrito en el Apéndice II.5. En la siguiente figura se representa en el eje de abscisas los resultados obtenidos por CG-EM y en ordenadas los obtenidos por CL-UV/vis.

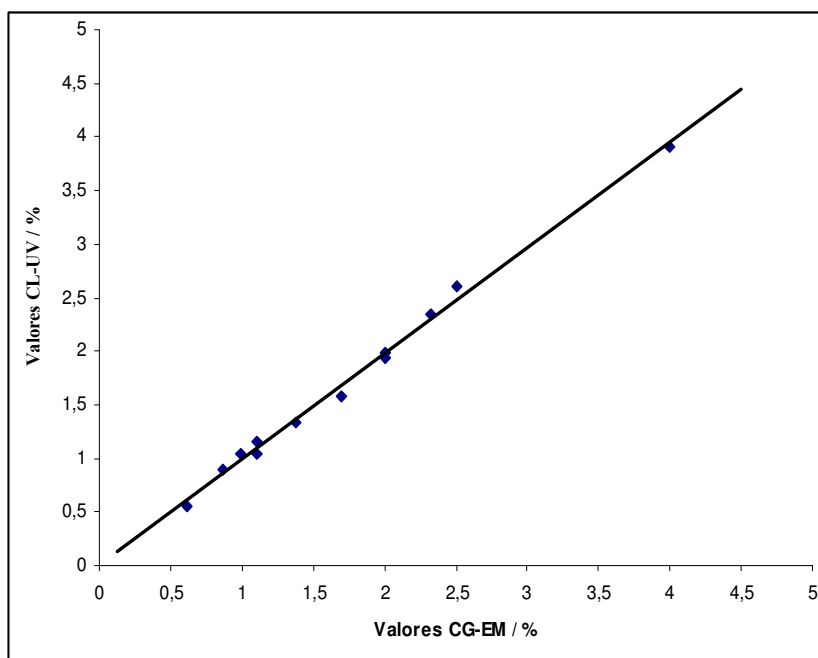


Fig. 7.12. Comportamiento lineal de los resultados obtenidos por CL-UV con los obtenidos por CG-EM

La ecuación obtenida fue $y = (0,99 \pm 0,02) \cdot x + (0,00 \pm 0,04)$; $R^2=0,9917$.

El valor de $(t_{cal})_a$ fue de 0,05 mientras que el de $(t_{cal})_b$ fue de 0,48 (ver Apéndice II.5). Como el valor crítico del parámetro t de Student para un nivel de confianza del 95% y 12 puntos experimentales es 2,23, se puede concluir que los resultados obtenidos por CL-UV/vis son comparables a los obtenidos por CG-EM, para el conjunto de analitos y muestras estudiado.

7.4. CONCLUSIONES

El método basado en el empleo de la CG-EM permite la determinación conjunta de cinco agentes despigmentantes en productos cosméticos, con buenos límites de detección, del orden de 0,2-1 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Requiere el uso de DMF y la derivatización de los analitos.

El método basado en el empleo de CL-UV/vis permite la determinación conjunta de cuatro sustancias despigmentantes en productos cosméticos con un tiempo de desarrollo de 8 minutos y límites de detección del orden de 2 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Se puede considerar un método de análisis limpio, tanto en la preparación de la muestra como en el procedimiento cromatográfico. Sin embargo, no permite la determinación de ácido azelaico, ya que no es soluble en el medio utilizado y, en algunos casos, la matriz de la muestra impide la completa lixiviación de los analitos. El método propuesto es relativamente rápido (menos de 8 minutos por cromatograma) y fácilmente aplicable en las empresas del sector.

De los estudios realizados se concluye que el método basado en CG-EM conduce a excelentes resultados para la determinación conjunta de todos los analitos estudiados, no existiendo en la bibliografía ningún otro método con estas características.

Capítulo 8

**Desarrollo de un método analítico para la
determinación de ácido ascórbico y de sus derivados
más utilizados en productos cosméticos para el
blanqueamiento de la piel mediante cromatografía
líquida con detección espectrofotométrica UV/vis**

El contenido de este capítulo ha sido publicado en Journal of Separation Science (2008) 31:229-236.

8.1. INTRODUCCION Y OBJETIVO DEL TRABAJO

El ácido ascórbico (AA) y sus derivados ascorbil fosfato (AF) sódico o magnésico, ascorbil glucósido (AG) y ascorbil palmitato (AP) son compuestos ampliamente utilizados en los productos cosméticos y especialmente en los productos despigmentantes ya que ayudan a eliminar o reducir las manchas cutáneas (Ehrlich et al., 2006). Además, presentan otras interesantes propiedades cosméticas ya que aportan luminosidad, previenen las arrugas, estimulan la formación de colágeno y tienen unos destacables efectos antioxidantes y antirradicales libres (Farris, 2005).

Por tanto, se hace necesario el control de calidad de la producción, ya que es muy importante para garantizar que el cosmético presenta la concentración mínima de principios activos que asegura su eficacia.

Hay que resaltar que, a pesar de que el empleo de estos compuestos está muy extendido, no existe ningún método oficial para el control analítico del AA y sus derivados en los productos cosméticos. En la bibliografía se encuentran diversos métodos publicados (ver apartado 6.3), pero se basan en el empleo de disolventes de elevada toxicidad (metanol, acetonitrilo, tetrahidrofurano...) y no permiten determinar simultáneamente todos los derivados tratados en el presente trabajo. La determinación conjunta del AA y sus derivados es muy necesaria, ya que a menudo se encuentran juntos en las modernas formulaciones cosméticas.

A continuación se muestran las estructuras químicas del AA y sus derivados:

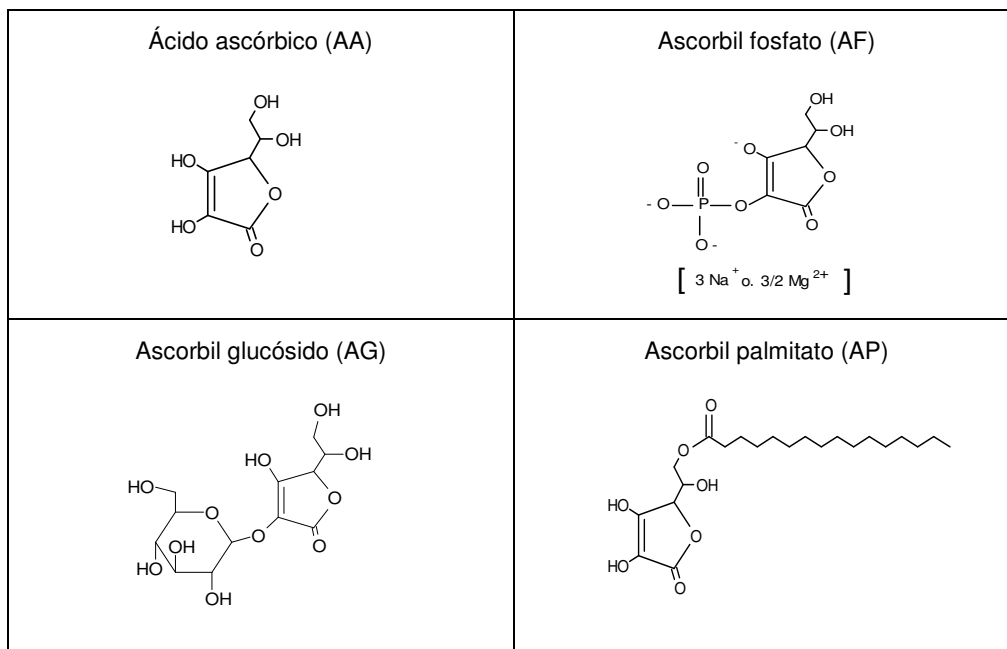


Fig. 8.1. Estructura química de los agentes despigmentantes de la familia del ácido ascórbico (AA)

El objetivo del presente trabajo es el desarrollo de un método analítico exacto y preciso para la determinación de ácido ascórbico (AA), ascorbil fosfato (AF) sódico o magnésico, ascorbil glucósido (AG) y ascorbil palmitato (AP), de forma conjunta y empleando disolventes de nula o baja toxicidad, permitiendo así realizar el control de calidad de los productos cosméticos de una forma respetuosa para el medio ambiente y segura para el operador, objetivo que se enmarca dentro de la justificación general de la segunda parte de la Tesis Doctoral descrita al inicio de dicha parte. Para ello se propone una metodología basada en la cromatografía líquida con detección espectrofotométrica UV/vis, empleando gradiente de elución y una fase móvil de nula o baja toxicidad.

8.2. PARTE EXPERIMENTAL

8.2.1. Metodología experimental

En primer lugar se realizaron pruebas de solubilidad de los diferentes analitos. A continuación se estudiaron las variables cromatográficas (composición de fase móvil y caudal) para conseguir la correcta separación de todos los analitos. Finalmente, se obtuvieron los parámetros analíticos y se analizaron diferentes muestras comerciales.

Para contrastar la exactitud del método propuesto, se realizó la comparación de los resultados obtenidos con los encontrados para cada analito por diferentes métodos publicados, ya que no existía ninguna publicación previa en la que se determinasen todos los analitos.

Así, para la determinación de AA y AF se empleó un método basado en el propuesto por Chang y Chang, (2003).

Por otro lado, para la determinación de AP se empleó un método basado en el artículo publicado por Sottofattori et al., (1998), pero debido a los problemas expuestos por los autores para la extracción cuantitativa del analito de las matrices cosméticas, se empleó la preparación de la muestra propuesta por Austria et al., (1997).

Finalmente, para la determinación AG solo existían tres métodos publicados (Huang et al., 2004; Lin et al., 2006; Shih y Zen, 2006). No obstante, no se realizó la comparación por no disponer de la instrumentación necesaria.

Debido a las deficiencias en la separación de todos los componentes con los métodos publicados seleccionados, la validación de la exactitud se completó mediante el análisis de una muestra sintética que contenía cantidades conocidas de los analitos y se realizaron estudios de recuperación para las muestras comerciales no resueltas mediante los métodos publicados.

8.2.2. Aparatos y material

Se empleó un cromatógrafo de líquidos Jasco (Tokio, Japón), provisto de una bomba cuaternaria modelo PU-2089 Plus, un detector UV/VIS de fila de diodos modelo MD-2010 Plus, una interfase modelo LC-Net II/ ADC y un inyector manual con bucle de inyección de 20 µl. Se empleó un

pHmetro Crison® (Barcelona) modelo micropH 2000 para las medidas del pH.

En el método propuesto se empleó una columna tipo C8 modelo Lichrospher® 60 RP-Select B (25 cm x 4 mm de diámetro interno y 5 µm de tamaño de partícula) de la casa comercial Merck (Darmstadt, Alemania).

En los métodos ya publicados elegidos para la validación de la exactitud del aquí propuesto se empleó una columna tipo C18 modelo Lichrospher® 100 RP-18 (25 cm x 4 mm de diámetro interno y 5 µm de tamaño de partícula) de la casa comercial Merck y una columna tipo cianopropil modelo Kromasil® 60 CN (25 cm x 4 mm de diámetro interno y 5 µm de tamaño de partícula) distribuida por Scharlab S.L. (Barcelona).

8.2.3. Reactivos y muestras

Se emplearon como patrones ácido 6-O-palmitoil-2-L-ascorbico (AP) R>99%, ácido 2-fosfo-L-ascórbico sal sódica (AF), R>98% (Fluka, Buchs, Alemania); ácido L-ascórbico (AA), R=98% (Guinama, Valencia); ácido 2-glucósido-L-ascórbico (AG), R>99% (DKSH France S.A, Miribel Cedex, Francia). De forma general, se usó ácido o-fosfórico (H_3PO_4) grado analítico, dihidrógeno fosfato sódico monohidrato ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) grado analítico (Merck) y agua desionizada (empleando un sistema Easypure® II de Barnstead International S.A, Iowa, U.S.A).

Además, en el método propuesto se utilizaron los siguientes reactivos: hidróxido y cloruro sódicos grado analítico y etanol (EtOH) grado HPLC de Scharlau Chemie S.A (Barcelona).

En los métodos ya publicados, elegidos para la validación de la exactitud del que se propone se empleó hidróxido de tetrabutilamonio 30-hidrato, R>98% (TBAH) de Fluka (Buchs, Alemania); tetrahidrofurano grado HPLC (THF) y metanol (MeOH) grado HPLC de Scharlau Chemie S.A (Barcelona).

Se analizaron varias muestras comerciales de los siguientes laboratorios, Vichy Laboratoires (Asnieres Cedex, Francia); Laboratoires Galénic (Boulogne, Paris, Francia); Laboratorios Medea S.A (Sant Joan Despí, Barcelona); Olay (Weybridge, Surrey, Irlanda); Laboratorios Dermofarm (Rubí, Barcelona); Sesderma S.L (Rafelbuñol, Valencia).

Además, se preparó una muestra sintética siguiendo un protocolo de fabricación de la empresa Guinama a partir de ingredientes cosméticos adquiridos en dicha empresa (ver Apéndice III.5).

8.3. RESULTADOS Y DISCUSION

8.3.1. Estudios preliminares del disolvente para la preparación de la muestra

A pesar de que los cuatro analitos pertenecen a la misma familia, presentan propiedades físico-químicas diferentes, ya que el AA, el AF y el AG son hidrosolubles, mientras que el AP es un derivado liposoluble. Por tanto, fue necesario realizar un estudio del disolvente a emplear para conseguir la correcta lixiviación de todos los analitos simultáneamente.

Se observó que contenidos altos de etanol dificultaban la total solubilización de AA, AF y AG; en cambio favorecía la solubilización de AP. Por otro lado, la presencia de un mayor porcentaje de etanol facilita la disolución de una mayor cantidad de excipientes en las formulaciones comerciales y favorece la lixiviación de los analitos. El porcentaje seleccionado fue 65% de etanol. Cabe destacar que con este porcentaje se consigue una total lixiviación de los analitos de las matrices cosméticas habituales.

8.3.2. Estudio de las variables cromatográficas y de los posibles interferentes

Debido a la diferente solubilidad del AP respecto el resto de analitos, se decidió realizar la separación cromatográfica en dos etapas, aplicando un gradiente de elución. En la primera etapa la fase móvil contenía un bajo o nulo porcentaje de EtOH para llevar a cabo la separación de AF, AG y AA. En la segunda etapa se incrementó el porcentaje de EtOH para eluir el AP.

Debido a las propiedades ácido-base del AA y de sus derivados y a los múltiples equilibrios que pueden presentar, se realizó un estudio de la influencia del pH en los tiempos de retención de los analitos. En principio se excluyó del estudio el AP ya que fue eluído en una etapa posterior. En la primera etapa se inyectó una disolución de $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ de los otros tres analitos (AA, AF y AG) en EtOH:tampón fosfato 50 mM (65:35, v/v) al

mismo pH que la fase móvil. Se emplearon diferentes fases móviles (a 1 ml min⁻¹) formadas por 100 % tampón fosfato 50 mM a diferentes valores de pH comprendidos entre 2 y 6.

Como se muestra en la figura 8.2 el AF, AG y AA presenta un comportamiento frente al pH muy complejo. A partir de pH=4 se observa una disminución del tiempo de retención de todos los picos cromatográficos, posiblemente debido a un mayor grado de ionización de los analitos. A pH=3 se obtienen los mejores resultados, obteniéndose una buena resolución cromatográfica entre AG y AA, aunque un acusado solapamiento entre el AF y el AG.

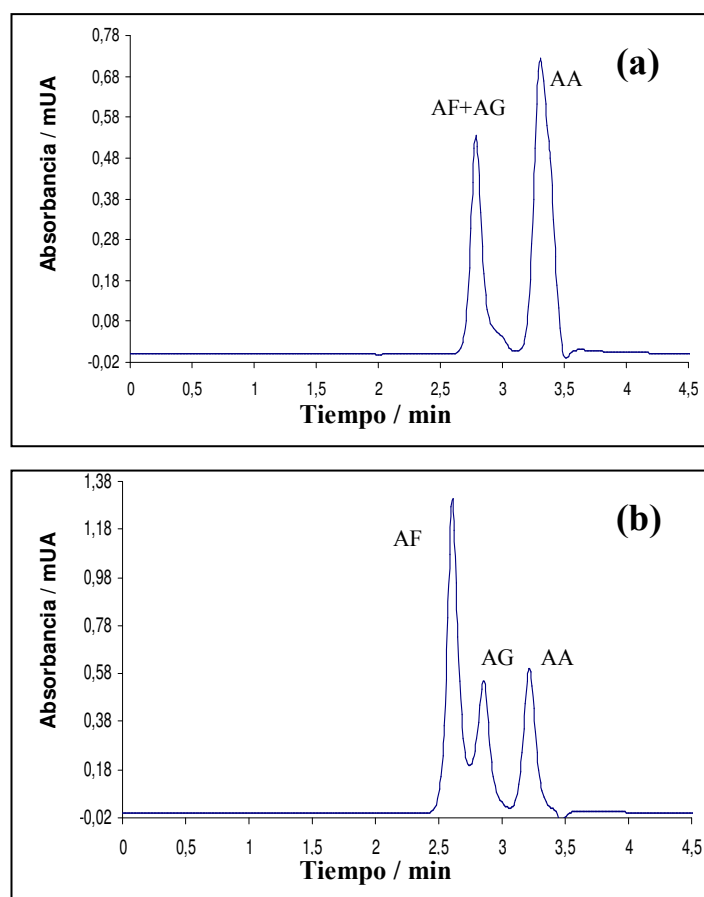


Fig.8.2. Cromatogramas obtenidos para el AF, AG y AA a diferentes pH de la fase móvil. a: pH=2; b: pH=3; c: pH=4; d: pH=5 y e: pH=6. Se empleó una longitud de onda de compromiso de 244 nm

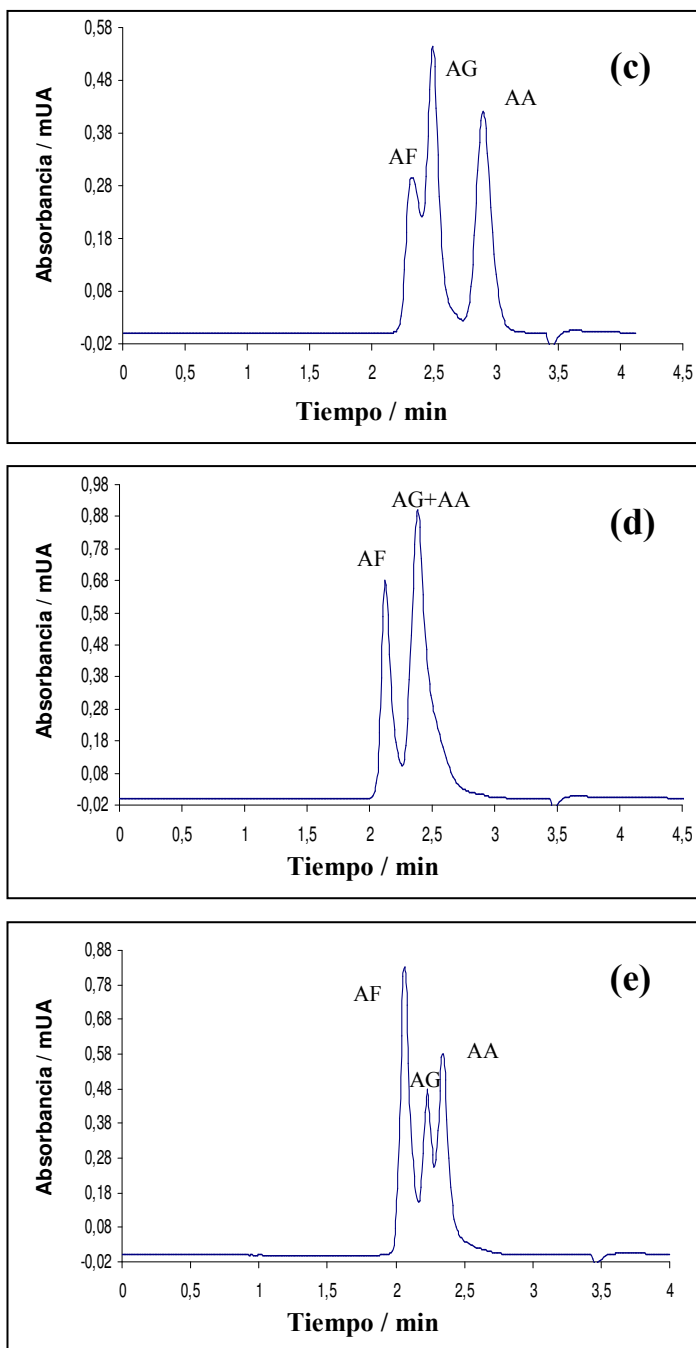


Fig.8.2. (Continuación)

Para tratar de solucionar este problema se ensayó el empleo de diferentes caudales. Se inyectó una disolución de $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ de AA, AF y AG en EtOH:tampón fosfato 50 mM a pH=3 (65:35, v/v) y se ensayaron caudales de 0,5, 1 y $1,5 \text{ ml min}^{-1}$. Si bien los picos cromatográficos se estrecharon al utilizar los caudales más altos, también los tiempos de retención se acercaron excesivamente. Se optó por utilizar un caudal de $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ por conseguir una mejor resolución pero todavía no era satisfactoria.

Finalmente se optó por la incorporación a la fase móvil de una determinada concentración de NaCl con el fin de hacer menos afín la fase móvil a los analitos y favorecer su retención.

Se estudió el efecto de la concentración de NaCl en la fase móvil y se ensayaron valores entre 0 y 0,7 M. Se inyectó una disolución patrón de $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ de AA, AF y AG en EtOH:tampón fosfato 50 mM a pH=3 (conteniendo la misma concentración de NaCl que la fase móvil) (65:35, v/v) y la fase móvil utilizada fue una disolución tampón fosfato 50 mM de pH=3 (conteniendo diferentes cantidades de NaCl) a un caudal de $0,5 \text{ ml min}^{-1}$.

A continuación se muestran los cromatogramas obtenidos en estas condiciones para las diferentes concentraciones de NaCl.

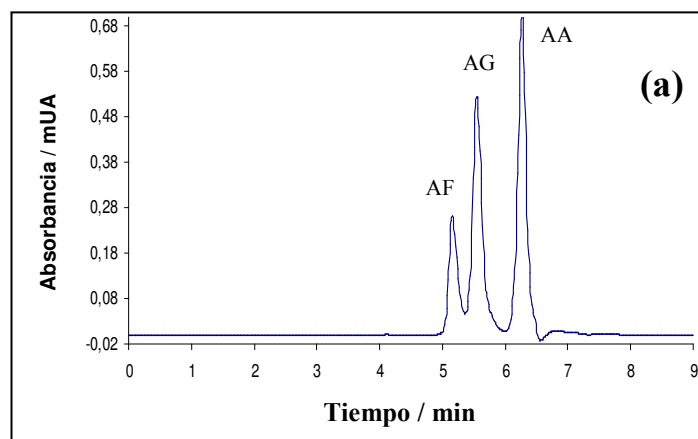


Fig. 8.3. Cromatogramas obtenidos para el AF, AG y AA a diferentes concentraciones de NaCl en la fase móvil. (a) 0 M; (b) 0,1 M; (c) 0,3 M; (d) 0,5 M y (e) 0,7 M. Se empleó una longitud de onda de compromiso de 244 nm

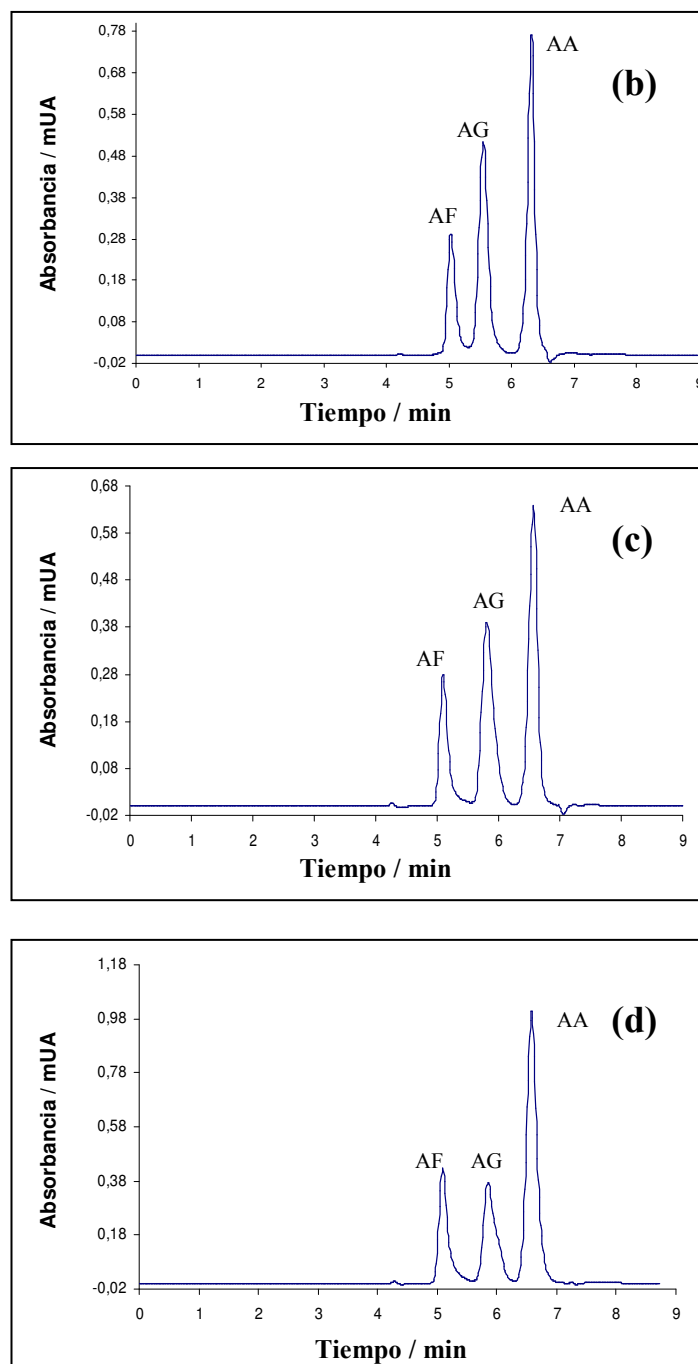


Fig. 8.3. (Continuación)

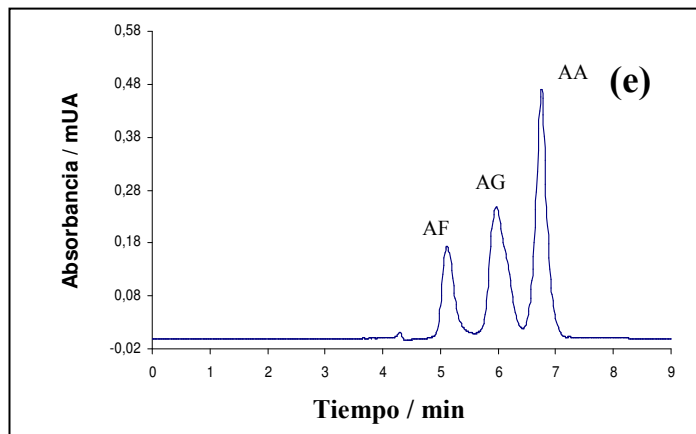


Fig. 8.3. (Continuación)

Como se puede observar, la adición de NaCl a la fase móvil favorece la resolución cromatográfica permitiendo recuperar la línea base en cada pico. Se decidió utilizar una concentración 0,1 M ya que a concentraciones mayores se producía ensanchamiento de los picos.

En una segunda etapa se inyectó una disolución de $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ de los cuatro analitos (incluido el AP) en EtOH: disolución tampón fosfato, pH=3 65:35, v/v (0,1 M en NaCl), empleando las condiciones cromatográficas antes optimizadas. De esta manera no se consiguió la elución del AP, por lo que fue necesario incorporar el EtOH a la fase móvil.

Después de la separación cromatográfica de los tres analitos hidrosolubles (AA, AF y AG), se aplicó un gradiente rápido desde los 7 hasta los 7,1 min con un caudal de 1 ml min^{-1} para conseguir una proporción final del 100% de EtOH en la fase móvil. De esta manera, se consiguió la elución del AP.

Sin embargo, trabajando en las condiciones seleccionadas en el apartado anterior, al inyectar las muestras reales se observaron solapamientos con otros componentes de los cosméticos, en particular con algunos de los filtros UV más utilizados.

Con el fin de evitar solapamientos se estudiaron diferentes porcentajes de EtOH en la fase móvil, pero no se observaron resultados satisfactorios. Los mejores resultados se obtuvieron empleando un porcentaje de EtOH del 70%, aunque el pico del AP permanecía solapado al del filtro UV denominado octocrileno.

Para solucionar este solapamiento se ensayaron distintos pHs en esta segunda etapa cromatográfica (posterior al gradiente, a partir del minuto 7,1), manteniendo el 70% de EtOH.

Se ensayó una fase móvil isocrática formada por EtOH:tampón fosfato 50 mM de pH=3 (0,1 M en NaCl) (0:100, v/v a 1 ml min⁻¹) en el intervalo 0–7 min para eluir los analitos más polares (AA, AF y AG), a partir del cual se aplicó un gradiente (desde 0:100 a 70:30 en 0,1 minutos) de EtOH:tampón fosfato 50 mM (a diferentes pHs), manteniéndolo durante 15 minutos más.

En la siguiente figura se muestra la variación, en función del pH, del tiempo de retención del AP y de los filtros UV que eluyen próximos a este despigmentante, a saber: benzofenona-3 (BZ3), 4-metilbenciliden canfor (MBC), isoamil metoxicinamato (IMC) y octocrileno (OCR).

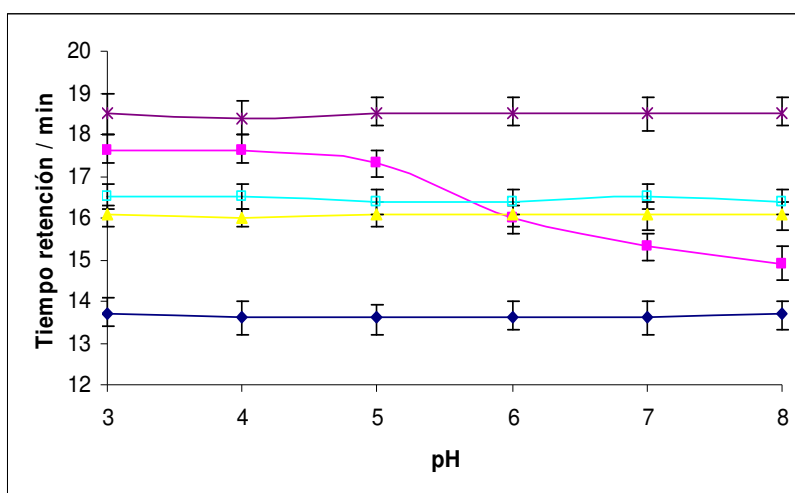


Fig. 8.4. Efecto del pH en el tiempo de retención del AP (■) y de los filtros UV OCR (×), MBC (□), IMC (▲) y BZ3 (◆). Las líneas verticales muestran la anchura del pico

Se puede observar que los tiempos de retención de los filtros UV no se alteran por el pH, pero cuando aumenta el pH el pico del AP se adelanta, separándose del OCR.

Por tanto, los pHs que permiten la máxima separación de los filtros UV son pH=5 y pH=8. Se descartó la utilización de pH=5 por coeluir el AP con otro interferente sin identificar presente en alguna de las muestras comerciales

analizadas. Se utilizó el pH=8 en esta etapa (a partir del minuto 7,1) ya que así se obtiene la separación cromatográfica del AP del resto de filtros UV y de todos los componentes de la matriz.

Finalmente, a fin de acortar el tiempo de desarrollo cromatográfico, se experimentaron diferentes caudales (todo a partir del minuto 7,1). Se estudiaron caudales de 0,5, 1 y 1,5 ml min⁻¹ y se optó por un caudal de 1,5 ml min⁻¹, ya que mantenía una buena resolución acortando el tiempo de análisis. No se aplicaron caudales mayores ya que podrían provocar problemas técnicos de sobrepresión en el equipo.

Por último, se estudió el tiempo necesario para recuperar las condiciones iniciales para la correcta separación de los derivados hidrosolubles en la siguiente inyección. Se propone realizar el gradiente que se muestra en la tabla 8.1, de modo que del minuto 19 (ya eluidos todos los componentes de la muestra) al 19,1 se retorna a las condiciones iniciales, que se consiguen a los 10 minutos.

Tabla 8.1. Programa de elución propuesto para la separación del AA y sus derivados

t / min	EtOH / % v/v	Tampón fosfato 50 mM / % v/v		Caudal / ml min ⁻¹
		pH= 3 (0,1 M en NaCl)	pH=8	
0	0	100	0	0,5
7	0	100	0	0,5
7,1	70	0	30	1,5
19	70	0	30	1,5
19,1	0	100	0	1,5
29	0	100	0	1,5
30	0	100	0	0,5

Con el fin de asegurar que no había interferencias de otros componentes usados en los productos cosméticos despigmentantes, se estudió la influencia de otros filtros UV y de los agentes despigmentantes más utilizados.

Primero se estudiaron los seis filtros UV hidrosolubles: benzofenona-4, polietilen glicol-25 p-aminobenzoato, ácido p-aminobenzóico, ácido fenilbencimidazol sulfónico, fenil dibencimidazol tetrasulfonato disódico y ácido tereftaliden dicanfor sulfónico. Estos filtros no interfieren con AF, AG, AA o AP, ya que son eluidos junto con el frente de la segunda etapa cromatográfica (10 minutos, aproximadamente), cuando el contenido de EtOH se incrementa.

Por otra parte, también se ensayaron catorce filtros UV liposolubles: benzofenona-3, isoamil metoxicinamato, 4-metilbenciliden canfor, octocrileno, homosalato, butil metoxidibenzoil metano, etilhexil metoxicinamato, etilhexil triazona, drometizol trisiloxano, dietilhexil butamido triazona, etilhexil salicilato, etilhexil dimetil PABA, bis-etilhexiloxifenol metoxifenil triazina y polisilicona-15. Obviamente, los cuatro primeros filtros UV no interfieren ya que el método fue optimizado teniéndolos en cuenta por presentar una polaridad semejante. Además, el resto de filtros UV tampoco interfieren ya que se eluyen después del octocrileno.

También se estudió la posible coelución de otros principios activos despigmentantes como la arbutina y el ácido kójico, que tampoco coeluyen con el AF, AG, AA o AP.

8.3.3. Método propuesto para la determinación de ácido ascórbico (AA), ascorbil fosfato (AF), ascorbil glucósido (AG) y ascorbil palmitato (AP)

Homogeneizar la muestra y pesar (por triplicado) entre 0,005 y 0,6 g en un matraz aforado de 10 ml. Disolver en 5 ml de EtOH:tampón fosfato 50 mM, pH=3 (0,1 M en NaCl) 65:35 v/v. Para acelerar la solubilización se puede emplear un baño de ultrasonidos. A continuación aforar con EtOH:tampón fosfato 50 mM, pH=3 (0,1 M en NaCl) 65:35 v/v. Finalmente, filtrar (membrana 0,45 µm) e inyectar en el sistema cromatográfico.

Preparar disoluciones patrón entre 10 y 100 µg ml⁻¹ en la misma disolución que las muestras e inyectar 20 µl directamente en el sistema cromatográfico.

Utilizar las siguientes condiciones experimentales:

Columna LiChrospher 60 RP-Select B (250x4 mm, 5 µm) (Merck), longitudes de onda de medida para el AF y el AA de 244 nm, para el AG de 256 nm y para el AP de 268 nm.

Emplear la fase móvil que se ha presentado en la tabla 8.1.

A continuación se muestra un cromatograma obtenido de un patrón multicomponente.

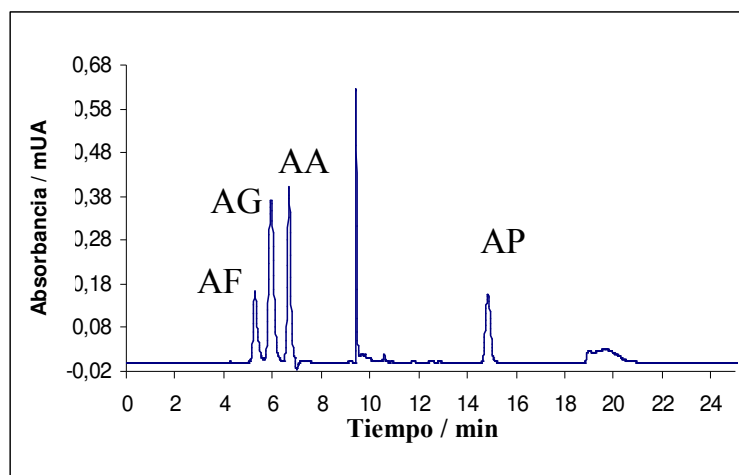


Fig. 8.5. Cromatograma de una disolución patrón multicomponente conteniendo $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ de cada analito. Se empleó una longitud de onda de compromiso de 268 nm

8.3.4. Parámetros analíticos del método

Parámetros cromatográficos

Se estimó la precisión de las lecturas de los tiempos de retención y de las áreas mediante la realización de 5 medidas de una disolución patrón multicomponente de $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ de cada analito. En la siguiente tabla se indican los resultados obtenidos, t_R es el tiempo de retención, s la desviación típica de los resultados y **CV** el coeficiente de variación.

Tabla 8.2. Estudio de la precisión de los tiempos de retención y de las áreas

	AF	AG	AA	AP
$t_R \pm s$ / min	$5,19 \pm 0,02$	$5,79 \pm 0,02$	$6,50 \pm 0,04$	$14,90 \pm 0,04$
CV área / %	0,7	0,4	0,6	0,7

Tanto la precisión de los tiempos de retención como la de las áreas son adecuadas para el análisis de los productos cosméticos despigmentantes.

Parámetros de calibración

En la tabla siguiente se indican los parámetros de las rectas de regresión obtenidas en el intervalo de concentraciones utilizado (10-100 $\mu\text{g ml}^{-1}$, 5 patrones). **a** y **s_a** son la ordenada en el origen y su desviación típica; **b** y **s_b** la pendiente y su desviación típica; **r** es el coeficiente de regresión y **s_{y/x}** la desviación típica de los residuales.

Tabla 8.3. Rectas de regresión de los analitos estudiados

	a ± s_a / mUA^a min	b ± s_b / mUA min ml μg^{-1}	r²	s_{y/x} / mUA min
AF	-12 ± 5	1327 ± 4	0,99991	900
AG	-13 ± 4	1247 ± 3	0,99997	800
AA	10 ± 20	2150 ± 30	0,9994	4000
AP	-23 ± 4	517 ± 2	0,99993	1000

^a: UA= unidades de absorbancia

La sensibilidad del método, estimada mediante el valor de la pendiente de las curvas de calibración, se puede observar en la tabla anterior. Oscila entre 517 y 2150 mUA min ml μg^{-1} .

En la siguiente tabla se muestran los límites de detección instrumentales estimados mediante el criterio $3 s_{y/x} / b$.

Tabla 8.4. Valores de los límites de detección de los diferentes analitos

Analito	LD / $\mu\text{g ml}^{-1}$
AF	2
AG	2
AA	5
AP	6

Los límites de cuantificación estimados mediante el criterio $10 s_{y/x} / b$ son suficientemente bajos (7–20 $\mu\text{g ml}^{-1}$) para llevar a cabo la determinación los analitos en los productos cosméticos despigmentantes.

Estudio de la exactitud

-Análisis de una muestra sintética mediante el método propuesto

El método se aplicó a una muestra sintética preparada según el protocolo descrito en el Apéndice III.5, que contenía, además de AF, AG, AA y AP, diversos filtros UV, ácido kójico y arbutina (agentes despigmentantes). Las cantidades conocidas de la crema sintética se compararon con los valores obtenidos por el método propuesto calculando los errores relativos (en relación al valor real presente en la crema sintética).

En la siguiente tabla se indican los valores de concentración hallados (**C**) y los valores reales (**C_{real}**).

Tabla 8.5. Comparación de los valores obtenidos en el análisis de la muestra sintética con los reales

	AF	AG	AA	AP
C ± s / %	0,873 ± 0,002	0,814 ± 0,002	0,858 ± 0,002	1,231 ± 0,008
C _{real}	0,88	0,85	0,87	1,27
Error / %	-0,8	-4,2	-1,4	-3,1

Como se puede observar, el error relativo cometido se encuentra entre el 0,8 y el 4,2%. En la siguiente figura se muestra el cromatograma obtenido para la muestra sintética empleando una longitud de onda de compromiso de 268 nm.

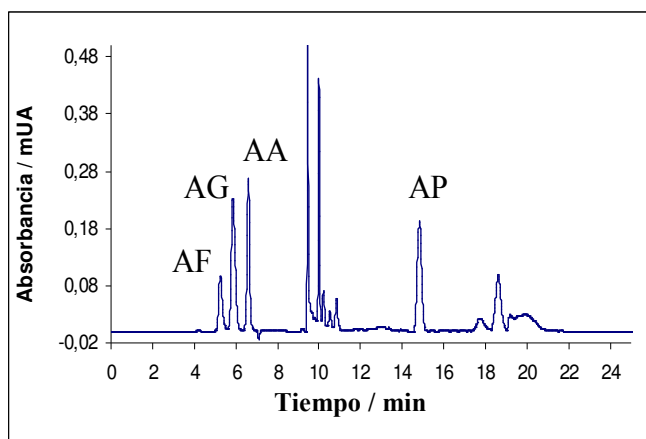


Fig. 8.6. Cromatograma de la muestra sintética a 268 nm

8.3.5. Aplicación del método propuesto al análisis de muestras comerciales. Comparación de los resultados obtenidos con el método propuesto con los obtenidos mediante métodos publicados

Adicionalmente, para contrastar la exactitud del método, se procedió al análisis de las muestras comerciales mediante la adaptación de dos métodos ya publicados, tomados como referencia. Los métodos utilizados fueron los siguientes:

Procedimiento para la comparación de los resultados en la determinación de AA y AF

Se basa en el método publicado por Chang y Chang, (2003).

Las muestras se prepararon pesando por triplicado entre 0,05 y 0,3 g de crema, se disolvió en aproximadamente 5 ml de agua desionizada y se aforó a 10ml. Se ultrasonicaron durante 15 minutos. Las disoluciones patrón de AA y AF se prepararon en agua desionizada ($10\text{-}100\ \mu\text{g ml}^{-1}$). Tanto las muestras como los patrones fueron filtrados antes de la inyección en el cromatógrafo. La fase móvil fue MeOH:tampón fosfato 5 mM de pH 2,5 (10 mM en TBAH). El caudal fue de $1,1\ \text{ml min}^{-1}$ y la detección se realizó a 240 nm.

Procedimiento para la comparación de los resultados en la determinación de AP

Se basa en los métodos publicado por Sottofattori et al., (1998) y Austria et al., (1997).

Las muestras se prepararon pesando por triplicado entre 0,1 y 0,5 g de crema, se disolvió en aproximadamente 5 ml de una mezcla THF-agua (90:10, v/v) y se aforó a 10 ml. Se ultrasonicaron durante 5 minutos. Las disoluciones patrón de AP se prepararon en la misma mezcla THF:agua (90:10, v/v) ($10\text{-}100\ \mu\text{g ml}^{-1}$). Tanto las muestras como los patrones fueron filtrados antes de la inyección en el cromatógrafo. La fase móvil fue un gradiente lineal de MeOH:tampón fosfato 25 mM de pH 3,5 de 40:60 a 80:20 v/v en 8 minutos, manteniéndose estas condiciones durante 4 minutos. Después se recuperaron las condiciones iniciales para reequilibrar la columna antes de una nueva inyección. El caudal fue de $1\ \text{ml min}^{-1}$. La detección se realizó a 240 nm.

En la tabla 8.6 se muestran los resultados obtenidos por el método propuesto, por los métodos tomados como referencia y los porcentajes de recuperación en los casos en que no fue posible su análisis por los métodos de referencia.

Tabla 8.6. Resultados obtenidos mediante el método propuesto y los métodos tomados como referencia.

Muestras	% AF (m/m)	% AG (m/m)	% AA (m/m)	% AP (m/m)
1	0,173 ± 0,002 (0,180 ± 0,003) ^a	0,223 ± 0,004	ND	ND
2	ND	ND	0,78 ± 0,02 (0,81 ± 0,04) ^a	ND
3	ND	ND	0,42 ± 0,02	ND
4	0,024 ± 0,001 (0,025 ± 0,001) ^a	ND	ND	ND
5	2,99 ± 0,06 (3,01 ± 0,01) ^a	ND	ND	ND
6	ND	ND	0,25 ± 0,01 (0,246 ± 0,007) ^a	0,070 ± 0,004 (0,085 ± 0,005) ^b

ND: no detectado

^a : resultados obtenidos mediante el método adaptado propuesto por Chang y Chang (2003)

^b : resultados obtenidos mediante el método adaptado propuesto por Sottofatori et. all (1998)

Los métodos se compararon mediante un modelo de regresión lineal representando los valores obtenidos con el método propuesto frente a los que proporcionaron los métodos tomados como referencia y empleando el test descrito en el Apéndice II.5. La ecuación obtenida fue: $y = (0,995 \pm 0,004) x - (0,008 \pm 0,005)$; siendo **y** la concentración obtenida mediante el método propuesto y **x** la que proporcionaron los métodos de referencia.

El valor de $(t_{cal})_a$ fue de 1,60 mientras que el de $(t_{cal})_b$ fue de 1,25 (ver Apéndice II.5). Como el valor crítico del parámetro **t** de Student para un nivel de confianza del 95% y 6 puntos experimentales es de 2,78, se puede concluir que los resultados obtenidos por el método propuesto son comparables a los de los métodos tomados como referencia.

En el caso de AG no se realizó la comparación con un método publicado por no disponer de la instrumentación necesaria. Por ello, se realizó un estudio de recuperación aplicando un método de adición estándar y se obtuvo un resultado estadísticamente comparable a 100 % para esta analito en la muestra 1. Esto indica la ausencia de error proporcional debido a la matriz de la muestra.

Cabe destacar que en la muestra 3 no fue posible la resolución cromatográfica de AA por coeluir con otros componentes de la matriz. Por tanto, se realizó un estudio de recuperación aplicando un método de adición estándar y se obtuvo un resultado estadísticamente comparable a

100 %, comprobándose la ausencia de error proporcional debido a la matriz de la muestra.

A continuación se muestran los cromatogramas de cada una de las muestras comerciales obtenidos empleando una longitud de onda de compromiso de 268 nm.

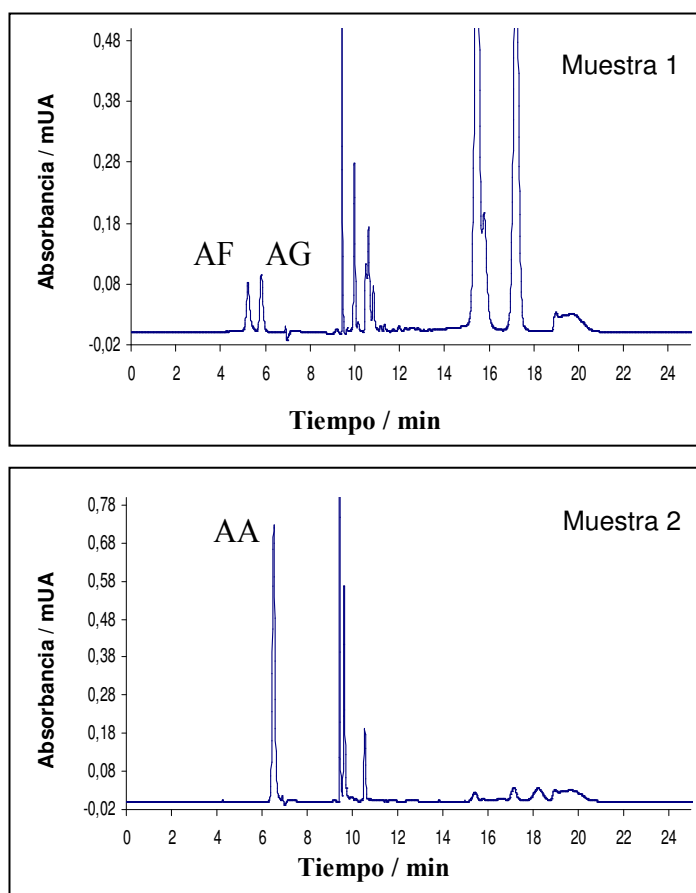


Fig 8.7. Cromatogramas de las muestras comerciales

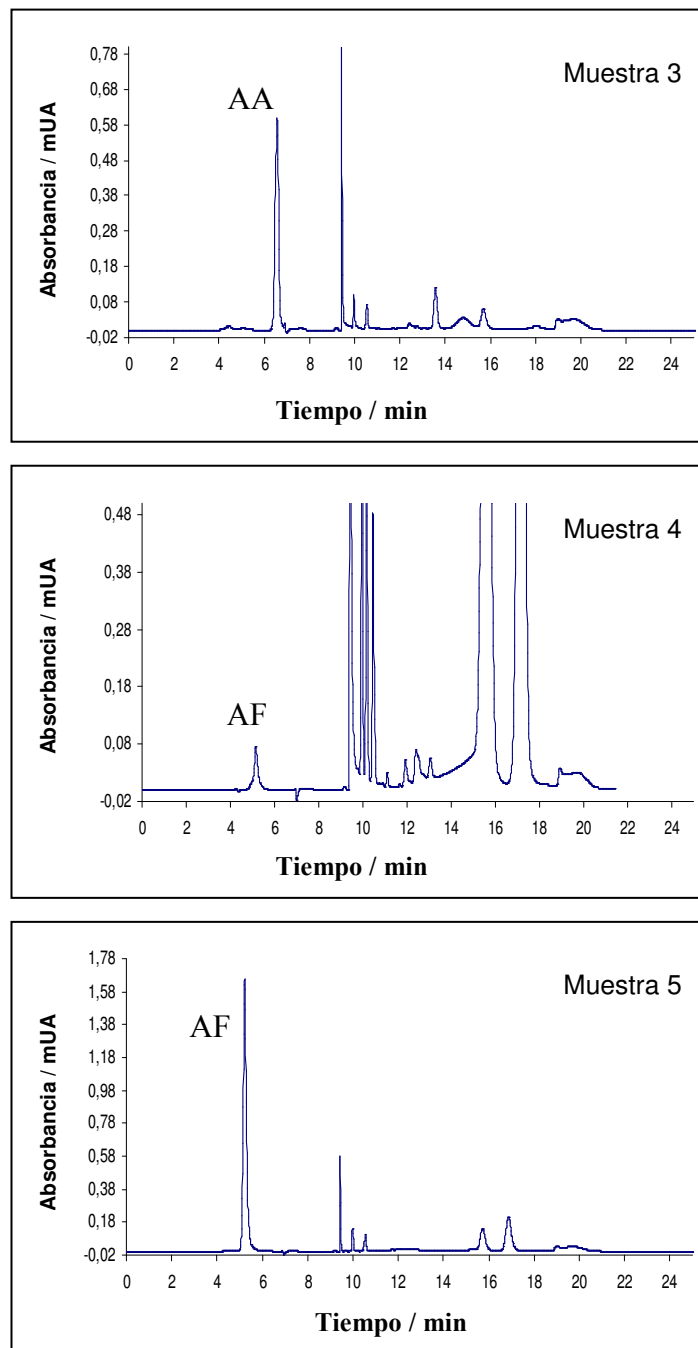


Fig 8.7. (Continuación)

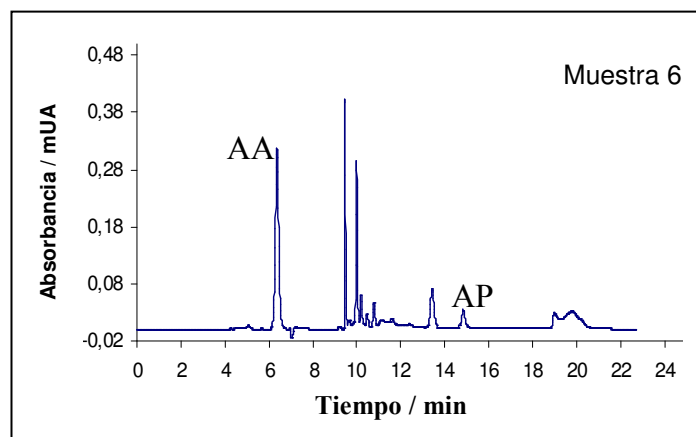


Fig 8.7. (Continuación)

8.4. CONCLUSIONES

Se ha desarrollado un método basado en cromatografía líquida para la determinación de ácido ascórbico y sus derivados ampliamente empleados en formulaciones cosméticas para el blanqueamiento de la piel.

Los parámetros analíticos son apropiados para la determinación de todos los analitos en este tipo de muestras.

La exactitud ha quedado contrastada mediante el análisis de una muestra sintética, estudios de interferentes, ensayos de recuperación y comparación con métodos ya publicados.

No se ha encontrado ningún antecedente de la determinación conjunta de los cuatro analitos aquí estudiados, ni en productos cosméticos ni en otro tipo de muestras.

Además, el método propuesto es seguro tanto para el operador como para el medio ambiente, ya que no utiliza disolventes orgánicos tóxicos.

El tiempo de desarrollo cromatográfico es de 30 minutos.

Por último, cabe destacar que el método propuesto es adecuado para su empleo por las empresas del sector cosmético ya que muchas de ellas disponen de la instrumentación necesaria.

Capítulo 9

**Desarrollo de un método analítico para la
determinación de kójico dipalmitato en productos
cosméticos para el blanqueamiento de la piel mediante
cromatografía líquida de exclusión con detección
espectrofotométrica UV/vis**

El contenido de este capítulo ha sido publicado en Talanta (2008)
75:407-411.

9.1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO DEL TRABAJO

El kójico dipalmitato (KD) es un agente despigmentante utilizado en las modernas formulaciones cosméticas (ver figura 9.1). El KD se presenta como una alternativa eficaz y más estable al tradicional uso del ácido kójico (ver capítulo 6).

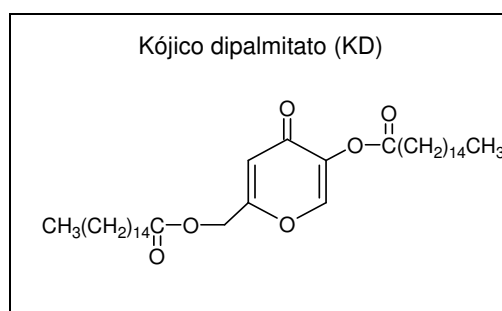


Fig. 9.1. Estructura química del kójico dipalmitato (KD)

Aunque no se tenga constancia de la aparición de efectos secundarios debidos a su utilización, es importante llevar a cabo su control analítico con el fin de asegurar que el KD se encuentra en un nivel de concentración suficiente para que sea eficaz. Cabe destacar que no existen métodos oficiales para determinar KD y, además, tampoco se han encontrado métodos publicados, lo que puede deberse a que es un ingrediente cosmético de muy reciente aparición.

Por tanto, el objetivo del presente trabajo es el desarrollo de un método cromatográfico seguro y rápido para la determinación de KD en productos cosméticos para el blanqueamiento de la piel, objetivo que se enmarca dentro de la justificación general de la Tesis Doctoral descrita al inicio de la presente Memoria.

Se propone la cromatografía de exclusión molecular con detección espectrofotométrica UV/vis como técnica analítica para llevar a cabo la determinación de KD.

9.2. PARTE EXPERIMENTAL

9.2.1. Metodología experimental

Se realizaron estudios previos de solubilidad del KD y se estudiaron sus propiedades espectrales. Se ensayaron diferentes caudales para conseguir una separación cromatográfica óptima del KD con respecto a otros componentes de la matriz de las muestras y se estudiaron las posibles interferencias que podían causar los filtros UV (ya que suelen adicionarse también a los productos cosméticos para el blanqueamiento de la piel) y otros agentes despigmentantes.

Se realizaron estudios de repetibilidad, linealidad y exactitud. Finalmente, se aplicó el método al análisis de cinco muestras comerciales.

9.2.2. Aparatos y material

Se utilizó un cromatógrafo de líquidos marca Hitachi (Tokio, Japón), con una bomba modelo L-7100 y con detector UV modelo L-7455 y una válvula de inyección Rheodyne® (Rohnert Park, CA, USA) con bucle de 20 µl.

Se empleó una columna analítica PLgel Mixed-D (copolímero poliestireno/divinilbenceno) (300 mm x 7,5 mm de diámetro interno y 5 µm de tamaño de partícula) y una precolumna PLgel Guard (mismo relleno que la columna analítica) (50 mm x 7,5 mm de diámetro interno y 5 µm de tamaño de partícula) de Polymer Laboratories (Church Stretton, Shropshire, Reino Unido).

Se utilizó un baño de ultrasonidos Selecta (Barcelona) para facilitar la extracción del KD.

9.2.3. Reactivos y muestras

Kójico dipalmitato (KD) (98 %) (Chengdu Wonho Biology Engineering Co., Ltd, Mainland, China), tetrahidrofurano (THF) grado GPC estabilizado con 250 ppm de 2,6-di-tert-butil-4-metilfenol (Scharlau Chemie S.A, Barcelona).

Se analizaron 5 muestras comerciales de los siguientes laboratorios: Sesderma (Valencia), Interpharma (Santa Coloma de Gramenet, Barcelona), SVR Laboratoires (Bondoufle, Francia), Industrial Farmacéutica Cantabria (Santander).

Se prepararon seis muestras sintéticas conteniendo KD para realizar los estudios de exactitud, siguiendo un protocolo de la empresa Guinama, a partir de ingredientes cosméticos adquiridos en dicha empresa (ver Apéndice III.6).

9.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.3.1. Ensayos preliminares

Se realizaron ensayos de solubilidad del KD en diferentes disolventes a fin de evaluar las posibilidades de utilización de fases móviles en el proceso cromatográfico posterior. Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente. Como disolventes se ensayaron agua, acetonitrilo, dimetilformamida, etanol, acetato de etilo, heptano, metanol, 4-metil-2-pentanona, 1-propanol, tetrahidrofurano (THF) y diclorometano. El KD sólo se disolvió satisfactoriamente en THF y en diclorometano.

Se ensayó la adición de agua a disoluciones de KD preparadas en ambos disolventes. Por un lado, el agua es inmiscible con el diclorometano. Por otro lado, cuando se adicionó agua (10%, aproximadamente) a una disolución de KD en THF se observó la precipitación del KD. Se decidió entonces emplear THF puro como disolvente, ya que presenta una menor toxicidad que el diclorometano. Se preparó una disolución de $150 \mu\text{g ml}^{-1}$ de KD en THF y se obtuvo el espectro de absorción ultravioleta que aparece en la figura 9.2.

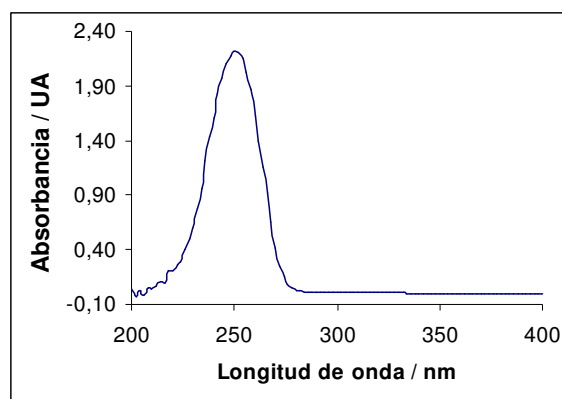


Fig. 9.2. Espectro de absorción del KD ($150 \mu\text{g ml}^{-1}$) en THF

Como se puede observar, en THF el KD presenta un máximo de absorción a una longitud de onda (λ) de 248 nm.

Dado que su determinación directa mediante espectrofotometría UV/vis no es posible debido a la presencia de sustancias interferentes, se estudió la posibilidad de llevar a cabo su determinación mediante cromatografía líquida de fase reversa, con una columna C18. Con el fin de evitar la precipitación del KD en el interior de la columna se eligió como fase móvil cromatográfica THF 100%.

Para ello se empleó una columna de fase reversa como la LiChrospher® RP-18 (250 mm x 4 mm de diámetro interno y 5 μm de tamaño de partícula). Se observó que empleando como fase móvil THF 100% a un caudal de 1 ml min^{-1} , el KD no se retenía en la columna, eluyéndose en el tiempo muerto junto con el resto de componentes de la muestra. Por tanto, se desestimó este mecanismo de retención cromatográfico.

Se estudió la posibilidad de emplear cromatografía líquida de exclusión molecular, con una columna PLGel Mixed-D (ver apartado 9.2.2) aprovechando que el THF es uno de los disolventes más utilizados para este tipo de cromatografía y que la molécula de KD presenta un volumen hidrodinámico aparentemente superior al resto de principios despigmentantes, filtros solares y demás componentes de la matriz potencialmente interferentes. También se estudió el efecto del caudal en la separación cromatográfica ensayando caudales desde $0,5$ a $1,5 \text{ ml min}^{-1}$. No se ensayaron caudales mayores por limitaciones técnicas de sobrepresión.

Obviamente, el tiempo de retención del KD disminuye al aumentar el caudal, pero en ningún caso se vió afectada significativamente la separación cromatográfica entre el analito y el resto de ingredientes cosméticos ensayados. Por tanto, se empleó un caudal de $1,5 \text{ ml min}^{-1}$, ya que así se obtiene un tiempo de retención de aproximadamente 5,90 minutos (ver figura 9.3) y un tiempo de desarrollo cromatográfico menor que 8 minutos.

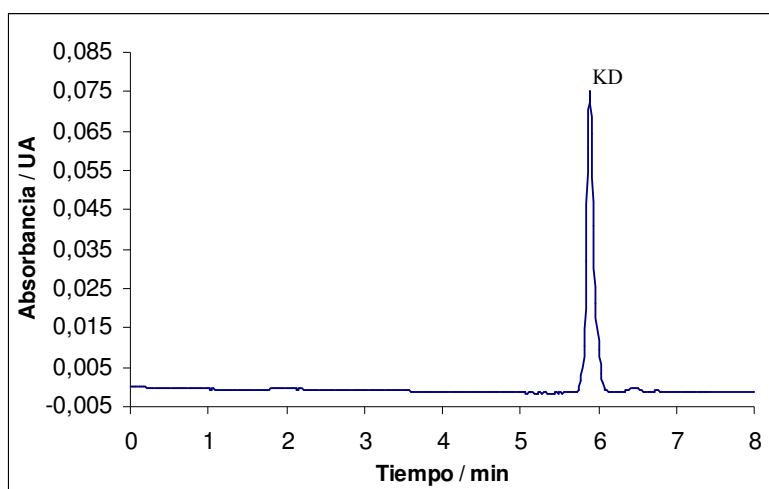


Fig. 9.3. Cromatograma de una disolución patrón de KD de $40 \mu\text{g ml}^{-1}$

9.3.2. Estudio de las interferencias

Bajo las condiciones seleccionadas, se ensayaron diferentes compuestos que habitualmente se encuentran combinados con el KD en los productos cosméticos para el blanqueamiento de la piel, con el fin de evaluar su posible efecto interferente.

Se estudiaron los siguientes agentes despigmentantes: arbutina, hidroquinona, ácido kójico, ácido ascórbico, ascorbil glucósido, ascorbil fosfato (sal sódica) y ascorbil palmitato. El ácido ascórbico, ascorbil glucósido y ascorbil fosfato son insolubles en THF, por tanto quedan retenidos en la etapa de filtrado, previa a la inyección. Los otros cuatro agentes despigmentantes tampoco interfieren en la determinación del KD (tiempo de retención, 5,90 min) ya que eluyen posteriormente (6,21, 6,50, 6,51 y 6,53 min, respectivamente) por su menor tamaño molecular.

También se comprobó las interferencias causadas por filtros UV que pudieran coeluir con el KD, ya que en muchas formulaciones se añaden con los agentes despigmentantes para prevenir la aparición de nuevas manchas solares y proteger la piel de la radiación solar.

Se ensayaron los siguientes filtros UV liposolubles: homosalato, benzofenona-3, butil metoxidibenzoil metano, octocrileno, etilhexil metoxicinamato, isoamil metoxicinamato, etilhexil triazona, drometizol trisiloxano, dietilhexil butamido triazona, 4-metilbenciliden canfor, etilhexil salicilato, etilhexil dimetil PABA, bis-etilhexiloxifenol metoxifenil triazina y polisilicona-15.

Sólo tres de estos filtros UV coeluyeron con el KD: etilhexil triazona, dietilhexil butamido triazona y bis-etilhexiloxifenol metoxifenil triazina. El resto de filtros UV eluyeron después del KD debido a su menor tamaño, menos la polisilicona-15, que eluyó antes.

También se ensayaron los siguientes filtros hidrosolubles: benzofenona-4, PEG-25 PABA, PABA, ácido fenilbencimidazol sulfónico y fenil dibencimidazol tetrasulfonato disódico. Todos ellos, eluyen después que el analito debido a su menor tamaño, menos el PEG-25 PABA, que coeluye con él.

Cabe destacar que estos cuatro filtros que coeluyen con el KD no se han encontrado en ningún producto despigmentante comercial. No obstante, esta limitación deberá considerarse cuando se lleve a cabo análisis de otras muestras comerciales.

Por tanto, mediante el método propuesto se consigue la resolución cromatográfica del KD del resto de principios despigmentantes y de filtros UV más utilizados.

9.3.3. Método propuesto para la determinación de kójico dipalmitato (KD)

Homogeneizar la muestra y pesar por triplicado entre 0,02 y 0,07 g en un matraz aforado de 10 ml. Disolver en aproximadamente 5 ml de THF. Con el fin de acelerar la disolución del analito, se puede hacer uso de un baño de ultrasonidos. Enrasar con THF y filtrar.

Preparar disoluciones patrón entre 20 y 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ en THF.

Se inyectan 20 μl , tanto de las disoluciones de muestra como de las disoluciones patrón a través de un filtro de membrana de 0,45 μm . Se emplea una columna PLgel Mixed-D con precolumna PLgel Guard, THF 100% como fase móvil, un caudal de 1,5 ml min^{-1} y la detección se lleva a cabo a 248 nm.

9.3.4. Parámetros analíticos del método

Parámetros cromatográficos

Se estimó la precisión de las lecturas de los tiempos de retención y de las áreas mediante 5 medidas de una disolución patrón de KD de $50 \mu\text{g ml}^{-1}$.

El tiempo de retención fue $5,90 \pm 0,01$, expresado como media de las 5 medidas \pm su desviación estándar. El coeficiente de variación del área fue del 0,9%.

Parámetros de calibración

En la tabla siguiente se indican los parámetros de la recta de regresión, donde **a** y **s_a** son la ordenada en el origen y su desviación típica; **b** y **s_b** la pendiente y su desviación típica; **r** es el coeficiente de regresión y **s_{y/x}** la desviación típica de los residuales.

Tabla 9.1. Recta de regresión representativa para el KD

a \pm s_a / $\mu\text{V s}$	b \pm s_b / $\mu\text{V s ml } \mu\text{g}^{-1}$	r²	s_{y/x}
-8000 \pm 3000	6220 \pm 10	0,99998	6000

La sensibilidad del método, estimada mediante el valor de la pendiente de la curva de calibración, es $6220 \mu\text{V s ml } \mu\text{g}^{-1}$.

El límite de detección instrumental estimado mediante el criterio de $3 \cdot s_{y/x} / b$ es de $3 \mu\text{g ml}^{-1}$.

Estudio de la exactitud

Para evaluar la exactitud se prepararon seis cremas sintéticas conteniendo concentraciones conocidas de KD y se analizaron por el método propuesto. Las seis cremas sintéticas fueron preparadas en base a tres matrices distintas, introduciendo diferentes concentraciones de KD y empleando diversos ingredientes cosméticos, especialmente una gran

variedad de filtros solares y agentes despigmentantes. En el Apéndice III.6 de esta Tesis Doctoral se muestra la composición porcentual de las seis muestras sintéticas, así como su modo de elaboración. También se expone la utilidad de cada uno de los ingredientes utilizados.

A continuación se muestran los cromatogramas de las seis muestras sintéticas (MS-1 a MS-6).

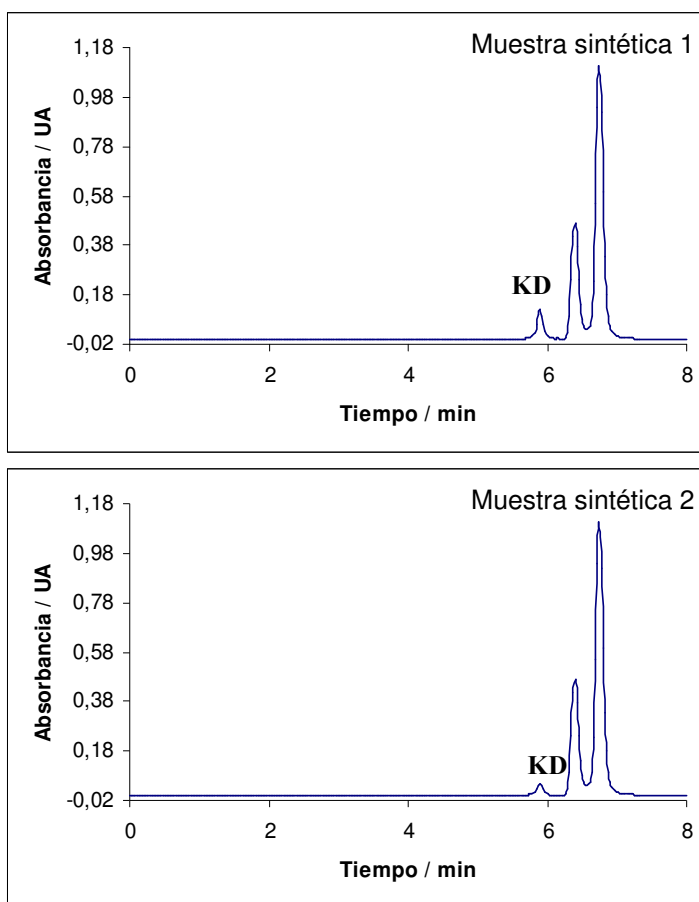


Fig 9.4. Cromatogramas de las muestras sintéticas

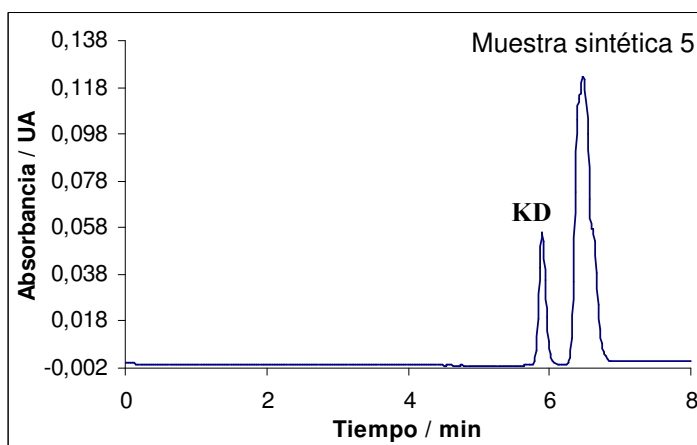
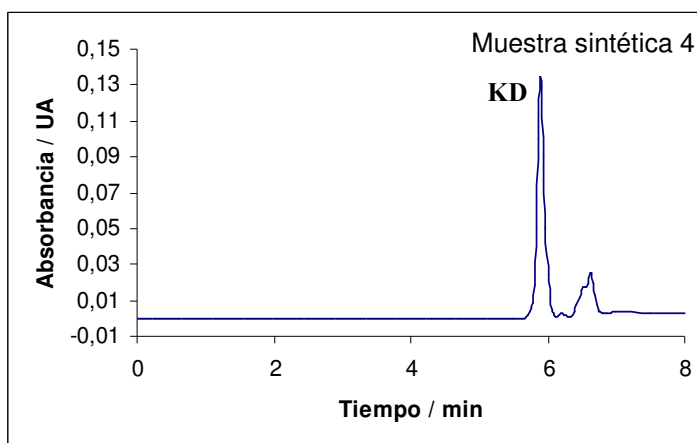
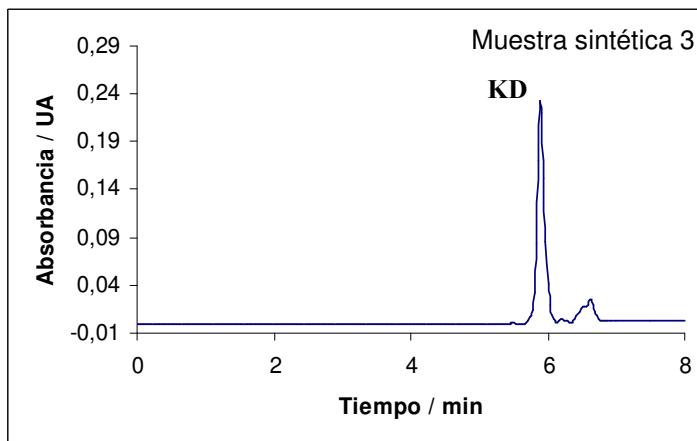


Fig 9.4. (Continuación)

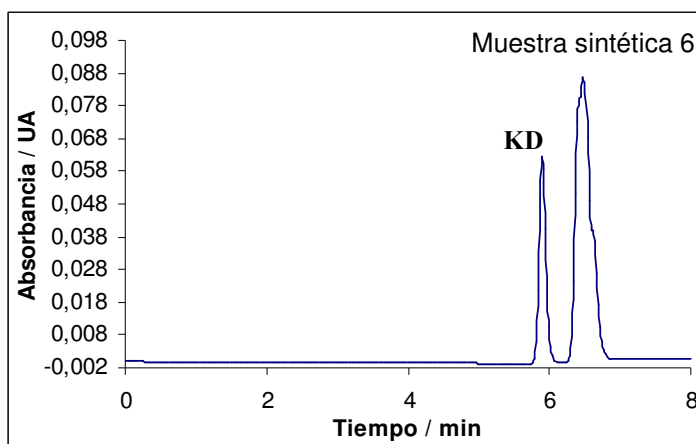


Fig 9.4. (Continuación)

En la siguiente tabla se muestran los resultados de concentración, **C**, obtenidos con su desviación estándar **s**, para las seis cremas sintéticas, junto a su valor real **C_{real}**, y el error relativo cometido.

Tabla 9.2. Comparación de los valores de concentración de las cremas sintéticas con los valores reales

Muestras sintéticas	C ± s / %	C _{real} / %	Error / %
MS-1	1,46 ± 0,02	1,52	-3,9
MS-2	0,490 ± 0,008	0,49	0,0
MS-3	2,08 ± 0,01	2,16	-3,7
MS-4	2,692 ± 0,002	2,66	1,2
MS-5	1,028 ± 0,002	1,05	-2,1
MS-6	2,81 ± 0,07	2,84	-1,1

Como se puede apreciar, el error cometido es pequeño, menor del 4%.

Los valores obtenidos fueron comparados con los reales mediante un modelo de regresión lineal y el test descrito en el Apéndice II.5.

La ecuación obtenida fue $y = (1,00 \pm 0,02) x - (0,02 \pm 0,04)$; siendo **y** la concentración obtenida y **x** la concentración real.

El valor de $(t_{cal})_a$ fue de 0,50 mientras que el de $(t_{cal})_b$ fue de 0,15 (ver Apéndice II.5). Como el valor crítico del parámetro **t** de Student para un nivel de confianza del 95% y 6 puntos experimentales es de 2,78, se puede concluir que los resultados obtenidos por el método propuesto son estadísticamente exactos, para el conjunto de muestras estudiado.

9.3.5. Aplicación del método propuesto al análisis de productos para el blanqueamiento de la piel comerciales

Se prepararon calibrados de adición estándar de KD en cada una de las cinco muestras comerciales. Las pendientes obtenidas se compararon con las de un calibrado normal, calculándose el coeficiente de recuperación (R) mediante:

$$\% R = (b_{a,e}/b)*100$$

siendo $b_{a,e}$ la pendiente del calibrado de adición estándar y b la pendiente del calibrado normal.

A continuación se muestran los coeficientes de recuperación obtenidos.

Tabla 9.3. Coeficientes de recuperación obtenidos para el KD en las muestras

Muestra	R / %
1	99 ± 2
2	101 ± 2
3	102 ± 2
4	102 ± 2
5	100 ± 2

A la vista de los resultados se puede afirmar la ausencia de errores proporcionales ocasionados por la matriz de las muestras.

Finalmente, se determinó la concentración de KD en cada una de las muestras comerciales utilizando el método propuesto. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 9.4. Resultados del análisis de las cinco muestras comerciales

Muestra	C±s / % (m/m)
1	1,11 ± 0,01
2	1,79 ± 0,08
3	1,58 ± 0,03
4	2,14 ± 0,08
5	0,34 ± 0,01

Los coeficientes de variación obtenidos en el análisis de las cinco muestras oscilan entre el 0,4% y el 4%.

En la siguiente figura se muestra un cromatograma de cada una de las muestras comerciales.

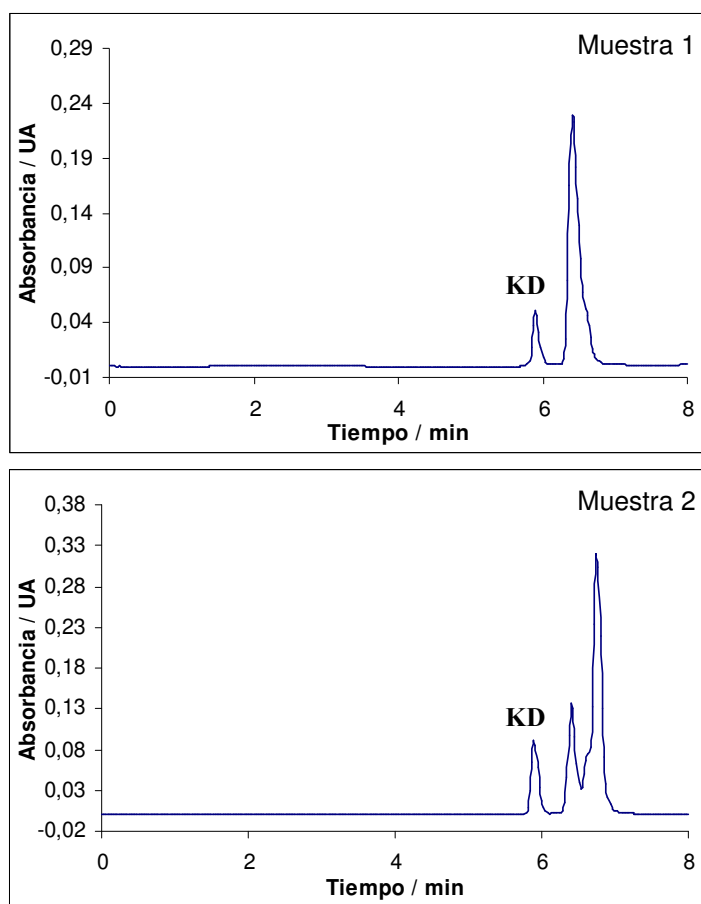


Fig. 9.5. Cromatogramas de las muestras comerciales

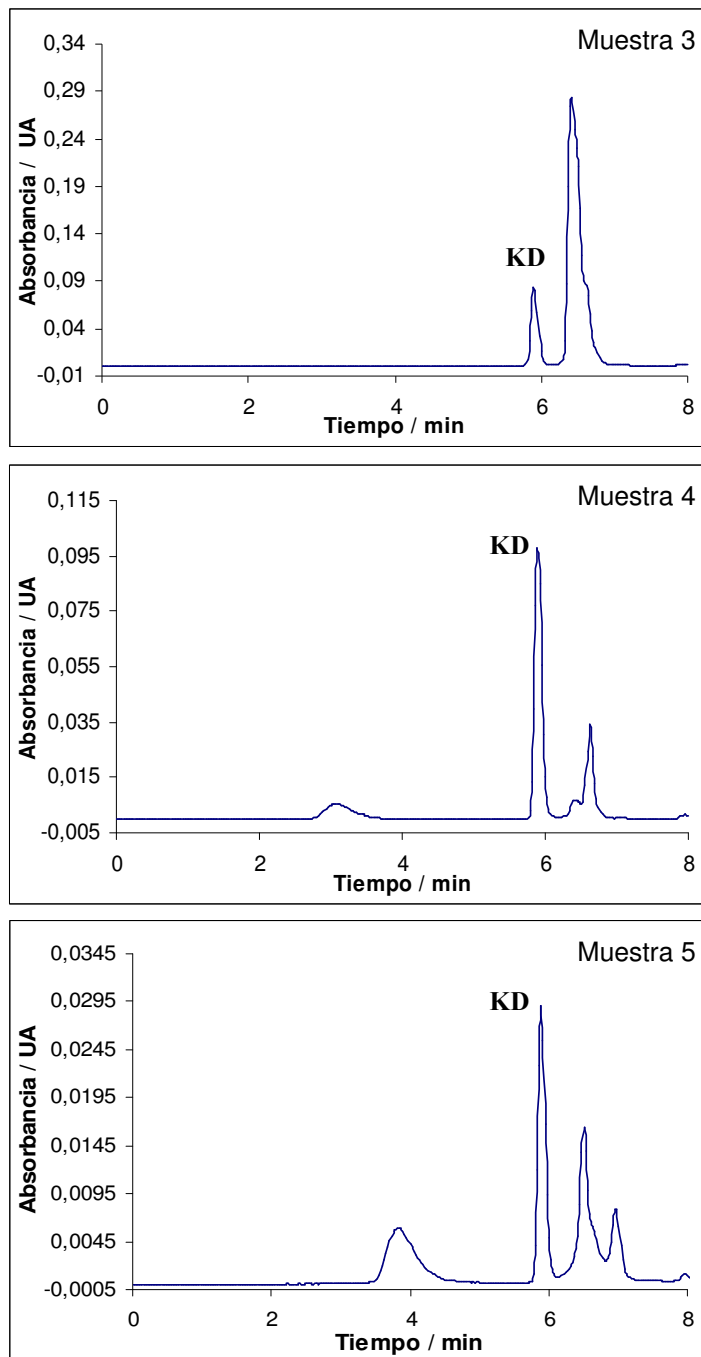


Fig. 9.5. (Continuación)

Como se puede observar, cada cromatograma puede realizarse en menos de 8 minutos.

9.4. CONCLUSIONES

Se ha desarrollado un método basado en cromatografía de exclusión molecular para la determinación de kójico dipalmitato (KD), el cual es un nuevo agente despigmentante de gran estabilidad, utilizado en las modernas formulaciones cosméticas para el blanqueamiento de la piel.

No se ha encontrado ningún antecedente de la determinación de este compuesto en ningún tipo de muestra.

Los parámetros analíticos del método propuesto son apropiados para la determinación de KD en productos para el blanqueamiento de la piel.

La exactitud se ha contrastado mediante el análisis de muestras sintéticas de concentración conocida, estudios de interferentes y ensayos de recuperación con adiciones estándar a las muestras comerciales.

Por último, cabe destacar que el método propuesto es relativamente rápido (menos de 8 minutos por cromatograma) y asequible para su uso por las empresas del sector cosmético.

CONCLUSIONES GENERALES

PRIMERA PARTE

Estudio del proceso de absorción percutánea y excreción urinaria del filtro solar PDT.

En el **Capítulo 2** se propone por primera vez un método analítico que permite la determinación de fenil dibencimidazol tetrasulfonato disódico (PDT) a niveles de ng ml^{-1} en muestras de orina.

La determinación selectiva de PDT en muestras de orina se realiza mediante un sistema de análisis por inyección secuencial (SIA) que permite llevar a cabo una etapa de extracción en fase sólida y posterior detección fluorimétrica.

Al estar automatizado el proceso, se consigue una disminución del consumo de reactivos y de los residuos generados. El sistema SIA puede ser programado mediante el *software* adecuado.

La aplicación de la adición estándar en línea empleando el sistema SIA permite compensar el efecto matriz partiendo de una única disolución patrón. La exactitud del método desarrollado ha sido probada mediante el análisis de muestras de orina fortificadas.

La sensibilidad del método permite la determinación de PDT en muestras de orina de voluntarios después de la aplicación tópica del producto solar.

En los resultados obtenidos para los estudios de excreción de los voluntarios se puede apreciar que el organismo excreta el PDT a través de la orina durante 8–50 horas (en función de los distintos voluntarios) después de la aplicación del producto solar.

El método propuesto en el **Capítulo 3** permite conocer el grado de penetración cutánea del PDT en lociones solares sin interferencias, empleando un sistema de simulación *in vitro* con celdas de difusión. No existía ningún estudio previo sobre este filtro UV.

Los parámetros de sensibilidad, límite de detección y precisión en la determinación son apropiados para los niveles de concentración encontrados en el líquido receptor.

La máxima absorción percutánea obtenida a las 24 h es 1,5%, siendo la media del 1%.

El procedimiento propuesto para la evaluación de la integridad de las celdas de difusión mediante la determinación del marcador RF es un

Conclusiones generales

método general que podría ser aplicado en otros estudios basados en el uso de celdas de difusión.

Los métodos propuestos en los **Capítulos 2 y 3** de esta Memoria pueden ser de una gran utilidad para su aplicación en estudios farmacocinéticos, con el fin de elaborar conclusiones estadísticamente significativas acerca de los procesos de absorción/excreción de los filtros solares, en particular el PDT, en humanos.

Estas conclusiones permitirán mantener en el mercado del sector cosmético las formulaciones solares que contienen filtros con poca absorción percutánea y rápida eliminación del organismo, sustituyendo los demás filtros por nuevos compuestos que proporcionen similar protección solar, pero menor penetrabilidad y permanencia en el organismo. De esta forma se contribuye a una progresiva mejora de la seguridad de las formulaciones solares.

Estudio del proceso de absorción percutánea y excreción urinaria del filtro solar PEG-25 PABA.

En el **Capítulo 4** se recoge un método analítico que permite determinar polietileno glicol 25 p-aminobenzoato (PEG-25 PABA) en la orina de los usuarios de productos cosméticos. No existen en la bibliografía métodos analíticos para la determinación de este analito en orina.

El análisis se puede realizar satisfactoriamente a pesar de los bajos niveles a los que se encuentra el PEG-25 PABA en la orina, ya que el método propuesto presenta un límite de cuantificación muy bajo.

El método analítico proporciona resultados estadísticamente exactos, además de una buena precisión.

En los resultados obtenidos para los estudios de excreción de los tres voluntarios se puede apreciar que el organismo excreta el PEG-25 PABA a través de la orina en 60–90 horas después de la aplicación del producto solar y el porcentaje de excreción urinaria es del orden del 0,015% del total aplicado.

El método *in vitro* propuesto en el **Capítulo 5**, basado en el uso de celdas de difusión, permite conocer el grado de penetración cutánea del PEG-25 PABA en productos solares sin interferencias. No se había realizado anteriormente ningún estudio sobre este filtro UV.

Además, se ha desarrollado un método analítico que permite determinar el porcentaje de recuperación total del PEG-25 PABA adicionado.

Conclusiones generales

Los parámetros de sensibilidad, límite de cuantificación y precisión en la determinación de PEG-25 PABA son apropiados en ambos métodos para los niveles de concentración encontrados en la matriz.

Los resultados muestran la aplicabilidad de los métodos para el estudio de la biocinética del filtro PEG-25 PABA.

Se observa que el PEG-25 PABA presenta una menor absorción percutánea si se formula en forma de gel, minimizando en gran medida la presencia de PEG-25 PABA en la circulación sistémica. Además, de esta forma se mejora su eficacia, ya que el producto sigue en las capas externas de la epidermis, donde realiza su acción protectora de la radiación UV.

El desarrollo de los métodos descritos en esta Primera Parte de la Tesis Doctoral para el estudio de los procesos de absorción/excreción de los filtros solares en el cuerpo humano, permitirá contribuir al diseño de nuevos filtros y formulaciones que presenten poca absorción percutánea.

SEGUNDA PARTE

Estudios sobre el control analítico de las formulaciones para blanquear la piel

El método propuesto en el **Capítulo 7**, basado en la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, permite la determinación conjunta de cinco sustancias despigmentantes en productos cosméticos, con buenos límites de detección. Requiere el uso de DMF y es necesaria la derivatización de los analitos, para favorecer su volatilización.

El método basado en cromatografía líquida y detección espectrofotométrica UV/vis permite la determinación conjunta de cuatro sustancias despigmentantes en productos cosméticos con límites de detección adecuados al problema analítico. Se puede considerar un método de análisis limpio, tanto en la preparación de la muestra como en el procedimiento cromatográfico. Sin embargo, no permite la determinación de ácido azeláico, ya que no es soluble en el medio utilizado y en algunos casos la matriz de la muestra impide la completa lixiviación de los analitos. El método propuesto es relativamente rápido y fácilmente aplicable en las empresas del sector.

De los estudios realizados se concluye que el método basado en la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas desarrollado conduce a excelentes resultados para la determinación conjunta de todos

Conclusiones generales

los analitos estudiados, no existiendo en la bibliografía ningún otro método con estas características.

En el **Capítulo 8** se recoge un método basado en cromatografía líquida para la determinación del ácido ascórbico y sus derivados ampliamente empleados en formulaciones cosméticas despigmentantes.

Los parámetros analíticos son apropiados para la determinación de todos los analitos en este tipo de muestras. La exactitud ha quedado contrastada mediante el análisis de una muestra sintética, estudios de interferentes, ensayos de recuperación y comparación con otros métodos.

No se ha encontrado ningún antecedente de la determinación conjunta de los cuatro analitos aquí estudiados, ni en productos cosméticos ni en otro tipo de muestras.

Además, el método propuesto es limpio, tanto para el operador como para el medio ambiente, ya que no utiliza disolventes orgánicos tóxicos.

El tiempo de desarrollo del cromatograma es de 30 minutos.

Por último, cabe destacar que el método propuesto es adecuado para su uso por las empresas del sector cosmético ya que muchas de ellas disponen de la instrumentación necesaria.

En el **Capítulo 9** se expone un método basado en cromatografía de exclusión para la determinación de kójico dipalmitato. Se trata de un nuevo agente despigmentante de gran estabilidad.

No se ha encontrado ningún antecedente de la determinación de este compuesto en ningún tipo de muestra.

Los parámetros analíticos del método propuesto son apropiados para la determinación de kójico dipalmitato en productos despigmentantes.

La exactitud ha quedado contrastada mediante el análisis de muestras sintéticas de concentración conocida, estudios de interferentes y ensayos de recuperación mediante adiciones estándar a las muestras comerciales.

Por último, cabe destacar que el método propuesto es rápido y asequible para poder ser utilizado por las empresas del sector cosmético.

APÉNDICE I

CLAVES EMPLEADAS

A continuación se muestran las claves empleadas a lo largo de esta memoria.

Claves generales y técnicas analíticas

Clave	Descripción
C18	Octadecilo en base sílice
Cact	Carbón activo
CG	Cromatografía de gases
CL	Cromatografía líquida
CN	Cianopropilo en base sílice
CR	Coefficiente de reparto octanol/agua
D	Coefficiente de difusión
EFS	Extracción en fase sólida
EM	Espectrometría de masas
FIA	Análisis por inyección en flujo
FL	Fluorescencia
J	Flujo a través de la epidermis
K	Coefficiente de reparto
Kp	Coefficiente de permeabilidad
NH ₂	Aminopropilo en base sílice
PRS	Ácido propilsulfónico en base sílice
SAX	Trimetil aminopropil en base sílice
Si	Sílice
SIA	Análisis por inyección en flujo secuencial
SIM	Modo de detección en espectrometría de masas basado en la monitorización de una o unas pocas relaciones masa/carga
SPLIT	División de flujo
TER	Resistencia eléctrica transdérmica
TEWL	Pérdida de agua transepidérmica
TIC	Modo de detección en espectrometría de masas basado en la monitorización de un intervalo amplio de relaciones masa/carga
t _i	Tiempo de latencia
UV/vis	Espectrofotometría ultravioleta/visible

Claves de reactivos y disolventes de uso general

Clave	Descripción
AcOH	Ácido acético
BSTFA	N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
CAF	Cafeína
DMF	Dimetilformamida
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EtOH	Etanol
HCl	Ácido clorhídrico
H ₃ PO ₄	Ácido o-fosfórico
MeOH	Metanol
NaCl	Cloruro sódico
Na ₂ HPO ₄	Monohidrógeno fosfato sódico
NaH ₂ PO ₄	Dihidrógeno fosfato sódico
NaOH	Hidróxido sódico
NH ₃	Amoniac
RF	Rojo de fenol
TBAH	Hidróxido de tetrabutilamonio
THF	Tetrahidrofurano

Claves de filtros UV y despigmentantes

Clave	Descripción
3BC	3-benciliden canfor
AA	Ácido ascórbico
AF	Ascorbil fosfato
AG	Ascorbil glucósido
AK	Ácido kójico
AP	Ascorbil palmitato
AR	Arbutina
AZ	Ácido azelaico
BDM	Butil metoxi dibenzoilmetano
BZ3	Benzofenona -3
BZ4	Benzofenona-4
EDP	Etilhexil dimetil PABA
EMC	Etilhexil metoxicinamato
EMT	Bis-etilhexiloxifenol metoxifenil triazina
ES	Etilhexil salicilato
ET	Etilhexil triazona
HQ	Hidroquinona
HS	Homosalato
IDM	Isopropil dibenzoilmetano
IMC	Isoamil metoxicinamato
KD	Kójico dipalmitato
MBC	4-metilbenciliden canfor
MBP	Metilen bisbenzotriazolil tetrametilbutilfenol
OCR	Octocrieno
PEG-25 PABA	PEG-25 PABA
PABA	PABA
PBS	Ácido fenilbenzimidazol sulfónico
PDT	Fenildibencimidazol tetrasulfonato disódico
RS	Resorcinol
TDS	Ácido tereftaliden dicanfor sulfónico

APÉNDICE II

CONTRASTES DE SIGNIFICACIÓN

A continuación se resumen los contrastes de significación utilizados a lo largo de la presente Tesis Doctoral.

II.1. Contraste de Fisher para la comparación de desviaciones estándar

Para comprobar si es significativa la diferencia entre dos varianzas muestrales (Miller y Miller, 2002, pág.53), es decir, para comprobar la hipótesis nula $H_0: \sigma^2_1 = \sigma^2_2$ (varianzas poblacionales iguales), se calcula el estadístico **F**:

$$F = s^2_1 / s^2_2$$

donde **s**₁ es la desviación estándar de la primera serie de datos (con **n**₁ número de valores) y **s**₂ es la desviación estándar de la segunda (con **n**₂ número de valores). Ambas desviaciones se disponen en la ecuación de modo que el estadístico **F** sea mayor o igual a uno.

El número de grados de libertad son **n**₁-1 y **n**₂-1, para la primera y la segunda serie de datos respectivamente.

Si el valor de **F** calculado supera al valor crítico de **F** para un determinado nivel de significación y **n**₁-1 y **n**₂-1 grados de libertad se rechaza la hipótesis nula.

II.2. Comparación de una media experimental con un valor conocido

Para contrastar si un valor medio obtenido experimentalmente (\bar{x}) de la población es igual a un valor conocido μ (Miller y Miller, 2002, pág.44), es decir, que no existe diferencia significativa entre la media muestral \bar{x} y μ ($H_0: \bar{x} = \mu$), se calcula el estadístico **t**:

$$t = \frac{(\bar{x} - \mu)\sqrt{n}}{s}$$

donde **n** es el número de valores de la media muestral y **s** su desviación estándar.

Si el valor de **t** calculado (en valor absoluto) supera al valor crítico para un determinado nivel de significación y **n**-1 grados de libertad se rechaza la hipótesis nula.

II.3. Comparación de dos medias experimentales

Para comprobar si la diferencia entre dos valores medios obtenidos experimentalmente, \bar{x}_1 y \bar{x}_2 es significativa (Miller y Miller, 2002, pág.46-48), es decir, comprobar la hipótesis nula $H_0: \bar{x}_1 = \bar{x}_2$ (medias experimentales iguales), se calcula el estadístico **t**:

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}, \text{ donde } s \text{ se calcula como } s = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)}}$$

donde **s**₁ y **s**₂ son las desviaciones estándar de cada media muestral y **n**₁ y **n**₂ son el número de valores de cada media.

Si el valor de **t** calculado (en valor absoluto) supera al valor crítico para un determinado nivel de significación y **n**₁+**n**₂-2 grados de libertad se rechaza la hipótesis nula.

Este método supone que las muestras se extraen de poblaciones con desviaciones estándar comparables (ver apartado II.1).

Cuando las desviaciones estándar no son comparables se calcula el estadístico **t** de la siguiente manera:

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \text{ con grados de libertad (v)} \quad v = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\left(\frac{s_1^4}{n_1^2(n_1 - 1)} + \frac{s_2^4}{n_2^2(n_2 - 1)}\right)}$$

redondeándose el valor obtenido al número entero más próximo.

II.4. Comparación de dos rectas de regresión

Dos rectas de regresión son estadísticamente comparables si lo son sus pendientes (**b**) y si lo son sus ordenadas en el origen (**a**) (Comimissariat a l’Energie Atomique, 1978, pág. 188 y 369). Las desviaciones estándar de las dos pendientes (**s_{b1}** y **s_{b2}**) deben ser estadísticamente comparables (ver apartado II.1).

Se calcula entonces una desviación estándar conjunta (**s_b**):

$$s_b = \frac{(n_1 - 2)s_{b1}^2 + (n_2 - 2)s_{b2}^2}{n_1 + n_2 - 4} \quad \text{y se calcula el estadístico } t$$

como: $t = \frac{(b_1 - b_2)}{s_b \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$, donde **s_{b1}** y **s_{b2}** son las desviaciones estándar

de cada pendiente y **n₁** y **n₂** son el número de puntos de cada recta de regresión.

De modo similar se calcula el estadístico **t** para la comparación de las ordenadas en el origen: $t = \frac{(a_1 - a_2)}{s_a \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$, donde

$$s_a = \frac{(n_1 - 2)s_{a1}^2 + (n_2 - 2)s_{a2}^2}{n_1 + n_2 - 4}$$

y **s_{a1}** y **s_{a2}** son las desviaciones estándar de cada ordenada en el origen.

Si el valor de **t** calculado (en valor absoluto) supera al valor crítico para un determinado nivel de significación y **n₁+n₂-4** grados de libertad las dos pendientes u ordenadas en el origen no son comparables.

II.5. Comparación de dos series de resultados mediante un modelo de regresión lineal

El empleo de un modelo de regresión lineal para contrastar si los valores de dos series de datos son estadísticamente comparables es de gran utilidad cuando se comparan los resultados obtenidos por un método propuesto con los obtenidos con otro método tomado como referencia o con los valores reales en el caso de muestras sintéticas.

Se representan los valores obtenidos por el método a evaluar en el eje de ordenadas frente a los valores tomados como referencia (eje de abscisas). Si ambas series de datos no difieren significativamente se obtendrá una recta cuya ordenada en el origen (**a**) será cero, y su pendiente (**b**) será igual a uno.

Para contrastar esta hipótesis, se emplea el contraste de **t** de Student, de modo que:

$$(t_{cal})_a = \frac{|a - 0|}{s_a} \qquad (t_{cal})_b = \frac{|b - 1|}{s_b}$$

siendo **s_a** la desviación estándar de la ordenada en el origen y **s_b** la desviación estándar de la pendiente de la recta de regresión obtenida (Ramis y García, 2001, pág.120; Miller y Miller, 2002, pág. 130).

Si los valores de **t** calculados superan el valor crítico de **t** para un nivel de confianza concreto y **N-2** grados de libertad (siendo **N** el número de puntos de la recta de regresión), entonces se debe rechazar la hipótesis nula y considerar que sí que existen diferencias significativas entre las dos series de datos.

II.6. Cálculo de la desviación estándar de los resultados obtenidos mediante adición estándar

La desviación estándar (**s**) viene descrita por la siguiente fórmula (Miller y Miller, 2002):

$$s = (s_{y/x} / b) \cdot \left[(1/N) + (\bar{y}^2 / (b^2 \cdot \sum (x_i - \bar{x})^2)) \right]^{1/2}$$
, siendo **s_{y/x}**, **b** y **N** la desviación estándar, la pendiente y el número de puntos de la recta de calibrado de adición estándar, respectivamente; **x** e **y** son los valores de abscisas y ordenadas.

APÉNDICE III

ELABORACIÓN DE LOS PRODUCTOS COSMÉTICOS SINTÉTICOS EMPLEADOS EN LOS DIFERENTES ESTUDIOS REALIZADOS

Los ingredientes cosméticos empleados para la elaboración de los productos cosméticos sintéticos fueron adquiridos en la empresa Guinama (Alboraya).

A continuación se detallan todos los componentes empleados en la elaboración de los productos sintéticos, así como sus funciones y cualidades cosméticas:

- **Aceite de aguacate:** Su función principal es la de sobreengrasante de la piel y dermoprotector. Se trata de una mezcla natural de ácidos grasos saturados, oléico y linoléico. Rico en vitaminas A, B1, B2, D y E.
- **Aceite de coco:** Se utiliza como humectante y actúa como capa protectora, ayudando a retener la humedad de la piel.
- **Aceite de germen de trigo:** Se considera la fuente más importante de vitamina E. Posee ácidos grasos esenciales, octacosanol, ácido linoléico, ácido oléico, ácido plamítico, provitamina A, vitamina F y estearina. Debido a su contenido en vitamina E es antioxidante, protege de los radicales libres, suaviza la piel hidratándola y dándole mayor elasticidad.
- **Acelerador del bronceado:** Es un preparado compuesto por tirosina y riboflavina que favorece el proceso de formación de la melanina.
- **Ácido ascórbico:** Agente despigmentante que inhibe la formación de melanina.
- **Ácido azeláico:** Agente despigmentante que inhibe la formación de melanina.
- **Ácido fenilbencimidazol sulfónico:** Filtro UV que protege de la radiación solar.
- **Ácido fítico:** Agente despigmentante que inhibe la formación de melanina.
- **Ácido glicólico:** Es un agente exfoliante que elimina las capas muertas de la piel y favorece la renovación celular y la absorción de los principios activos.
- **Ácido kójico:** Agente despigmentante que inhibe la formación de melanina.
- **Ácido láctico:** Agente exfoliante que elimina las capas muertas de la piel, favoreciendo la renovación celular y la absorción de los agentes despigmentantes.
- **Aloe vera:** Contiene agentes antisépticos como el lupeol, ácido salicílico, urea, ácido cinámico, fenol y azufre. También contiene vitaminas, minerales y azúcares, por lo que es altamente nutritivo a la vez que ejerce un alto poder limpiador, antiséptico y calmante.
- **Arbutina:** Agente despigmentante que inhibe la formación de melanina.
- **Ascorbil fosfato sódico:** Agente despigmentante que inhibe la formación de melanina.
- **Ascorbil glucósido:** Agente despigmentante que inhibe la formación de melanina.

- **Ascorbil palmitato:** Agente despigmentante que inhibe la formación de melanina.
- **Base PFC o/w:** Crema base para la elaboración de emulsiones aceite/agua, compuesta por una mezcla de miristrato de miristilo, alcohol cetílico, laureato de monoglicerilo, octanoato de cetearilo, miristrato de isopropilo y otros componentes de naturaleza lipófila.
- **Benzofenona-3:** Filtro UV encargado de proteger de la radiación solar .
- **Butil metoxidibenzoilmetano:** Filtro UV encargado de proteger de la radiación solar.
- **Carbopol 940:** Agente gelificante.
- **Dimeticona 350:** Se trata de una mezcla de polímeros entre los que se encuentra la dimetilsilicona y dimetilsiloxano. Su función es la de ayudar a la elaboración de emulsiones y proporcionar una mayor untuosidad y suavidad en la aplicación del producto, además de actuar como vehículo de principios activos.
- **AEDT:** Captura los metales evitando la formación de otros complejos coloreados.
- **Etilhexil metoxicinamato:** Filtro UV encargado de proteger de la radiación solar.
- **Etilhexil salicilato:** Filtro UV encargado de proteger de la radiación solar.
- **Fenil dibencimidazol tetrasulfonato disódico:** Filtro UV encargado de proteger de la radiación solar.
- **Glicerina:** Actúa como protectora de la piel y aporta suavidad.
- **Hidroquinona:** Agente despigmentante que inhibe la formación de melanina.
- **Hidrovitón:** Se trata de un preparado a base de aminoácidos, lactato sódico, urea, alantoína, alcoholes, cloruro sódico y humectantes, cuya función es la de hidratar la piel.
- **Kathon:** Es un preparado que contiene 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona y 2-metil-4-isotiazolin-3-ona con propiedades conservantes.
- **Kójico dipalmitato:** Agente despigmentante que inhibe la formación de melanina.
- **PEG-25 PABA:** Filtro UV encargado de proteger de la radiación solar .
- **Phenonip:** Mezcla de parabenos y fenoxietanol cuya función es la de conservador.
- **Polisorbato-80:** Es un emulgente no iónico sintético.
- **Propilenglicol:** Su función es la de emulgente, impidiendo la desecación de la capa córnea de la piel.
- **Resorcinol:** Agente despigmentante que inhibe la formación de melanina.
- **Trietanolamina:** Actúa como agente basificante del medio.

En los sucesivos apartados del presente apéndice se muestran la composición de los distintos productos cosméticos utilizados, así como su protocolo de preparación.

III.1. Elaboración de una loción solar conteniendo fenildibencimidazol tetrasulfonato disódico

Fase A:	
Kathon.....	0,1 %
Dimeticona 350.....	0,75 %
AEDT sal disódica.....	0,1 %
Glicerina.....	0,75 %
Agua c.s.p.....	100 %
Fase B:	
Fenildibenzimidazol tetrasulfonato disódico.....	5%
Agua.....	25 %
Disolución de NaOH 10 %.....	c.s.p.
Fase C:	
Acelerador del bronceado.....	0,25 %
Fase D:	
Polisorbato-80.....	0,5 %

Para la preparación de la loción solar se mezclan las fases A, C, y D. La mezcla se adiciona a la fase B. Se homogeneiza y se ajusta el pH entre 7,0 y 7,5.

A la loción así preparada se le adiciona la masa de patrón puro de rojo de fenol (RF) (como marcador para estimar la integridad de la piel) necesaria para obtener una loción final con un 0,05% de RF.

III.2. Elaboración de una crema conteniendo PEG-25 PABA

Fase A:	
Base PFC o/w.....	18 %
Aceite de aguacate.....	5 %
Dimeticona 350.....	5 %
PEG-25 PABA.....	8 %
Fase B:	
Propilenglicol.....	5 %
Hidrovitón.....	4 %
Agua c.s.p.....	100 %
Fase C:	
Phenonip.....	0,5 %

Para la elaboración de la crema se pesan los componentes de las fases A y B en dos vasos de precipitados, se tapan con vidrio de reloj y se ponen en un baño de agua hasta que funda la fase A y se disuelvan los principios activos (aprox. 70 °C). Luego se vierte la fase B sobre la A muy lentamente

y con agitación continua. Por último, se saca del baño y sin dejar de agitar se deja enfriar hasta temperatura ambiente, adicionando la fase C a unos 30–35 °C. Se sigue agitando hasta homogeneización.

III.3. Elaboración de un gel conteniendo PEG-25 PABA

Fase A:	
Propilenglicol.....	5%
PEG-25 PABA.....	8%
Agua c.s.p.....	100%
Fase B:	
Carbopol 940.....	1%
Fase C:	
Trietanolamina.....	c.s.p

Para la elaboración del gel se pesan los componentes de la fase A y sobre ellos se espolvorea la fase B y se deja hidratar durante 24 horas. Posteriormente se homogeneiza y se añade la fase C hasta alcanzar un pH comprendido entre 6 y 7 (entonces se formará el gel). Por último homogeneizar de nuevo y dejar reposar otras 24 horas para que desaparezcan los posibles grumos.

III.4. Elaboración de una crema conteniendo resorcinol, hidroquinona, ácido kójico, ácido azelaico y arbutina

Fase A:	
Base PFC o/w.....	18 %
Aceite de aguacate.....	5 %
Dimeticona 350.....	5 %
Resorcinol.....	0,60 %
Hidroquinona.....	1,01 %
Ácido kójico.....	1,07 %
Ácido azelaico.....	2,17 %
Arbutina.....	2,31 %
Fase B:	
Propilenglicol.....	5 %
Hidrovitón.....	4 %
Agua c.s.p.....	100 %
Fase C:	
Phenonip.....	0,5 %

Para la elaboración de la crema se pesa los componentes de las fases A y B en dos vasos de precipitados, se tapa con vidrio de reloj y se pone en baño de agua hasta que funde la fase A y se disuelvan los principios activos (aprox. 70 °C). Luego se vierte la fase B sobre la A muy lentamente y con agitación continua. Se saca del baño y, sin dejar de agitar, se deja enfriar hasta temperatura ambiente, adicionando la fase C a unos 30–35 °C. Se sigue agitando hasta homogeneización.

III.5. Elaboración de una crema conteniendo ascorbil fosfato sódico, ascorbil glucósido, ácido ascórbico y ascorbil palmitato

Fase A:

Base PFC o/w.....	18 %
Aceite de aguacate.....	5 %
Dimeticona 350.....	5 %
Ácido fenilbencimidazol sulfónico.....	1 %
Butil metoxidibenzoilmetano.....	1 %
Etilhexil metoxicinamato.....	2 %
Ácido kójico.....	1,5 %
Arbutina.....	1 %
Ascorbil palmitato.....	1,27 %

Fase B:

Propilenglicol.....	5 %
Hidrovitón.....	4 %
Ácido glicólico.....	3 %
Aloe vera.....	0,5 %
Ácido ascórbico.....	0,87 %
Ascorbil glucósido.....	0,85 %
Ascorbil fosfato sódico.....	0,95 %
Agua c.s.p.....	100 %

Fase C:

Phenonip.....	0,5 %
---------------	-------

Para la elaboración de la crema se pesan los componentes de las fases A y B en dos vasos de precipitados y se tapan con vidrio de reloj. Se pone la fase A en baño de agua hasta que funde y se disuelvan los principios activos (aprox. 70 °C durante 5 min). Se pone la fase B en baño de agua hasta que se disuelvan los principios activos (menos de 1 min). Se vierte la fase B sobre la A muy lentamente y con agitación continua. Sin dejar de agitar se deja enfriar hasta temperatura ambiente, adicionando la fase C a unos 30–35°C. Se sigue agitando hasta homogeneización completa.

III.6. Elaboración de seis cremas conteniendo kójico dipalmitato**Muestra sintética 1**

Fase A:

Base PFC o/w.....	18 %
Aceite de aguacate.....	5 %
Dimeticona 350.....	5 %
Benzofenona-3.....	5 %
Butil metoxidibenzoilmetano.....	2,5 %
Etilhexil metoxicinamato.....	5 %
Kójico dipalmitato.....	1,5 %

Fase B:

Propilenglicol.....	5 %
Hidrovitón.....	4 %
Agua c.s.p.....	100 %

Fase C:

Phenonip.....	0,5 %
---------------	-------

Muestra sintética 2

Fase A:

Base PFC o/w.....	18 %
Aceite de aguacate.....	5 %
Dimeticona 350.....	5 %
Benzofenona-3.....	5 %
Butil metoxidibenzoilmetano.....	2,5 %
Etilhexil metoxicinamato.....	5 %
Kójico dipalmitato.....	0,5 %

Fase B:

Propilenglicol.....	5 %
Hidrovitón.....	4 %
Agua c.s.p.....	100 %

Fase C:

Phenonip.....	0,5 %
---------------	-------

Muestra sintética 3

Fase A:

Base PFC o/w.....	18 %
Aceite de germen de trigo.....	5 %
Dimeticona 350.....	5 %
Arbutina.....	2 %
Ácido azelaico.....	2 %
Ácido kójico.....	1 %
Hidroquinona.....	1 %
Resorcinol.....	0,5 %
Kójico dipalmitato.....	2 %

Fase B:

Propilenglicol.....	5 %
Hidrovitón.....	4 %
Ácido láctico.....	1 %
Agua c.s.p.....	100 %

Fase C:

Phenonip.....	0,5 %
---------------	-------

Muestra sintética 4

Fase A:

Base PFC o/w.....	18 %
Aceite de germen de trigo.....	5 %
Dimeticona 350.....	5 %
Arbutina.....	2 %
Ácido azelaico.....	2 %
Ácido kójico.....	1 %
Hidroquinona.....	1 %
Resorcinol.....	0,5 %
Kójico dipalmitato.....	2,5 %

Fase B:

Propilenglicol.....	5 %
Hidrovitón.....	4 %
Ácido láctico.....	1 %
Agua c.s.p.....	100 %

Fase C:

Phenonip.....	0,5 %
---------------	-------

Muestra sintética 5

Fase A:	
Base PFC o/w.....	18 %
Aceite de coco.....	5 %
Dimeticona 350.....	5 %
Etilhexil metoxicinamato.....	5 %
Etilhexil salicilato.....	2,5 %
Kójico dipalmitato.....	1 %
Fase B:	
Propilenglicol.....	5 %
Hidrovitón.....	4 %
Ácido glicólico.....	5 %
Ácido fítico.....	1 %
Aloe vera.....	0,5 %
Agua c.s.p.....	100 %
Fase C:	
Phenonip.....	0,5 %

Muestra sintética 6

Fase A:	
Base PFC o/w.....	18 %
Aceite de coco.....	5 %
Dimeticona 350.....	5 %
Etilhexil metoxicinamato.....	5 %
Etilhexil salicilato.....	2,5 %
Kójico dipalmitato.....	3 %
Fase B:	
Propilenglicol.....	5 %
Hidrovitón.....	4 %
Ácido glicólico.....	5 %
Ácido fítico.....	1 %
Aloe vera.....	0,5 %
Agua c.s.p.....	100 %
Fase C:	
Phenonip.....	0,5 %

Para la elaboración de las cremas se pesan los componentes de las fases A y B en dos vasos de precipitados, se tapan con vidrio de reloj y se ponen en baño de agua hasta que funde la fase A y se disuelvan los principios activos (aprox. 80 °C). Se vierte la fase B sobre la A muy lentamente y con agitación continua. Sin dejar de agitar se deja enfriar hasta temperatura ambiente, adicionando la fase C a unos 30–35 °C. Se sigue agitando hasta homogeneización completa.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- Abdel-Nabi IM, Kadry AM, Davis RA, Abdel-Rahman MS (1992) *Journal of Applied Toxicology* 12:255-259
- Abramovits W, Barzin S, Arrazola P (2005) *Skinmed* 4:371-376
- Adebajo SB (2002) *West African Journal of Medicine* 21:51-55
- Aghazarian V, Tchiakpe L, Reynier JP, Gayte-Sorbier A (1999) *Drug Development and Industrial Pharmacy* 25:1277-1282
- Andersen FA (2005) *International Journal of Toxicology* 24:51-111
- Aparecida-Nicoletti M, Almeida-Orsine EM, Nogueira-Duarte AC, Arbex-Buono G (2002) *Cosmetics and Toiletries (Edição em Português)* 14:46-51
- Arancibia A, Borie G, Cornwell E, Medrano C (1981) *Fármaco, Edizione Practica* 36:357-365
- Ashby J, Tinwell H, Plautz J, Twomey K, Lefevre PA (2001) *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 34:287-291
- Austria R, Semenzato A, Bettero A (1997) *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 15:795-801
- Balaguer A, Chisvert A, Salvador A (2006) *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 40:922-927
- Balaguer A, Chisvert A, Salvador A (2008) *Journal of Separation Science* 31:229-236
- Balaguer A, Chisvert A, Salvador A, Herraes M, Diez O (2008) *Analytica Chimica Acta* 611: 220-225
- Balaguer A, Salvador A, Chisvert A (2008) *Talanta* 75: 407-411
- Balaguer A, Salvador A, Chisvert A, Herraes M, Diez O. Resultados no publicados, en fase de redacción
- Balaguer A, Salvador A, Chisvert A, Melia M, Herraes M, Diez O (2006) *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 385:1225-1232
- Baumann L (2002) "Cosmetic dermatology Principles and practice". McGraw-Hill, Nueva York.
- Beissenhirtz M, Scheller F, Lisdat F (2003) *Electroanalysis (NY)* 15:1425-1435
- Benech-Kieffer F, Meuling WJA, Leclerc C, Roza L, Leclaire J, Nohynek G (2003) *Skin pharmacology and applied skin physiology* 16:343-355

Bibliografía

- Berne B, Ros AM (1998) Contact Dermatitis 38:61-64
- Bennett ML, Herderson RL (2003) Current Problem Dermatology 15:43-48
- Borremans M, De Beer J, Goeyens L (1999) Chromatographia 50:346-352
- Brand RM, McMahon L, Jendrzewski JL, Charron AR (2007) Food and chemical toxicology 45:93-97
- Brandolini V, Menziani E, Zanotti F, Bader S, Guarneri M (1998) International Journal of Cosmetic Science 20:69-72
- Breathnach AS (1996) Cutis 57:36-45
- Briganti S, Camera E, Picardo M (2003) Pigment Cell Research 16:101-110
- Cabanes J, Chazarra S, Garcíacarmona F (1994) Journal of Pharmacy and Pharmacology 46:982-985
- Cambon M, Issachar N, Castelli D, Robert C (2001) Journal of Cosmetic Science 52:1-11
- Cayce KA, McMichael AJ, Feldman SR (2004) Dermatology Nursing 16:401-406
- Chang ML, Chang CM (2003) Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 33:617-626
- Chang ML, Chang CM (2005) Journal of Food and Drug Analysis 13:205-211
- Chatelaine E, Gabard B, Surber C (2003) Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology 16:28-35
- Chisvert A, Balaguer A, Salvador A (2007) *Tanning and Whitening Agents in Cosmetics. Regulatory Aspects and Analytical Methods*, en "Analysis of Cosmetic Products" Elsevier, Amsterdam (Editores Salvador A y Chisvert A) 128-140
- Chisvert A, Pascual-Martí MC, Salvador A (2001a) Fresenius' Journal of Analytical Chemistry 369:638-641
- Chisvert A, Pascual-Martí MC, Salvador A (2001b) Journal of Chromatography A 921:207-215
- Chisvert A, Salvador A (2002) Journal of Chromatography A 977:277-280
- Chisvert A, Sisternes J, Balaguer A, Salvador A. Resultados no publicados, en fase de redacción

Bibliografía

- Chiu A, Kimball AB (2003) *The British journal of dermatology* 149:681-691
- Commissariat a l'Energie Atomique (1978) "Statistique Appliquee a l'Exploitation Des Mesures". Masson, Paris.
- Copoví A, Díez-Sales O, Herráez-Domínguez JV, Herráez-Domínguez M (2006) *International Journal of Pharmaceutics* 314:31-36
- Corominas BGT, Icardo AC, Zamora LL, Mateo JVG, Calatayud JM (2004) *Talanta* 64:618-625
- Couteau C, Perez Culler N, Connan AE, Coiffard LJM (2001) *International Journal of Pharmaceutics* 222:153-157
- Cruz-Vieira I, Fatibello-Filho O (2000) *Talanta* 52:681-689
- Damiani E, Carloni P, Biondi C, Greci L (2000) *Free radical biology and medicine* 28:193-201
- Darvay A, White IR, Rycroft RJ, Jones AB, Hawk JL, McFadden JP (2001) *British Journal of Dermatology* 145:597-601
- Deisinger PJ, Hill TS, English JC (1996) *Journal of Toxicology and Environmental Health* 47:31-46
- Del Giudice P, Raynoud E, Mahe A (2003) *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique* 96:389-393
- Desiderio C, Ossicini L, Fanali S (2000) *Journal of Chromatography A* 887:489-496
- DiNunzio JE, Gadde RR (1990) *Journal chromatography* 519:117-124
- Directiva 2000/6/CE de la Comisión de 29 Febrero de 2000 por la que se adaptan al progreso técnico los anexos II, III, VI y VII de la Directiva 76/768/CEE del Consejo relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en materia de productos cosméticos.
- Directiva 76/768/CEE del Consejo de 27 Julio de 1976 relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en materia de productos cosméticos.
- Directiva 82/434/EEC, modificada por la Directiva 90/207/EEC, de 14 de mayo de 1982, sobre la aproximación de las legislaciones de los Estados Miembros

Bibliografía

relativas a los métodos de análisis necesarios para el control de la composición de los productos cosméticos.

- Directiva 95/32/EEC del 7 de Julio de 1995 relativa a los métodos de análisis necesarios para el control de la composición de los productos cosméticos.
- Do Ceu Silva M, Gaspar J, Duarte Silva I, Leao D (2003) *Mutagenesis* 18:491-496
- Draelos ZD (2004) *Cutis* 74:257-260
- Eastmond DA, Mondrala ST, Hasegawa L (2005) *Chemico-Biological Interactions* 153:207-216
- Ehrlich M, Rao J, Pabby A, Goldman MP (2006) *Dermatologic Surgery* 32:618-625
- Espinal-Perez LE, Moncada B, Castanedo-Cazares JP (2004) *International Journal of Dermatology* 43:604-607
- Farahmand S, Tajerzadeh H, Farboud ES (2006) *Pharmaceutical Development and Technology* 11:255-261
- Farris PK (2005) *Dermatologic Surgery* 31:814-818
- Fatibello-Filho O, Cruz-Vieira I (2000) *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 368:338-343
- Felix T, Hall BJ, Brodbelt JS (1998) *Analytica Chimica Acta* 371:195-203
- Ferioli V, Rustichelli C, Vezzalini F, Gamberini G (1994) *Fármaco* 49:421-425
- Fernandez C, Marti-Mestres G, Mestres JP, Maillols H (2000a) *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 22:393-402
- Fernandez C, Marti-Mestres G, Ramos J, Maillols H (2000b) *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 24:155-165
- Fernandez C, Nielloud F, Fortune R, Vian L, Marti-Mestres G (2002) *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 28:57-63
- Findlay GH, Debeer HA (1980) *South African Medical Journal* 57:187-190
- Firth J, Rix I (1986) *Analyst* 111:129-132
- Fujimoto N, Watanabe H, Nakatani T, Roy G, Ito A (1998) *Food and chemical Toxicology* 36:697-703

Bibliografía

- Fujinami Y, Tai A, Yamamoto I (2001) *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 49:642-644
- Gagliardi L, Amato A, Cavazzutti G, Climenti F, Bolasco A, Tonelli D (1987) *Journal of Chromatography* 404:267-272
- Gagliardi L, Cavazzutti G, Montanarella L, Tonelli D (1989) *Journal Chromatography* 464:428
- Gallarate M, Carlotti ME, Trotta M, Bovo S (1999) *International Journal of Pharmaceutics* 188:233-241
- Gallarate M, Carlotti ME, Trotta M, Grande AE, Talarico C (2004) *Journal of Cosmetic Science* 55:139-148
- Garcia PL, Santoro M, Hedor-Hackman ERM, Singh AK (2005) *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 39:764-768
- Gaskell M, McLuckie KI, Farmer PB (2004) *Mutation Research* 554:387-398
- Gaskell M, McLuckie KI, Farmer PB (2005) *Carcinogenesis* 26:673-680
- Gasparro FP, Mitchnick M, Nash JF (1998) *Photochemistry and Photobiology* 68:243-256
- Gatti R, Andrisano V, Di Pietra AM, Cavrini V (1995) *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 13:589-595
- Ghadishah D, Gorchynski J (2002) *Journal Emergent Medicine* 22:353-360
- Giokas DL, Salvador A, Chisvert A (2007) *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 26:360-374
- Graupe K, Cunliffe WJ, Gollnick HP, Zaumseil RP (1996) *Cutis* 57:20-35
- Griffiths HR, Mistry P, Herbert KE, Lunec J (1998) *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 35:189-237
- Grimes PE (1995) *Archives of Dermatology* 131:1453-1457
- Gu XC, Kasichayanula S, Feiduk DJ, Burczynski FJ (2004) *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 56:621-628
- Gu XC, Wang T, Collins DM, Kasichayanula S, Burczynski FJ (2005) *British Journal of Dermatology* 152:1263-1267
- Guerra L, Bardazzi F, Tosti A (1992) *Contact Dermatitis* 26:108-111
- Gupta VK, Zatz JL, Rerek M (1999) *Pharmaceutical research* 16:1602-1607

Bibliografía

- Gustavsson Gonzalez H, Farbrot A, Larko O (2002) *Clinical and Experimental Dermatology* 27:691-694
- Gustavsson Gonzalez H, Farbrot A, Larko O, Wennberg AM (2006) *British Journal of Dermatology* 154:337-340
- Hagedorn-Leweke U, Lippold BC (1995) *Pharmaceutical Research* 12:1354-1360
- Hakoziaki T, Takiwaki H, Miyamoto K, Sato Y, Arase S (2006) *Skin research and technology* 12:105-113
- Hanson KM, Gratton E, Bardeen CJ (2006) *Free radical biology and medicine* 41:1205-1212
- Hany J, Nagel R (1995) *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 91:341-345
- Harvey V, Benghuzzi H, Tucci M, Puckett A, Cason Z (2002) *Biomedical Sciences Instrumentation* 38:185-190
- Hayden CG, Cross SE, Anderson C, Saunders NA, Roberts MS (2005) *Skin pharmacology and physiology* 18:170-174
- Hayden CG, Roberts MS, Benson HA (1997) *Lancet* 350:863-864
- Heneweer M, Muusse M, Van den Berg M, Sanderson JT (2005) *Toxicology and applied pharmacology* 208:170-177
- Hermann H (2000) *Labor Praxis* 24:24-27
- Hernández-Pérez E (1990) *American Journal of Cosmetic Surgery* 7:67-70
- Herpol-Borremans M, Masse MO (1986) *International Journal of Cosmetic Science* 8:203-208
- Herrling TH, Jung K, Fuchs J (2006) *Spectrochimica acta part A* 63:840-845
- Hg B, Xie H, Hu H, Li A (2004) *Wuhan Ligong Daxue Xuebao* 26:39-41
- Holder RM, Richards GM (2004) *Skin Therapy Setter* 9:1-3
- Holick MF (2001) *Comprehensive Series in Photosciences* 3: 11-37
- Huang SC, Lin CC, Huang MC, Wen KC (2004) *Journal of Food and Drug Analysis* 12:13-18
- Humbert PG, Haftek M, Creidi P, Lapiere C, Nusgens B, Richard A, Schmitt D, Rougier A, Zahouani H (2003) *Experimental Dermatology* 12:237-244

Bibliografía

- Ikeda K, Suzuki S, Watanabe Y (1990) *Journal of chromatography* 513:321-326
- Irache JM, Ezpeleta I, Vega FA (1993) *Chromatographia* 35:232-236
- Jacobi U, Weigmann HJ, Baumann M, Reiche AI, Sterry W, Lademann J (2004) *Skin pharmacology and physiology* 17:17-22
- Janjua NR, Mogensen B, Andersson AM, Petersen JH, Henriksen M, Skakkebaek NE, Wulf HC (2004) *Journal of Investigative Dermatology* 123:57-61
- Jiang R, Hauden CGJ, Prankerd RJ, Roberts MS, Benson HAE (1996) *Journal of Chromatography B* 682:137-145
- Jiang R, Roberts MS, Collins DM, Benson HA (1999) *British journal of clinical pharmacology* 48:635-637
- Jimenez MM, Pelletier J, Bobin MF, Martini MC (2004) *International Journal of Pharmaceutics* 272:45-55
- Jordaan HF, Mulligan RP (1990) *Journal of Cutaneous Pathology* 17:236-240
- Jordaan HF, Vanniekerk DJT (1991) *American Journal of Dermatopathology* 13:418-424
- Joseph P, Klein-Szanto AJ, Jaiswal AK (1998) *British Journal of Cancer* 78:312-320
- Kadry AM, Okereke CS, AbdelRahman MS, Friedman MA, Davis RA (1995) *Journal of Applied Toxicology* 15:97-102
- Kameyama K, Sakai C, Kondoh S, Yonemoto K, Nishiyama S, Tagawa M, Murata T, Ohnuma T, Quigley J, Dorsky A, Bucks D, Sagamihara KB (1996) *Journal of the American Academy of Dermatology* 34:29-33
- Kari FW, Bucher J, Eustis SL, Haseman JK, Huff JE (1992) *Food and Chemical Toxicology* 30:737-747
- Kasichayanula S, House JD, Wang T, Gu X (2005) *Journal of Chromatography B* 822:271-277
- Kauh YC, Zachian TF (1999) *Rheumaderm* 455:491-499
- Kawada A, Kameyama H, Asai M, Shiraishi H, Aragane Y, Tezuka T, Iwakiri K (2002) *Journal of Dermatological Science* 29:10-18

Bibliografía

- Kawada A, Konishi N, Kawara S, Endo H (2008) *Journal of the American Academy of Dermatology* 58:AB71-AB71
- Kikuchi H, Honda K, Mimura K, Kowata Y, Matsumoto H, Satoh T (1990) *Nippon Koshohin Kagak Kaishi* 14:17-20
- Kim H, Choi J, Cho JK, Kim SY, Lee YS (2004) *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 14:2843-2846
- Kim YJ, Uyama H (2005) *Cellular and Molecular Life Sciences* 62:1707-1723
- Klammer H, Schlecht C, Wuttke W, Jarry H (2005) *Toxicology* 215:90-96
- Kooyers TJ, Westerhof W (2004) *Nederlands Tijdschrift loor Geneeskunde* 148:768-771
- Kroyer GT (1999) *Fett Lipid* 101:343-346
- Krutmann J (2000) *Journal of Dermatological Science* 23:522-526
- Kubo I, Kinst-Hori I, Yokokawa Y (1994) *Journal of Natural Products* 57:545.
- Kumano Y, Sakamoto T, Egawa M, Iwai I, Tanaka M, Yamamoto I (1998) *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 44:345-359
- Kunz PY, Fent K (2006a) *Toxicology and applied Pharmacology* 217:86-99
- Kunz PY, Fent K (2006b) *Aquatic Toxicology* 79:305-324
- Kunz PY, Galicia HF, Fent K (2004) *Marine Environmental Research* 58:431-435
- Lanigan RS (1999) *International Journal of Toxicology* 18:1-26
- Laugel C, Do Nascimento C, Ferrier D, Marty JP, Baillet A (2001) *Applied Spectroscopy* 55:1173-1180
- León Z, Balaguer A, Salvador A, Chisvert A, Herraes M, Diez O (2008) *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391:859-866
- Li XY, Zhuang ZX, Liu JJ, Huang HY, Wei QH, Yang XH (2006) *Toxicology Mechanisms and Methods* 16:1-6
- Lim HW, Cooper K (1999) *Journal of the American Academy of Dermatology* 41:81-99
- Lin CH, Sheu JY, Wu HL, Huang YL (2005a) *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Análisis* 38:414-419
- Lin CH, Wu HL, Huang YL (2005b) *Journal of Chromatography B* 829:149-152

Bibliografía

- Lin CH, Wu HL, Huang YL (2007) *Analytical Chimica Acta* 581:102-107
- Liu S (2004) *Sepu* 22:660-665
- López-García P, Rocha Miritello Santoro MI, Kedor-Hackman ERM, Singh AK (2005) *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 39:764-768
- Lucas RM, Ponsonby AL (2006) *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 92:140-149
- Maeda K, Fukuda M (1991) *Journal of the Society of Cosmetic Chemists* 42:361-368
- Maerker K, Durrer S, Henseler M, Schlumpf M, Lichtensteiger W (2007) *Toxicology and Applied Pharmacology* 218:152-165
- Maerker K, Lichtensteiger W, Durrer S, Conscience M, Schlumpf M (2005) *Environmental toxicology and pharmacology* 19 761-765
- Mahe A, Keita S, Bobin P (1994) *Annales de Dermatologie et de Venereologie* 121:142-146
- Mahe A, Ly F, Aymard G, Dangou JM (2003) *British Journal of Dermatology* 148:493-500
- Maia AM, Baby AR, Yasaka WJ, Suenaga E, Kaneko TM, Velasco MVR (2007) *Talanta* 71:639-643
- Majmudar G, Jacob G, Laboy Y, Fisher L (1998) *Journal of Cosmetic Science* 49:361-367
- Mansour AM, Ibrahiem MM (2002) *Chromatographia* 55:435-437
- Marginean-Lazar G, Baillet A, Fructus AE, Arnaud-Battandier J, Ferrier D, Marty JP (1996) *Drug & Cosmetic Industry* 158:50-62
- Marginean-Lazar G, Fructus AE, Baillet A, Bocquet JL, Thomas P, Marty JP (1997) *International Journal of Cosmetic Science* 19:87-101
- Marionnet C, Vioux-Chagnoleau C, Bernerd F (2005) *European Academy of Dermatology Venereology (JEADV)* 19:1-412 (pp 49)
- Masatsuji-Kato E, Tsuzuki T, Kobayashi S (2005) *Journal of Health Science* 51:122-129
- Masse MO, Duvallet V, Borremans M, Goeyens L (2001) *International Journal of Cosmetic Science* 23:219-224

Bibliografía

- Miller D, Bertin C, Fournier M, Wallo W (2008) *Journal of the American Academy of Dermatology* 58:AB23-AB23
- Miller JN, Miller JC (2002) “Estadística y Quimiometría para Química Analítica”, 4ª Edición. Pearson Educación S.A., Madrid
- Miyamoto K, Takiwaki H, Hillebrand GG, Arase S (2002) *Skin research and technology* 8:73-77
- Monheit GD (2004) *Skin Therapy Letters* 9:6-10
- Montenegro L, Paulino D, Puglisi G (2004) *Journal of Cosmetic Science* 55:509-518
- Morohoshi K, Yamamoto H, Kamata R, Shiraishi F, Koda T, Morita M (2005) *Toxicology in vitro* 19:457-469
- Mueller SO, Kling M, Firzani PA, Mecky A, Duranti E, Shields-Botella J, Delansorne R, Broschard T, Kramer PJ (2003) *Toxicology Letters* 142:89-101
- Nakagawa M, Kawai K, Kawai K (1995) *Contact Dermatitis* 32:9-13
- Nash JF (2006) *Dermatologic clinics* 24:35-51
- Nishimura T, Kometani T, Okada S, Ueno N, Yamamoto T (1995a) *Yakugaku Zasshi Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* 115:626-632
- Nishimura T, Kometani T, Takii H, Terada Y, Okada S (1995b) *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology-Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* 42:602-606
- Nohynek GJ, Schaefer H (2001) *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 33:285-299
- Okereke CS, Abdel-Rhaman MS, Friedrnan MA (1994) *Toxicology Letters* 73:113-122
- Okereke CS, Kadry AM, Abdel-Rahman MS, Davis RA, Friedman MA (1993) *Metabolism and Disposition* 21:788-791
- Olvera-Martinez B, Cazares-Delgadillo J, Calderilla-Fajardo SB, Villalobos-Garcia R, Ganem-Quintanar A, Quintanar-Guerrero D (2005) *Journal of Pharmaceutical Sciences* 94:1552-1559
- Perez-Bernal A, Muñoz-Perez MA, Camacho F (2000) *American Journal of Clinical Dermatology* 1:261-268

Bibliografía

- Petit L, Piérard GE (2003a) *International Journal of Cosmetic Science* 25:169-181
- Petit L, Piérard GE (2003b) *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 17:546-549
- Piamphongsant T (1998) *International Journal of Dermatology* 37:897-903
- Pons L, Parra JL (1995) "Ciencia Cosmética", Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, Madrid
- Pont AR, Charron AR, Brand RM (2004) *Toxicology and applied pharmacology* 195:348-354
- Pottard G, Laugel C, Baillet A, Schaefer H, Marty JP (1999) *International Journal of Pharmaceutics* 189:249-260
- Pottard G, Laugel C, Schaefer H, Marty JP (2000) *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology* 13:336-344
- Ramis G, García MC (2001) "Quimiometría", Editorial Síntesis S.A., Madrid
- Raschke T, Koop U, Dusing HJ, Filbry A, Sauermann K, Jaspers S, Wenck H, Wittern KP (2004) *Skin Pharmacology and Physiology* 17:200-206
- Rastogi SC (2001) *Journal of Separation Science* 24:173-178
- Rendon MI (2004) *Journal of Drugs in Dermatology* 3:827-834
- Rendon MI, Gaviria JI (2005) *Dermatologic Surgery* 31:886-889
- Ro KW, Choi JB, Lee MH, Kim JW (1994) *Journal Chromatography A* 688:375382
- Rojas LB, Quideau S, Pardon P, Charrouf Z (2005) *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:9122-9127
- Rothe de Arocha J (2003) *Dermatología Venezolana* 41:11-14
- Rueda ME, Sarabia LA, Herrero A, Ortiz MC (2003) *Analytica chimica Acta* 479:173-184
- Sakodinskaya IK, Desiderio C, Nardi A, Fanali S (1992) *Journal of Chromatography* 596:95-100
- Sakuma K, Ogawa M, Sugibayashi K, Yamada K, Yamamoto K (1999) *Archives of Pharmaceutical Research* 22:335.

Bibliografía

- Sakuma K, Ohtani H, Kanoh M, Yamamoto K (1993) Japanese Journal of Toxicology and Environmental Health 39:226-229
- Salvador A, Chisvert A (2005a) Analytica Chimica Acta 537:1-14
- Salvador A, Chisvert A (2005b) Analytica Chimica Acta 537:15-24
- Sarveiya V, Risk S, Benson HAE (2004) Journal of Chromatography B 803:225-231
- Scalia S (2000) Journal Chromatography A 870:199-205
- Scalia S, Bianchi A, Villani S, Guarneri M (1997) Pharmazie 52:929-931
- Schauder S, Ippen H (1997) Contact Dermatitis 37:221-232
- Schauer UMD, Völkel W, Heusener A, Colnot T, Broschard TH, von Landenberg F, Dekant W (2006) Toxicology and Applied Pharmacology 216:339-346
- Schinicit T, Ring J, Abeck D (1998) Dermatology 196:354-357
- Schlumpf M, Jarry H, Wuttke W, Ma R, Lichtensteiger W (2004b) Toxicology 199:109-120
- Schlumpf M, Schmid P, Durrer S, Conscience M, Maerkel K, Henseler M, Gruetter M, Herzog I, Reolon S, Ceccatelli R, Faass O, Stutz E, Jarry H, Wuttke W, Lichtensteiger W (2004a) Toxicology 205:113-122
- Schulz EJ, Summers B, Summers RS (1988) South African Medical Journal 73:59-60
- Scientific Committee on Consumer Products, European Commission (2006) Opinion on "Basic criteria for the *in vitro* assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients"
- Seidlová-Wuttke D, Christoffel J, Rimoldi G, Jarry H, Wuttke W (2006a) Toxicology and applied Pharmacology 214:1-7
- Seidlová-Wuttke D, Jarry H, Christoffel J, Rimoldi G, Wuttke W (2006b) Toxicology and applied Pharmacology 210:246-254
- Semenzato A, Austria R, Dall'Aglio C, Bettero A (1995) Journal of Chromatography A 705:385-389
- Serpone N, Dondi D, Albini A (2007) Inorganica Chimica Acta 360:794-802
- Shih Y (2001) Journal of AOAC Internacional 84:1045-1049

Bibliografía

- Shih Y, Zen JM (1999a) *Electroanalysis* 11:229-233
- Shih Y, Zen JM (1999b) *Journal of the Chinese Chemical Society* 46:865-870
- Shih Y, Zen JM (2000) *Analytica Chimica Acta* 412:63-68
- Shih Y, Zen JM, Kumar AS, Huang YN (2005) *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 78:864-866
- Sinnclair C (2006) *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 92:173-178
- Soeborg T, Ganderup NC, Kristensen JH, Bjerregaard P, Pedersen KL, Bollen P, Hansen SH, Halling-Sorensen B (2006) *Journal of Chromatography B* 834:117-121
- Soler C (2004) *Acófar* 433:27-29
- Sosted H, Basketter DA, Estrada E, Johansen JD, Patlewicz GY (2004) *Contact Dermatitis* 51:241-254
- Sottofattori E, Anzaldi M (2000) *International Laboratory* 30:8-9
- Sottofattori E, Anzaldi M, Balbi A, Tonello G (1998) *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 18:213-217
- Spiclin P, Gasperlin M, Kmetec V (2001) *International Journal of Pharmaceutics* 222:271-279
- Spiclin P, Homar M, Zupancic-Valant A, Gasperlin M (2003) *International Journal of Pharmaceutics* 256:65-73
- Stratigos AJ, Katsambas AD (2004) *American Journal of Clinical Dermatology* 5:161-168
- Sylla R, Diouf A, Inane B, Ndiaye B, Guisse MB, Diop A, Ciss M, Ba D (1994) *Dakar Medical* 39:223-226
- Tagawa M, Murata T, Onuma T, Kameyama K, Sakai C, Kondo S, Yonemoto K, Quigley J, Blanock K (1993) *Journal of SCCJ* 27:409-414
- Takizawa T, Imai T, Onose J, Ueda M, Tamura T, Mitsumori K, Izumi K, Hirose M (2004) *Toxicological Sciences* 81:43-49
- Takizawa T, Mitsumori K, Tamura T, Nasu M, Ueda M, Imai T, Hirose M (2003) *Toxicological Sciences* 73:287-293
- Tanimoto S, Tominaga H, Okada Y, nombra M (2006) *Yakugaku Zasshi Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* 126:173-177

Bibliografía

- Teglia A (1989) *Cosmetic Toiletries* Ed. Ital. 10:6-10
- Terasaka H, Madona Y, Sakigami H, Fujisawa S (2005) *Anticancer Research* 25:2241-2247
- Ting PT, Barankin B (2005) *Canadian Family Physican* 51:353-355
- Tornero P, De Barrio M, Baeza ML, Herrero T (2004) *Contact Dermatitis* 51:57-61
- Treffel P, Gabard B (1996) *Pharmaceutical Research* 13:770-774
- Uter W, Lessman H, Geier J, Becker D, Fucks T, Richter G (2002) *Allergy* 57:319-326
- Varvaresou A, Tsirivas E, Iakovou K, Gikas E, Papatomas Z, Vonaparti A, Panderi I (2006) *Analytica Chimica Acta* 573:284-290
- Vicente TS, Waysek EH, Cort WM (1985) *Journal of American Oil Chemistry Society* 62:745-747
- Vidal L, Chisvert A, Canals A, Salvador A (2007) *Journal of Chromatography A* 1174:95-103
- Vidal MT, Chisvert A, Salvador A (2003) *Talanta* 59:591-599
- Völkel W, Colnot T, Schauer UMD, Broschard TH, Dekant W (2006) *Toxicology and Applied Pharmacology* 216:331-338
- Wallner P (1993) *Dtsch. Lebensm. Rundsch.* 89:375-381
- Walters KA, Roberts MS (2002) *Basic and Clinical Dermatology* 21:465-481
- Wang LH (1995) *Analyst* 120:2241-2244
- Wang LH, Huang WS, Tai HM (2007) *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 43:1430-1436
- Wang LH, Kuo YP (1999) *Chromatographia* 49:208-211
- Wang T, Kasichayanula S, Gu XC (2006) *International Journal of Pharmaceutics* 310:110-117
- Weiss RM, Delfabbro E, Kolisang P (1990) *South African Medical Journal* 77:373-373
- Wester RC, Melendres J, Hui XY, Cox R, Serranzana S, Zhai HB, Quan DY, Maibach HI (1998) *Journal of Toxicology and Environmental Health* 54:301-317

Bibliografía

- Wissing SA, Muller RH (2002) *Journal of Controlled Release* 81:225-233
- Xie HL, Tan YG, Hu BN, Hu HX (2005) *Huaxue Shiji* 27:153-159
- Yao XY, Zheng XQ, Win XY, Qi QP (1998) *Sepu* 16:223-229
- Yoshimura K, Momosawa A, Watanabe A, Sato K, Matsumoto D, Aiba E, Harii K, Yamamoto T, Aoyama T, Iga T (2002) *Dermatologic Surgery* 28:1153- 1158
- Zhang WY, Yang ZJ, Liu L, Li Y (2002) *Fenxi Kexue Xuebao* 18:493-495

**ARTÍCULOS QUE
COMPONEN ESTA TESIS
DOCTORAL**

Sequential-injection determination of traces of disodium phenyl dibenzimidazole tetrasulphonate in urine from users of sunscreens by on-line solid-phase extraction coupled with a fluorimetric detector

A. Balaguer, A. Chisvert, A. Salvador*

Departamento de Química Analítica, Universitat de València, 50 Doctor Moliner St., 46100 Burjassot, Valencia, Spain

Received 1 March 2005; received in revised form 25 July 2005; accepted 29 July 2005

Available online 19 October 2005

Abstract

A sensitive and selective method to determine disodium phenyl dibenzimidazole tetrasulphonate (PDT) in the urine of sunscreen users, which is suitable for studies on body accumulation/excretion is proposed. On-line solid-phase extraction allows the analyte to be retained and subsequently eluted, using a strong anion exchange (SAX) microcolumn. Standard addition calibration was carried out with only one standard. The wavelengths of excitation and emission were 330 and 454 nm, respectively. The method allows PDT to be determined in both, spiked and unspiked human urine samples, without any pre-treatment. Results obtained for spiked urine samples ($40\text{--}200\text{ ng ml}^{-1}$) showed the accuracy of the method. The mean relative standard deviations (R.S.D.) of the results was 7%. Five volunteers applied a sunscreen lotion containing 5% PDT and their urinary excretion was controlled from the moment of application until the excreted amounts were no longer detectable. The sensitivity of the proposed method is in the order of $1900\text{ ml } \mu\text{g}^{-1}$ and the detection limit ($3S_{y/x}/b$) is in the order of 5 ng of PDT, which means 10 ng ml^{-1} for a $500\text{ } \mu\text{l}$ injected volume, and this is suitable for the PDT levels found in the urine.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Disodium phenyl dibenzimidazole tetrasulphonate; Sunscreen; Urine; Sequential-injection; Solid-phase extraction; Fluorescence spectrometry

1. Introduction

Although small doses of solar radiation have a beneficial effect on humans, excessive exposure to UV radiation has side effects, some of which are harmful. Because of this, sunscreen cosmetics have become necessary daily products. As they are applied to the skin, it is important to find out to what extent they are absorbed and excreted, because unlike some dermopharmaceuticals, they are not designed to be absorbed through the skin but to prevent the solar radiation coming through the skin.

Different *in vivo* studies carried out either by volunteers [1–5] or animals [6] have shown how the body absorbs some organic UV filters from the skin and, consequently, the possible long-term effects must be studied, such as systemic toxicology. Therefore, from a health standpoint it is of interest to develop analytical methods capable of controlling the bioaccumulation and excretion mechanisms of these compounds.

There are still few articles devoted to the determination of traces of UV filters in the urine of human volunteers after topical application of sunscreens. Felix et al. [7] determined benzophenone-3 in urine using GC–MS; the method was sensitive and results revealed that concentrations in the order of 200 ng ml^{-1} of benzophenone-3 were excreted after sunscreen application. Our group proposed a fluorimetric method to determine phenyl benzimidazole sulphonic acid in urine [8] which revealed that the urinary levels of this UV filter increased with time at least 12 h after sunscreen application, maximum concentration levels being in the order of 140 ng ml^{-1} . Sarveiya et al. [9] found levels of benzophenone-3 and its metabolites in the order of 1% of the applied dose.

Disodium phenyl dibenzimidazole tetrasulphonate (PDT) is a compound that has recently been authorized for use as a UV filter in sunscreen cosmetics, at concentrations <10%. It has a band that covers both, the complete UV-B (290–320 nm) range and practically all the UV-A (320–400 nm) range.

To our knowledge there are no published reports focusing on the determination of PDT in any type of sample.

* Corresponding author. Tel.: +34 96 3543175; fax: +34 96 3544436.

E-mail address: amparo.salvador@uv.es (A. Salvador).

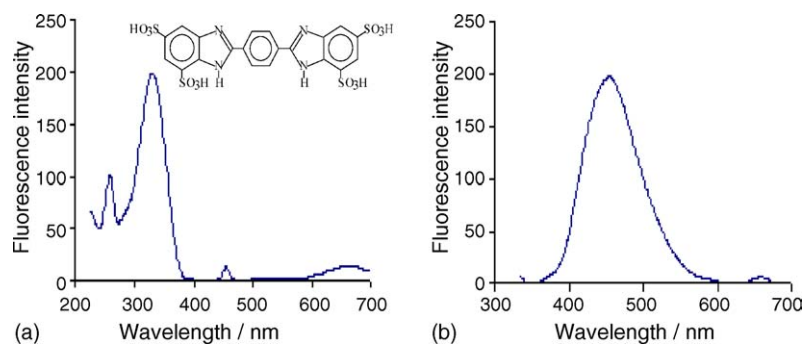


Fig. 1. (a) Excitation spectrum ($\lambda_{\text{exc}} = 330 \text{ nm}$) and (b) emission spectrum ($\lambda_{\text{em}} = 454 \text{ nm}$) of a $0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$ PDT solution in 0.1 M HCl .

No data have been found in the literature on the percutaneous absorption of PDT nor expected levels to be found in human urine after sunscreen products use. The aim of this work is to obtain analytical data on the urinary excretion of PDT through analysis of urine from human volunteers after using a sunscreen lotion containing PDT.

Different analytical methods have been successfully proposed for determination of some UV filters in sunscreen cosmetics (not including PDT); most of them were based on liquid chromatography (LC) [10–20]. A LC method for determination of 18 UV filters (including PDT) in sunscreen samples have been recently developed by our group [21], but the sensitivity is not enough to determine traces of PDT in urine from volunteers after using sunscreen cosmetics.

The chemical structure of PDT provides fluorescence properties (see Fig. 1) that can be used for analytical purposes with high sensitivity. An on-line solid-phase extraction using a strong anion exchange (SAX) microcolumn allows the retention and subsequent elution of PDT, thus enabling its separation from the urine matrix. A sequential-injection (SI) system has been used that provides a high level of automation.

2. Experimental

2.1. Apparatus

A FP-6200 Jasco fluorescence spectrophotometer equipped with a Xe lamp was used.

The SI system (Fig. 2) was constructed with the following components: a Crison 2030 eight-channel automatic valve (Alella, Barcelona, Spain) connected to a personal computer via an RS 232C interface and controlled by home-made software, a Crison 2031 autoburette equipped with a 5 ml syringe and a Hellma fluorescence flow-through cell (Hellma, Müllheim/Baden, Germany) with 1.5 mm optic length and 25 μl internal volume. PTFE tubing with 0.5 mm internal diameter was used to connect the system. A 25 cm mixing coil length was used, this being the lowest possible allowed by the manifold geometry.

A SAX microcolumn was home-made by introducing 150 mg of packing SAX LiChrolut[®] (trimethylaminopropyl chloride) (Merck, Darmstadt, Germany or Varian[®], Barcelona, Spain) into a 20 mm long \times 3 mm i.d. PTFE tube.

A Crison micropH 2001 pHmeter was used for the pH measurements.

2.2. Reagents and samples

Disodium phenyldibenzimidazole tetrasulphonic acid >99% (Haarmann & Reimer, Holzminden, Germany) was used. The following analytical grade reagents were also used: sodium hydroxide (Probus, Badalona, Spain), hydrochloric acid 37% (Scharlab, Barcelona, Spain), ammonium hydroxide 25% (Probus), sodium dihydrogen phosphate monohydrate (Merck). Ethanol absolute HPLC grade (Scharlab) was also used.

The urine samples were taken from five volunteers after to apply themselves 10 ml of a home-made lotion prepared according to a protocol provided by the R & D section of the cosmetic laboratory of the enterprise RNB-Cosméticos (Paterna, Valencia, Spain). This lotion contained a 5% PDT. Their urinary excretion was controlled from the moment of application until the excreted amounts of PDT were no longer detectable. Eleven PDT-free human urine samples were also taken from volunteers and spiked with 40–200 ng ml^{-1} of PDT before the analysis.

2.3. Proposed method

Urine samples were filtered through an empty microcolumn cartridge with two frits inside (paper cannot be used because it retains PDT).

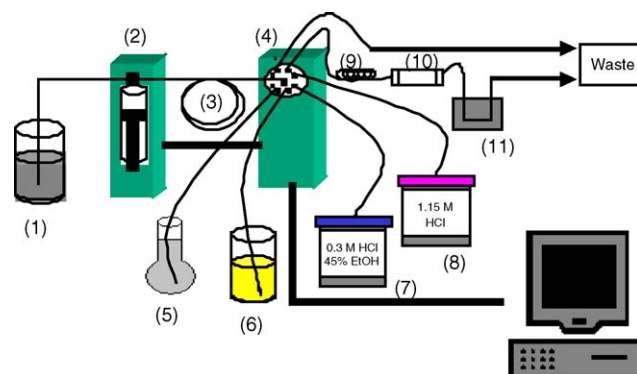


Fig. 2. SI system for fluorimetric determination of PDT in urine. (1) Carrier water; (2) autoburette with 5 ml syringe; (3) holding coil (2.5 m); (4) eight-channel automatic valve; (5) standard solution of PDT; (6) urine samples; (7) washing solution; (8) elution solution; (9) mixing coil (25 cm); (10) SAX microcolumn and (11) fluorescence flow cell.

The pH was measured and adjusted between 4 and 7 with 2 M NH_4OH (if necessary).

Fluorescence intensity was measured at $\lambda_{\text{em}} = 454 \text{ nm}$ ($\lambda_{\text{exc}} = 330 \text{ nm}$) using the SI system shown in Fig. 2. Both, the emission and excitation slits were 10 nm, the response time was 0.02 s, the sensitivity was medium and the acquisition data was 0.5 s.

A $0.2 \mu\text{g ml}^{-1}$ of PDT in buffer solution pH 6 (NaH_2PO_4 0.5 M/ NH_3) was used as *standard solution*. A 1.15 M HCl solution was used as *elution solution*. A 0.3 M HCl:ethanol (55:45) was used as *washing solution*.

First the column was conditioned with 0.250 ml ethanol. The following aspiration/propulsion cycle for the standard addition calibration was carried out: a 3.5 ml volume of carrier (H_2O nanopure), 0.150–0.500 ml of urine and $V \text{ ml}$ of the PDT *standard solution* ($V = 0, 0.100, 0.200, 0.300, 0.400, 0.500$) were aspirated. A 4.5 ml volume was propelled from the holding coil through the microcolumn (*retention step*). A 3.0 ml volume of carrier and 1.0 ml of the *washing solution* were aspirated. They were propelled through the microcolumn (*washing step*). A 3.0 ml volume of carrier and 1.0 ml of the *elution solution* were aspirated. They were propelled through the microcolumn to the detector (*elution step*). This cycle was repeated three times for each volume of the standard solution.

3. Results and discussion

3.1. Study of experimental variables: selection of the retention/elution conditions

Direct fluorimetric determination of PDT in urine is not possible due to the complexity of the matrix in which interfering compounds are present. Therefore, a solid-phase extraction is proposed, based on the use of a SAX microcolumn. PDT is in anionic form due to the deprotonation of its four sulphonic groups. Thus, it is selectively retained inside the microcolumn cartridge, whereas most of the interfering compounds pass through the cartridge without being retained. A washing step with a HCl:ethanol solution completely eluted the interfering compounds before analyte elution with a more concentrated HCl solution.

3.1.1. Preliminary PDT elution conditions

A preliminary experiment was carried out with the following cycle of aspiration/propulsion: a 3.5 ml volume of carrier (H_2O nanopure) and 0.5 ml of a $0.2 \mu\text{g ml}^{-1}$ PDT standard were aspirated. Then, they were propelled from the holding coil through the microcolumn. A 3.0 ml volume of carrier and 1.0 ml of the studied HCl solution were aspirated. Then, they were propelled through the microcolumn (elution step). A 3.0 ml volume of carrier and 1.0 ml 3 M HCl were aspirated. They were propelled through the microcolumn to the detector (after-elution washing step).

Fig. 3 shows the effect of the HCl concentration used in the elution step on the analytical signal obtained in both, elution and after-elution washing steps. A 1 M HCl concentration led to a quantitative elution of PDT.

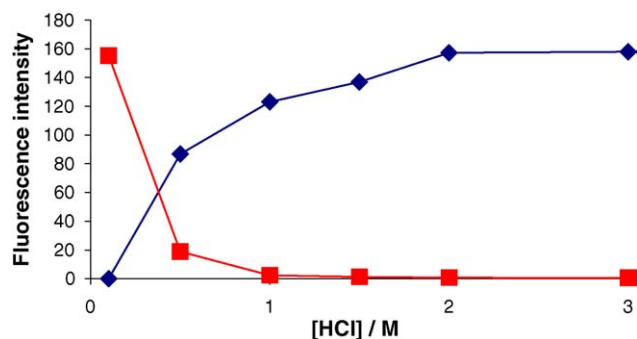


Fig. 3. (◆) Effect of the concentration of HCl in the elution step and (■) fluorescence intensity obtained after elution washing step with 3 M HCl.

3.1.2. Interference from urine matrix study

An aqueous PDT calibrate and a standard addition PDT calibrate were prepared. Aqueous calibration (a) was obtained by measuring five solutions containing between 0.1 and $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ of PDT in a 0.5 M NaH_2PO_4 solution that was buffered at different pH (between 4 and 7) by using 2 M NH_3 and 1 M HCl, thus imitating the urine conditions. The standard addition calibration (b) was carried out by using 9.5 ml of urine sample (PDT-free) to which 0.5 ml of water containing PDT was added in order to get concentrations of between 0 and $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$.

An experiment was carried out with the following cycle of aspiration/propulsion: a 3.5 ml volume of carrier (H_2O nanopure) and 0.5 ml of standard or spiked urine were aspirated. Then, they were propelled from the holding coil through the microcolumn (retention step). A 3.0 ml volume of carrier and 1.0 ml of 1 M HCl were aspirated. Then, they were propelled through the microcolumn to the detector (elution step). This cycle was repeated for the different solutions of each calibrate in order to obtain both calibration lines.

Fig. 4 shows the SI peaks obtained for three measurements of each solution using aqueous (a) and standard addition (b) calibration, with standard solutions at pH 7. Fig. 4b shows that two peaks for each solution of the standard addition calibration were obtained: the first peak is due to fluorescent components of the matrix which were not retained in the microcolumn and the second peak corresponds to the components eluted with 1 M HCl. These second peaks differ from the peaks obtained from the aqueous solutions shown in Fig. 4a. The following calibration equations make these differences clear:

$$y = -(0 \pm 1) + (628 \pm 4)x$$

$$(r^2 = 0.9998, N = 6; \text{ aqueous calibrate})$$

$$y = (41 \pm 2) + (475 \pm 7)x$$

$$(r^2 = 0.9992, N = 6; \text{ standard addition calibrate})$$

where y is the fluorescence intensity and x is the PDT concentration in $\mu\text{g ml}^{-1}$. Comparable results were obtained working with standard solutions at remaining pH levels studied.

The different slopes indicate the presence of matrix interferences which can be solved by using the standard addition calibration. As the urine sample used in the standard addition

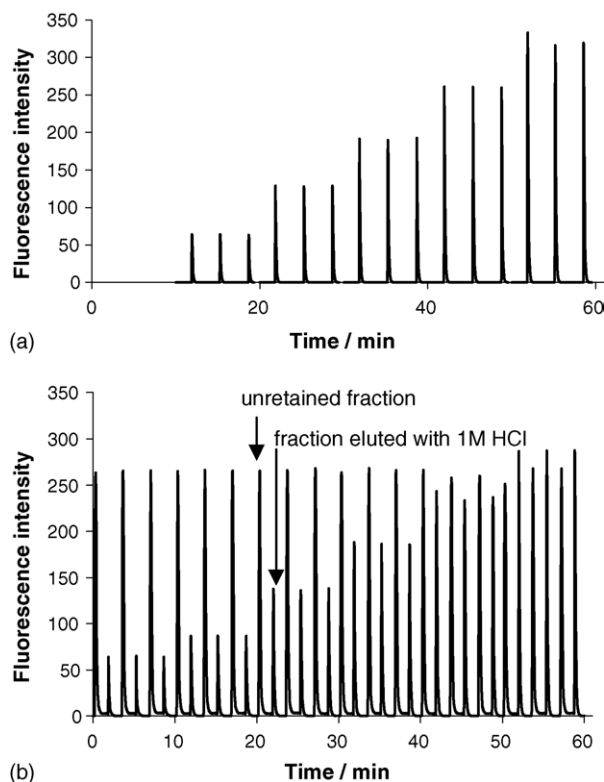


Fig. 4. SI peaks obtained using HCl 1 M as eluent. (a) Aqueous-buffered standard calibration of PDT and (b) standard addition calibration of PDT for a urine sample (PDT-free).

calibration was PDT-free, an intercept statistically different to zero indicates that some fluorescent components of the matrix were eluted together with PDT causing a constant error which must be resolved in order to separate the analyte and the interferents properly.

3.1.3. Washing and elution conditions

Assays were carried out before the elution of the analyte with 1 M HCl to try to elute the interfering compounds that were causing constant errors. Different washing conditions were assayed in a previous step to the final elution of the analyte. A 1 ml volume of different concentrations of HCl solution (0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5 M) was used in the corresponding experiments as before-elution washing solution. The signal obtained for a PDT-free urine sample in the elution step, significantly decreased in line with the concentration of HCl in the washing solution, while concentrations over 0.4 M are necessary to obtain a signal statistically similar than zero. These high concentrations of HCl in the washing step not only eluted interfering compounds but also a significant part of the analyte, with the subsequent sensitivity loss.

As ethanol cannot elute the analyte, but can elute other compounds, other conditions were studied based on using mixtures of HCl:ethanol in the washing elution and subsequent elution with 1 M HCl. Different mixtures, all them containing 0.3 M in HCl but different concentrations of ethanol (25, 50 and 75%) were assayed as washing elution solutions. For ethanol concentrations over 50%, a signal similar to zero was obtained

in the elution of a PDT-free urine, with insignificant loss of the analyte. Because of the interdependence between the HCl concentrations in the elution, and in the washing step and the percentage of ethanol, a SIMPLEX multivariate study was carried out. Results showed that the optimum experimental parameters were: *washing solution*, 0.3 M HCl and 45% ethanol solution; *elution solution*, 1.15 M HCl.

To test whether the interfering compounds had been eliminated totally, an on-line standard addition calibration based on using only one PDT standard was prepared from a PDT-free urine sample and measured with the following cycle of aspiration/propulsion: a 3.5 ml volume of carrier (H_2O nanopure), 0.5 ml of urine were aspirated and a V ml volume of a $0.2 \mu\text{g ml}^{-1}$ PDT solution, buffered with NaH_2PO_4 0.5 M/ NH_3 at pH 6 ($V=0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4$ and 0.5) were aspirated. They were propelled from the holding coil through the microcolumn (retention step). A 3.0 ml volume of carrier and 1.0 ml of *washing solution* were aspirated. They were propelled (washing step). A 3.0 ml volume of carrier and 1.0 ml of *elution solution* were aspirated. They were propelled (elution step). This cycle was repeated three times.

A calibration line $y = (2 \pm 2) + (2110 \pm 30)x$ was obtained (y , fluorescence intensity; x , μg PDT). The intercept was statistically similar to zero being $t_{\text{experimental}} = 1.02$ and $t_{\text{theoretical}} = 2.78$ (5% significance level, $N - 2 = 4$ d.f.). This proves the total elimination of the constant interference.

3.2. Other studies on the experimental conditions

3.2.1. Sequences of aspiration

Different sequences of sample and standard aspiration into the holding tube were assayed to ensure greater precision. The sequence sample–standard was selected because it provided a relative standard deviation (R.S.D.) in the order of 0.4%, which was lower than other sequences, such as standard–sample–standard, standard–sample or sample–standard–sample.

3.2.2. pH of the urine samples

Experiments at different pH values, within the usual range of urine samples (pH 4–7) were also carried out, using NH_3 2 M and HCl 1 M to adjust the pH of the urine. Similar results were obtained for a urine spiked with $0.060 \mu\text{g ml}^{-1}$ PDT, indicating the procedure is robust against the urine pH.

3.2.3. pH of the PDT standard solution

Experiments at different pH values were done showing that accuracy is not affected by this parameter. However, if the solution is not buffered, there is around a 10-fold increase in the R.S.D. of the determination.

3.2.4. Stability of the urine samples: intra and interday data

Due to the special features of biological samples, differences among analytical results obtained from interday studies can be due not only to the irreproducibility of the analytical method but also to sample decomposition. In order to determine both the stability of urine samples and the reproducibility of the pro-

Table 1
Study of the stability of human urine samples

Store	PDT found \pm S.D. ($\mu\text{g ml}^{-1}$)				
	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4
Room temperature ($T = 28^\circ\text{C}$)	0.103 ± 0.009	0.108 ± 0.008	0.123 ± 0.005	0.126 ± 0.009	0.123 ± 0.010
$T = 11^\circ\text{C}$	0.103 ± 0.009	0.106 ± 0.008	0.101 ± 0.004	0.134 ± 0.012	0.122 ± 0.007

S.D., standard deviation obtained as the standard deviation of the extrapolated value in the standard addition line ($n = 6$ points).

posed method, the following experiment was carried out. Two portions were taken from a PDT-free urine sample spiked with $0.100 \mu\text{g ml}^{-1}$ PDT. One of them was stored at room temperature (28°C maximum) and the other one in a refrigerator (11°C). The PDT content of both portions was analyzed over the following 4 days. Data are shown in Table 1. The values indicated that samples must be analyzed during the first day after collection or stored in the refrigerator and used within 3 days, because longer conservation times lead to errors.

3.2.5. On-line standard addition calibration into the SI system

As shown in Section 2.3 the standard addition was carried out by varying the volume of only one standard, and generating the diluted solutions into the SI system, according to the cycle described for the proposed method. Experiments using the same urine were also done with the standard addition carried out by introducing several standards of different concentrations, and results were comparable. Because of this and its greater automation, the on-line standard addition using only one standard is preferable.

3.3. Analytical figures of merit

The accuracy of the method was studied by using it to analyse 11 spiked human urine samples.

Urine samples were free of PDT and were spiked with known amounts of the analyte. The PDT concentration in the spiked samples was between 40 and 200 ng ml^{-1} . Results obtained are shown in Table 2. The standard deviations were obtained as the

Table 2
Determination of PDT in spiked human urine samples

Sample	Added concentration ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Found concentration \pm S.D. ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
1	0.100	0.110 ± 0.019
2	0.061	0.064 ± 0.005
3	0.051	0.055 ± 0.002
4	0.202	0.198 ± 0.013
5	0.043	0.047 ± 0.002
6	0.122	0.130 ± 0.006
7	0.150	0.160 ± 0.012
8	0.079	0.081 ± 0.004
9	0.049	0.046 ± 0.004
10	0.060	0.061 ± 0.002
11	0.120	0.125 ± 0.017

S.D., standard deviation obtained as the standard deviation of the extrapolated value in the standard addition line ($n = 6$ points).

standard deviation of the extrapolated value in the standard addition line [22]. The correlation line for the 11 mean values of PDT obtained using the proposed method versus the added contents was studied. The line obtained was $y = (3 \pm 3) + (1.00 \pm 0.03)x$ ($r^2 = 0.9917$, $N = 11$), where x and y are expressed in ng ml^{-1} . The $t_{\text{theoretical}}$ value (5% significance level, $N - 2 = 9$ d.f.) was 2.26 and the experimental values for the intercept and the slope were 0.97 and 0.16, respectively, which shows the comparability of the results.

The R.S.D. of the concentration values obtained for the analyzed samples was in the order of 3–14%, with a mean value of 7%, indicating a good level of precision, taking into account that traces of PDT are determined.

The sensitivity of the instrumental measurements differs for each urine sample. The mean slope of the standard addition calibration curves of the analyzed urine samples was of the order of $1900 \mu\text{g}^{-1}$.

The detection limit of each analysis estimated by $3S_{y/x}/b$ (where $S_{y/x}$ is the standard deviation of the calibration curve and b is the slope) was $5 \pm 2 \text{ ng}$, which is $10 \pm 4 \text{ ng ml}^{-1}$ of PDT in the urine samples (for a sample injection volume of $500 \mu\text{l}$).

3.4. Validation of the method for urine from users of sunscreens containing PDT

Five volunteers applied 10 ml of a commercial sunscreen lotion containing 5% PDT. Their urine was collected both before and after the application for a period of 1–3 days. Fig. 5

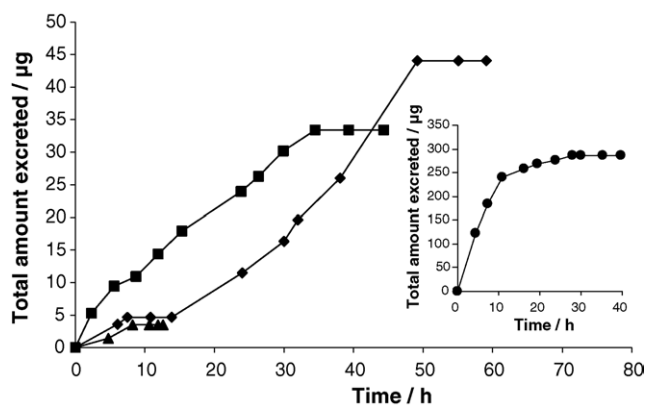


Fig. 5. Total amount excreted for four volunteers after application sunscreen product containing PDT (■) volunteer 1; (◆) volunteer 2; (▲) volunteer 3 and (●) volunteer 4.

shows the results obtained expressed as the total μg excreted. Volunteer 4 excreted around 300 μg PDT and continued excreting for 30 h after the application. Volunteers 1 and 2 excreted between 35 and 45 μg and they needed 35 and 50 h, respectively for excretion to become undetectable. However, volunteer 3 had a very low level (3.5 μg) and rapid (8 h) excretion and the urine sample of volunteer 5 (results not shown) gave undetectable values. These results shows that the absorption/excretion process of PDT in the human body depends greatly on the characteristics of each person. As the PDT is water-soluble UV filter [21], this feature could favour its rapid urinary excretion.

4. Conclusions

A fluorimetric method enabling PDT determination at ng levels is proposed here for the first time.

Direct and selective determination of PDT in urine samples can be achieved through the combination of sequential-injection with solid-phase extraction and fluorescence detection.

Automation of the method means a decrease in the amount of reagents used and residues generated. The SI system allows the required analysis sequence to be programmed using suitable software.

The applied SI–standard addition method avoids matrix interferences and it requires only one standard solution. The accuracy of the developed method has been proved by analysing 11 spiked urine samples.

The sensitivity of this method enables PDT determination in urine samples taken from volunteers after topical application of the sunscreen. Results seem to indicate that the excretion of this UV filter is both low and fast enough.

An analytical method for in vitro determination of the percutaneous absorption of PDT has been also recently developed by our research team (unpublished results). Both methods will allow an in-depth study of the biokinetics of this UV filter in the human body.

Acknowledgements

Authors acknowledge the financial support of the Spanish Ministry of Education and Science (Project BQU2003-00015). The authors also acknowledge the collaboration of the volunteers specially that of S. Balaguer, S. Timor, J.L. Grueso and S. Barbosa.

References

- [1] C. Fernandez, G. Marti-Mestres, J. Ramos, H. Maillols, J. Pharm. Biomed. Anal. 24 (2000) 155–165.
- [2] E. Chatelain, B. Gabard, C. Surber, Skin Pharm. Appl. Skin Physiol. 16 (2003) 28–35.
- [3] Laugel, C. Do Nascimento, D. Ferrier, J.P. Marty, A. Baillet, Appl. Spectrosc. 55 (2001) 1173–1180.
- [4] M. Cambon, N. Issachar, D. Castelli, C. Robert, J. Cosmet. Sci. 52 (2001) 1–11.
- [5] K.A. Walters, M.S. Roberts, Basic Clin. Dermatol. 21 (2002) 465–481.
- [6] C.S. Okereke, M.S. Abdel-Rahman, M.A. Friedman, Toxicol. Lett. 73 (1994) 113–122.
- [7] T. Felix, B.J. Hall, J.S. Brodbet, Anal. Chim. Acta 371 (1998) 195–203.
- [8] M.T. Vidal, A. Chisvert, A. Salvador, Talanta 59 (2000) 591–599.
- [9] V. Sarveiya, S. Risk, H.A.E. Benson, J. Chromatogr. B 803 (2004) 225–231.
- [10] L. Gagliardi, G. Cavazzutti, L. Montanarella, D. Tonelli, J. Chromatogr. 464 (1989) 428–433.
- [11] J.E. DiNunzio, R.R. Gadde, J. Chromatogr. 519 (1990) 117–124.
- [12] P. Wallner, Dtsch. Lebensm. Rundsch. 89 (1993) 375–379.
- [13] X.Y. Yao, X.Q. Zheng, X.Y. Win, Q.P. Qi, Sepu 16 (1998) 223–225.
- [14] S. Scalia, J. Chromatogr. A 870 (2000) 199–205.
- [15] K. Ikeda, S. Suzuki, Y. Watanabe, J. Chromatogr. 513 (1990) 321–326.
- [16] K.W. Ro, J.B. Choi, M.H. Lee, J.W. Kim, J. Chromatogr. A 688 (1994) 375–382.
- [17] A. Chisvert, M.C. Pascual-Martí, A. Salvador, Fresenius J. Anal. Chem. 369 (2001) 638–641.
- [18] A. Chisvert, M.C. Pascual-Martí, A. Salvador, J. Chromatogr. A 921 (2001) 207–215.
- [19] A. Chisvert, A. Salvador, J. Chromatogr. A 977 (2002) 277–280.
- [20] A. Salvador, A. Chisvert, Anal. Chim. Acta 537 (2005) 15–24.
- [21] A. Salvador, A. Chisvert, Anal. Chim. Acta 537 (2005) 1–14.
- [22] J.C. Miller, J.N. Miller, Statistics for Analytical Chemistry, Prentice-Hall, Scarborough, Ont., Canada, 1993, 256 pp.

A. Balaguer · A. Salvador · A. Chisvert · M. Meliá ·
M. Herráez · O. Díez

A liquid chromatography–fluorimetric method for the *in vitro* estimation of the skin penetration of disodium phenyldibenzimidazole tetrasulfonate from sunscreen formulations through human skin

Received: 2 December 2005 / Revised: 26 January 2006 / Accepted: 1 February 2006 / Published online: 21 March 2006
© Springer-Verlag 2006

Abstract Disodium phenyldibenzimidazole tetrasulfonate (PDT) is a new organic UV filter with hydrophilic properties used in modern sunscreen spray formulations. The aim of this work was to develop and validate an analytical method that can be used to study skin absorption of PDT from sunscreens. Results obtained *in vitro* for human skin showed a low level of absorption. The proposed *in vitro* method employs a diffusion cell. Sunscreen lotion was applied onto pretreated human skin, which was then placed in the cell. PDT was collected in a receptor liquid, the surface of which was in contact with the skin. The solutions obtained were diluted appropriately and analyzed by liquid chromatography without any interference. The analytical features of chromatographic determination with fluorimetric detection were suited to this analytical problem, since this method gave a limit of detection of 1 ng ml^{-1} . Phenol red (PR) was used as a marker to check the skin integrity, and a sensitive method based on sequential injection on-line solid-phase extraction

coupled with spectrophotometric detection was developed for determining this marker in the receptor liquid in order to screen the cells.

Keywords Disodium phenyldibenzimidazol tetrasulfonate (PDT) · Human skin penetration · *In vitro* · Liquid chromatography–fluorimetric detection

Introduction

Sunscreen products are widely used to protect the skin against the harmful effects of exposure to UV radiation [1]. UV filters are incorporated into many cosmetics intended for everyday use as well as so-called “beach” or “snow” products.

The potential human health risks from UV filters depend on their toxicity and the level of exposure, which is a function of the level of percutaneous absorption of such topically applied substances that occurs in the human organism [2]. Several adverse effects of sunscreens have been described [1], including dermatitis or allergies [3–6], and moreover the possibility of other systemic effects has also been suggested.

An ideal sunscreen product should provide efficient protection against UV radiation with minimal skin absorption of the UV filters [1]. Recent studies have been carried out on a few UV filters, and results suggest that they could pass through the skin, but the extent to which they are absorbed to deeper tissues and the systemic circulation over time is currently unknown.

Some studies into the pharmacokinetics of UV filters have been performed *in vivo* on rats. Benzophenone-3 (BZ3) was determined by liquid chromatography (LC) in different tissues and biological fluids of rats after dermal and oral administration of pure UV filters [7–11].

A. Balaguer · A. Salvador (✉)
Departamento de Química Analítica, Facultad de Química,
Universitat de València,
Doctor Moliner St. 50-Burjassot,
46100 València, Spain
e-mail: amparo.salvador@uv.es
Tel.: +34-96-3543175
Fax: +34-96-3544436

A. Chisvert
Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología,
Facultad de Ciencias, Universidad de Alicante,
Alicante, Spain

M. Meliá · M. Herráez · O. Díez
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica,
Facultad de Farmacia, Universitat de València,
València, Spain

The penetration of UV filters through the human skin has been studied by some researchers *in vivo* on volunteers who applied a vehicle containing the target UV filter to their skin. After a certain time period, the level of UV filter in the stratum corneum was evaluated by the tape stripping method [12–21].

Other noninvasive *in vivo* methods based on the use of sensitive techniques such as gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) [22] or fluorimetry [23] have shown that urine passed by voluntary users of sunscreens formulated with certain UV filters, such as BZ3 [22] and 2-phenylbenzimidazole-5-sulphonic acid (PBS) [23], contained traces of these compounds. Although these assays do not give information on the levels of absorption of these compounds through the users' skin, they do provide evidence of this absorption.

Other authors have studied the absorption of UV filters through the skin by *in vitro* methods [2, 12, 13, 16–18, 24–33], using animal skin (preferably rat or pig), human skin or synthetic materials. The vehicles containing the UV filters were solvents, oils, emulsions or cosmetic products. However, only a few UV filters have been studied, of which BZ3 and octyl methoxycinnamate (OMC) have been studied the most.

Current European legislation does not permit the use of *in vivo* assays involving animals in order to evaluate the safety or efficacy of a new cosmetic when alternative methods exist, and moreover all *in vivo* assays using animals will be forbidden from 2009 [34]. Therefore, further research using either noninvasive *in vivo* (with volunteers) or *in vitro* methods is needed to help select the UV filters and matrices in new cosmetic formulations that exhibit minimal skin penetration, thus enhancing the safety of the end-products.

Disodium phenyl dibenzimidazole tetrasulfonate (PDT) is a new hydrosoluble organic UV filter used in modern sunscreen spray formulations. A sensitive sequential injection fluorimetric method has recently been developed by our group [35], which has proven that traces of PDT are

present in urine passed by those using a sunscreen containing this compound, thus indicating that a certain amount of PDT is absorbed through the skin.

The aim of the work presented here was to develop a sensitive *in vitro* method that will allow us to determine the extent to which the UV filter penetrates the skin, based on LC with fluorimetric detection. The procedure involves applying a sunscreen product containing PDT onto pretreated excised human skin placed in a diffusion cell and collecting the PDT that penetrates through it in a receptor fluid. A sensitive method based on sequential injection on-line solid-phase extraction coupled with spectrophotometric detection was also developed in order to screen the cells.

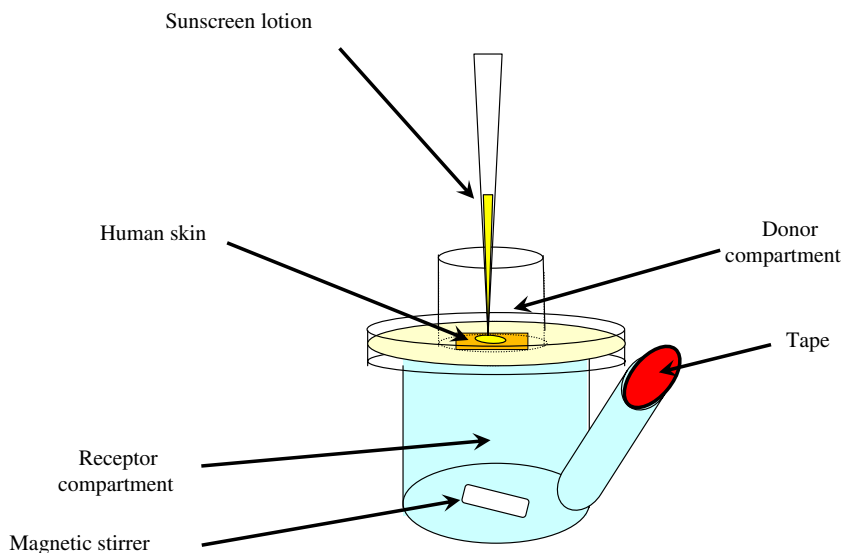
Experimental

Apparatus

The percutaneous penetration cell design used for the *in vitro* study is shown in Fig. 1. The cell was made from glass and it had two compartments, the donor (upper part), where the prepared epidermis was placed, and the receptor (lower part), where the receptor fluid solution was introduced. The capacity of the receptor compartment was 6 ml, and the temperature was maintained at 37 °C by a water bath which was kept in the dark. The receptor fluid was in close contact with the skin during the experiment and was continuously and homogeneously stirred by a rotating Teflon-coated magnet placed inside the cell. As shown, the receptor incorporated a tube sealed with a tape that allowed the receptor fluid to be sampled at various time points without interrupting the experiment, making it possible to construct an absorption profile. The extracted volume was replaced with receptor fluid solution after each sampling.

A Perkin Elmer (Wellesley, MA, USA) LC system equipped with a Perkin Elmer LC pump 250 and a Perkin

Fig. 1 Diffusion cell used for the proposed *in vitro* procedure



Elmer series 200 fluorescence detector was employed for PDT determination, using 20 μl loop injection. A LiChrospher RP-18 (12.5 cm \times 4 mm I.D., 5 μm particle size) column from Merck (Darmstadt, Germany) was used.

A 8453 Hewlett-Packard (Palo Alto, CA, USA) UV-VIS diode array spectrophotometer was used for the on-line spectrophotometric determination of phenol red (PR), which was used as a marker to prove the integrity of the skin samples during the *in vitro* study. The sequential injection (SI) system depicted in Fig. 2 was constructed with the following components: a Crison 2030 eight-channel automatic valve (Alella, Barcelona, Spain) connected to a personal computer via an RS 232C interface and controlled by home-made software, a Crison 2031 autoburette equipped with a 5 ml syringe and a UV Hellma spectrophotometry flow-through cell (Hellma, Müllheim/Baden, Germany) with a light path of 10 mm. PTFE tubing with an internal diameter of 0.5 mm was used to connect the system. A 2.5 ml holding coil was also used. A microcolumn was prepared by fitting 100 mg of C18 packing into a 6 mm i.d. cartridge (Varian, Barcelona, Spain).

A Crison microPH 2001 pH meter was used for the pH measurements.

Reagents

Disodium phenyl dibenzimidazole tetrasulfonate (PDT) >99 % (Haarmann & Reimer, Parets del Vallés, Spain) was used as the standard.

Phenol red (PR) >99 % (Scharlab, Barcelona, Spain) was used as the marker when checking skin integrity.

NaH_2PO_4 and NaOH (Scharlab, Barcelona, Spain) were used to prepare the buffer solutions. NaCl (Scharlab, Barcelona, Spain) was used to make the receptor fluid solution sufficiently saline. LC-grade ethanol (EtOH) (Scharlab, Barcelona, Spain) was used to simplify the elution in both the LC-fluorescence determination of the analyte (PDT) and the SI-spectrophotometric determina-

tion of the marker (PR). Ultrapure water was used throughout.

A sunscreen lotion containing 5% PDT and 0.05% PR was used in this study. The lotion was prepared in our laboratory according to the procedure used in the cosmetic industry, provided by RNB S.L. (Valencia, Spain). Other components, such as surfactants, preservatives, softening agents, bronzing agents, complexing agents and so on were present in the formulation. The human skin samples were from abdominal parts of the body and were obtained from aesthetic surgery wastes.

Procedures

Preparation of the human skin

Only the epidermis was used in the experiments because the dermis could retain some compounds that, *in vivo*, would pass into the systemic compartment via the microcirculatory system. Skin preparation comprised the following steps. Firstly, fats were mechanically removed using a scalpel. Then the skin was spread and fixed on a rubber band that was placed inside a 60 $^\circ\text{C}$ water bath for a minute [36]. Afterwards, the skin was removed from the bath and the epidermis was carefully separated from the rest. The prepared epidermis was placed on absorbent paper; it could then be used or frozen for later use.

Preparation of the diffusion cell

The size and shape of the diffusion cell (Fig. 1) was chosen by drawing upon the previous experiences of some of the authors of this article regarding the application of diffusion cells for *in vitro* percutaneous penetration of pharmaceutical products [37, 38].

The surface area of the skin placed on the donor was of the order of 1 cm^2 . It should be emphasized that the lotion cannot be spread over the skin here in the same way as performed by users in real conditions; instead it is applied by a micropipette. The volume of lotion applied was very low (10 μl) in order to achieve good extension of the lotion over the surface of the skin. The content of PDT in the sunscreen lotion was 5%, half of the maximum level authorized by EU legislation.

As PDT is a hydrophilic compound, a buffered saline solution was used as the receptor fluid solution, which was isotonic with the blood. An 8.4×10^{-2} M $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ buffer (pH 7.4) solution was used, containing 0.44% NaCl . The lower part of the cell was placed in a water bath, where the temperature was maintained at 37 $^\circ\text{C}$. The system was kept in the dark. The receptor fluid was sampled at different times.

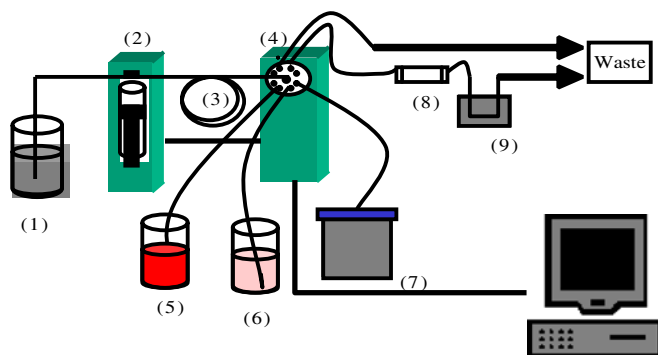


Fig. 2 SI system used to check the integrity of the skin by determining the PR in the receptor fluid. (1) Carrier, buffer solution pH=9; (2) autoburette with 5 ml syringe; (3) holding coil, 2.5 ml; (4) eight-channel automatic valve; (5) PR standard solution; (6) receptor fluid sample; (7) eluent; (8) C18 microcolumn; (9) UV-VIS flow cell

Screening of the cells: Study of the experimental conditions used for PR determination

Before analysis, it was necessary to ensure that the cell was completely sealed and that sunscreen only passed into the receptor fluid through the skin. Moreover, it was necessary to search for a way to evaluate whether the skin remained undamaged after preparation and during the study.

Phenol red (PR) was used as the marker molecule. A very low mass of PR (5 µg) was applied in order to avoid any competition during the PDT absorption process; this potential competition was studied at these conditions and no statistically significant differences were found (a 5% significance level was used) between PDT absorption in the absence or the presence of PR. Any cell where the receptor fluid become colored was removed at once and was not included in the study. However, this was not enough to ensure the complete integrity of the skin, because our eyes need a relatively high PR content to be able to spot color changes. Because of this, the concentration of PR in the receptor fluid samples was monitored by a SI system coupled to spectrophotometric detection; any cell where the mass of PR was higher than 10% with respect to that applied on the skin was removed from the study.

PR turns violet at pH values higher than 8 and its absorptivity increases. Because of this, a pH study was carried out, where a pH of 9 was selected for the eluent. The same pH was used for the carrier solution, so that the buffer concentration was same as that of the receptor fluid. The SI system shown in Fig. 2 allowed us to modify the pH without diluting the sample, and to concentrate the PR in a C18 microcolumn, which resulted in a low detection limit. Different mixtures of EtOH and carrier were assayed as eluent. A (30:70 v/v) EtOH:carrier solution was selected because it allowed complete elution of the PR. An elution volume of 1 ml was enough to achieve complete elution.

On-line calibration of the SI system was performed, and only one standard solution was required. The calibration standards were generated by varying the volume taken from a stock solution of PR (see [Procedures](#)). The results from this procedure were compared with those obtained by aspirating several PR standards of different concentrations in the SI system, and the intercepts and the slopes were found to be statistically comparable (to the 5% significance level). The on-line calibration using only one standard was therefore preferred due to its greater level of automation.

Screening of the cells: Proposed method for PR determination

An 8.4×10^{-2} M $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ buffer (pH 9) solution was used as the carrier, and 30:70 (v/v) EtOH:carrier was used as eluent. The receptor fluid samples obtained at the end of the experiments were directly introduced into the SI system. The following aspiration/propulsion cycle was used: (1) aspirate 2 ml of carrier; (2) aspirate either the receptor fluid sample or the PR stock standard solution; (3) propel the total volume from the holding coil through

the microcolumn to the detector; (4) aspirate 2 ml of carrier; (5) aspirate 1 ml of the eluent; (6) propel 3 ml. Three measurements were carried out for each solution. Detection was carried out at 559 nm and corrected at 620 nm (to minimize the effect of variations in refractive index). The aspirated volume of the receptor fluid sample was 1 ml. Different volumes (between 50–250 µl) of a PR stock standard solution ($4 \mu\text{g ml}^{-1}$) were used to generate the diluted standards on-line. This PR stock standard solution was prepared by weighing out an appropriate amount of PR and diluting this with 8.4×10^{-2} M $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ buffer (pH 7.4).

Determination of PDT: Study of the experimental conditions

A procedure based on reversed-phase LC with UV detection, with gradient elution, and using environmentally friendly solvents, was previously developed by some of the authors of this article [39] to determine the eighteen UV filters that are most commonly used in Europe as sunscreens in cosmetics, including PDT. This method could be useful for studying the percutaneous absorption levels of these UV filters, when the levels in the receptor fluid solution are high enough. We assayed this method in preliminary studies for the present work; however, a reversed-phase LC coupled to a more sensitive fluorimetric detector was finally preferred, because the PDT levels present in the receptor fluid sample during the first few hours of collection were low.

An excitation wavelength of 340 nm and an emission wavelength of 392 nm, which provided maximum fluorescence intensity, were selected for the detection stage. Preliminary assays using receptor fluid as the mobile phase did not provide good results, as wide peaks with shoulders were obtained. The peak shapes were improved by adding small amounts of EtOH. The best conditions were achieved using a low phosphate buffer concentration (8.4×10^{-4} M) and 20 % EtOH.

Determination of PDT: Proposed method

A 20:80 (v/v) EtOH: 8.4×10^{-4} M $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ buffer (pH 7.4) solution was used as the mobile phase.

For each experiment, 20 µl of the receptor fluid sample were placed in a vial and diluted by adding an adequate volume of the mobile phase solution (the dilution required depended on the PDT content found, but was always 1:50 or higher). The mixture was shaken and analyzed by LC–fluorescence spectrometry using PDT standards (containing 10–400 ng ml⁻¹) dissolved in mobile phase. Experiments were carried out in triplicate.

The solutions were run at a flow rate of 0.5 ml min⁻¹ and the detection stage used an excitation wavelength of 340 nm and an emission wavelength of 393 nm. The PDT values obtained at each time point were corrected

Table 1 Analytical parameters obtained from the SI spectrophotometric determination of PR (see text for experimental conditions)

Linear range	Up to 2 µg of PR (for an injection volume of 1,000 µl, this means 2 µg ml ⁻¹)
Working range	0.2–2 µg of PR
Calibration line	Absorbance = (-0.008±0.005)+(0.463±0.004)×Mass (Mass in µg)
R ²	0.9994
Sensitivity	0.463±0.004 µg ⁻¹
Limit of detection	0.02 µg (*) (for an injection volume of 1 ml, this means 20 ng ml ⁻¹)

(*) Value estimated as $3s_{y/x}/b$, where b is the slope of the calibration line, $s_{y/x}$ is the residual standard deviation

for the volume of receptor fluid extracted for previous determinations.

Results and discussion

Screening of the cell: Analytical parameters from determining PR

Calibration parameters

The analytical parameters (including those for the line corresponding to the best fit to the calibration plot) obtained during PR determination are given in Table 1. The analytical parameters obtained show that this method is suited to investigations of this particular analytical problem. The limit of detection obtained was lower than that needed to ensure the integrity of the skin.

Accuracy of the method

Studies were carried out to ensure that neither the skin nor the sunscreen lotion interfered with PR determination, thus establishing the accuracy of the method. Epidermis was placed in the diffusion cell and 200 µl of sunscreen lotion containing 5% PDT (which did not contain PR) were added. This receptor fluid sample was collected after 48 h. A standard addition calibration was performed using this receptor fluid sample, which was spiked with different amounts of PR and diluted with carrier solution. The intercept and slope were statistically comparable (to the 5% significance level) to those obtained from determining PR in carrier solutions. This showed that there were neither

constant nor proportional interferences from skin, lotion or PDT during the PR determination. Note that this absence of interference was evaluated under less favorable experimental conditions than those employed during the preparation of the diffusion cell by the proposed method.

Precision

In order to estimate the precision of the PR determination, three solutions of PR present in fluid receptor at concentrations near to the limit of acceptance of the cell (10% of applied dose) were analyzed, and the relative standard deviation of the results was 9%.

Determination of PDT: Analytical parameters

Calibration parameters

The analytical parameters (including those for the line corresponding to the best fit to the calibration plot) obtained during the LC determination of PDT using fluorimetric detection are given in Table 2. These analytical parameters again show that this method was suited to this analytical problem; the instrumental limit of detection was on the order of 1 ng ml⁻¹.

Accuracy of the method

Studies were carried out to ensure that neither the skin nor the sunscreen lotion interfered with PDT determination, thus establishing the accuracy of the method. A PDT-free

Table 2 Analytical parameters obtained from the LC–fluorescence determination of PDT (see text for experimental conditions)

Retention time (*)	1.224±0.003 min
RSD in area (*)	0.4 %
Linear range	Up to 420 ng ml ⁻¹
Working range	10 to 400 ng ml ⁻¹
Calibration line	Area = (1.3×10 ⁴ ±1.2 10 ⁴) + (5.32×10 ⁴ ±0.05 10 ⁴)×Concentration (Conc. expressed as ng ml ⁻¹)
R ²	0.9998
Sensitivity	5.32×10 ⁴ ±0.05 10 ⁴ ng ⁻¹ ml
Limit of detection	1 ng ml ⁻¹ (**)

(*) Five measurements of a PDT standard were carried out

(**) Value estimated as $3s_{y/x}/b$, where b was the slope of the calibration line, $s_{y/x}$ is the residual standard deviation

Table 3 Results for the percutaneous absorption of PDT obtained by the LC–fluorescence determination of PDT in receptor fluid samples

Time	Cell 1			Cell 2			Cell 3		
	<i>C</i>	<i>s</i>	RSD	<i>C</i>	<i>s</i>	RSD	<i>C</i>	<i>s</i>	RSD
2 h	73	3	4	63	1	2	Not detected	–	–
Mean concentration (2 h) = 68 ng ml ⁻¹ (<i>s</i> =7, RSD=10)									
22 h	451	8	2	1220	20	2	900	10	1
Mean concentration (22 h) = 900 ng ml ⁻¹ (<i>s</i> =400, RSD=50)									
24 h	448	9	2	1290	30	2	880	10	1
Mean concentration (24 h) = 900 ng ml ⁻¹ (<i>s</i> =400, RSD=50)									
Time	Cell 1			Cell 2			Cell 3		
	<i>A</i> %	<i>s</i>	RSD	<i>A</i> %	<i>s</i>	RSD	<i>A</i> %	<i>s</i>	RSD
24 h	0.44	0.01	2	1.51	0.04	3	0.98	0.01	1
Mean absorption (24 h) = 1.0 % (<i>s</i> = 0.5, RSD=50)									

C (expressed as ng ml⁻¹) is the mean PDT concentration obtained in the receiver at the studied time intervals, with three replicates carried out for each independent cell

A (expressed in %) is the percutaneous skin absorption, evaluated as the percentage of the dose applied that was absorbed through the skin and into the receiver (the mass of PDT applied was around 0.5 mg and the receiver volume was 6 ml)

s is the standard deviation of the results

RSD (expressed in %) is the relative standard deviation of the results

lotion was prepared according the same procedure used for the sunscreen lotion. Epidermis was placed in the diffusion cell and 200 µl of PDT-free sunscreen lotion containing 0.05% PR were added. A PDT-free receptor fluid sample was collected after 48 h.

Different dilutions of the PDT-free receptor fluid with mobile phase were prepared and assayed under the selected chromatographic conditions. Dilutions of 1:50 or higher resulted in no significant fluorescence intensity, and these results were statistically comparable (to the 5% significance level) to those from mobile phase injection.

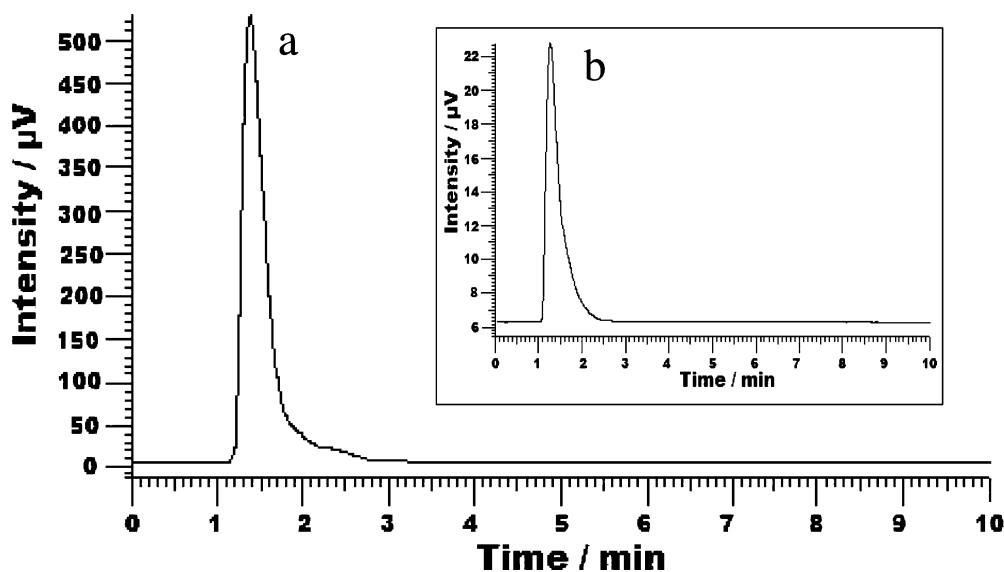
A standard addition calibration was performed using the PDT-free receptor fluid sample, which was spiked with different amounts of PDT and diluted with mobile phase. The fluorescence intensity was measured. The standard addition calibration line obtained was: Area = $(1.7 \times 10^4 \pm 1.2 \times 10^4) +$

$(5.29 \times 10^4 \pm 0.05 \times 10^4) \times C$ ($R^2=0.9997$, $N=6$), *C* being expressed as ng ml⁻¹. The conventional calibration line obtained (during the same working session) from solutions of PDT in mobile phase is given in Table 2. The slopes and the intercepts of both of these lines were statistically comparable (to the 5% significance level) which showed that neither proportional nor constant errors originating from the skin or sunscreen lotion were present during the determination of PDT.

Application of the proposed method

The percutaneous absorption of PDT through the epidermis of an individual was studied using three diffusion cells. Table 3 shows the results obtained for the concentration of PDT in the receptor fluid samples from each cell (three

Fig. 3a–b Representative chromatograms obtained for a sample (a) and a PDT standard (b) prepared by the proposed method (PDT standard concentration was 23 ng ml⁻¹)



replicates were carried out for each cell). Figure 3 shows representative chromatograms obtained for a sample (a) and a standard (b).

The precision of the proposed method can be estimated from the standard deviations in the results obtained for each cell at different times (2, 22 and 24 h) elapsed from the application of the sunscreen lotion onto the skin and the contact of this with the receptor fluid. These standard deviations were very good (i.e. low: RSDs were 1–4%). However, the mean PDT concentrations obtained for the same elapsed time but for different cells were different (RSDs were 10–50%), showing that it is necessary to study a high number of cells in order to obtain a representative mean value for each elapsed time. The main reason for this could be that, although the skin from only one individual was used in the experiment, each cell used a different piece of this skin; these pieces can vary in thickness, permeability and other features, and the skin preparation process could also differ slightly. Representative data can only really be obtained by using skin pieces from a large number of different people.

Although these results are only preliminary, some conclusions can be drawn. Firstly, the mean amount of PDT that was percutaneously absorbed after 24 hours was on the order of 1% of the dose applied, which is a relatively low level. Secondly, no significant PDT percutaneous absorption was observed 22 hours after the application of the sunscreen lotion onto the skin.

On the other hand, in a previous *in vivo* work carried out by our group [35], we observed traces of PDT in the urine passed by five users of the same sunscreen lotion studied here, after 10 ml of lotion had been applied to the skin (total amount of PDT on the order of 0.5 g). Although a representative number of users are needed for such assays, the results obtained allowed us to gain a preliminary estimate for the amount excreted. These results showed that the excretion of PDT from the human body depends on the person involved, varying from quantities lower than 5 µg up to around 300 µg. The median value was on the order of 35 µg, 0.007% of the PDT applied. The time after which no more PDT was excreted was also different for each volunteer.

These preliminary data for percutaneous absorption and urinary excretion of PDT suggest that around 1% of the dose of PDT applied (from the *in vitro* experiment) was absorbed, and that urinary excretion was on the order of 0.007% of the dose applied (from the *in vivo* experiment), which means that around 0.7% of the amount absorbed through the skin is excreted in the urine.

However, these are only preliminary results, since the aim of this study was to develop and validate the method for determining PDT in the receptor fluid, and to evaluate the marker (PR) used to check the skin integrity. A subsequent study on the pharmacokinetics of PDT, where the percutaneous absorption for different exposure times was investigated in detail in a large number of experiments using skins from different individuals, will be considered later. The influence of the cosmetic vehicle on the

absorption process and the amount of PDT remaining in the skin after the experiments will be also studied.

Conclusions

The proposed method enables the extent that PDT from sunscreens penetrates through human skin to be determined, without interference. The sensitivity, limit of detection and precision of the technique developed here are suited to the concentration levels found in the receptor fluid. The results show the potential application of the proposed method to studies of the biokinetics of this UV filter.

The sensitive cell screening procedure proposed here, involving PR determination, is a general method that could be used in other studies that employ diffusion cells.

Further research into absorption/excretion of UV filters in the human body is needed so that the UV filters and matrices that give the lowest skin absorption and the fastest excretion can be incorporated into new sunscreen formulations.

Acknowledgements The authors would like to express their heartfelt gratitude to the Spanish Analytical Chemistry Society for the prize for the best work in the area of bioanalysis, awarded during the 11th Instrumental Analysis Conference (Barcelona, November 2005). A. Salvador, A. Chisvert and A. Balaguer acknowledge the financial support of the Spanish Ministry of Science and Education for our research project on the development of analytical methods to study the efficacy and safety of sunscreen products (BQU2003-00015). A. Balaguer is also grateful for his grant.

References

- Benson HA (2000) *Am J Clin Dermatol* 1:217–224
- Benech-Kieffer F, Meuling WJ, Leclerc C, Roza L, Leclaire J, Nohynek G (2003) *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 16: 343–355
- Schauder S, Ippen H (1997) *Contact Dermatitis* 37:221–232
- Berne B, Ros AM (1998) *Contact Dermatitis* 38:61–64
- Schinicit T, Ring J, Abeck D (1998) *Dermatology* 196:354–357
- Darvay A, White IR, Rycroft RJ, Jones AB, Hawk JL, McFadden JP (2001) *Br J Dermatol* 145:597–601
- Okereke CS, Abdel-Rhaman MS, Friedman MA (1994) *Toxicol Lett* 73:113–122
- Gustavsson Gonzalez H, Farbrot A, Larko O (2002) *Clin Exp Dermatol* 27:691–694
- Abdel-Nabi IM, Kadry AM, Davis RA, Abel-Rahman MS (1992) *J Appl Toxicol* 12:255–259
- Okereke CS, Kadry AM, Abdel-Rahman MS, Davis RA, Friedman MA (1993) *Drug Metab Dispos* 21:788–791
- Kadry AM, Okereke CS, Abdel-Rahman MS, Friedman MA, Davis RA (1995) *J Appl Toxicol* 15:97–102
- Chatelain E, Gabard B, Surber C (2003) *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 16:28–35
- Wissing SA, Muller RH (2002) *J Control Release* 81:225–233
- Fernandez C, Nielloud F, Fortune R, Vian L, Marti-Mestres G (2002) *J Pharm Biomed Anal* 28:57–63
- Coateau C, Perez Cudell N, Connan AE, Coiffard LJ (2001) *Int J Pharm* 222:153–157
- Fernandez C, Marti-Mestres G, Ramos J, Maillols H (2000) *J Pharm Biomed Anal* 24:155–165

17. Treffel P, Gabard B (1996) *Pharm Res* 13:770–774
18. Laugel C, Do Nascimento C, Ferrier D, Marty JP, Baillet A (2001) *Appl Spectr* 55:1173–1180
19. Cambon M, Issachar N, Castelli D, Robert C (2001) *J Cosmet Sci* 52:1–11
20. Gottbrath S, Gruenefeld J, Mueller-Goymann CC (2003) *Trends Clin Exper Dermatol* 1:70–77
21. Sarveiya V, Risk S, Benson HAE (2004) 803:225–231
22. Felix A, Hall BJ, Brodbelt JS (1998) *Anal Chem Acta* 371:195–203
23. Vidal MT, Chisvert A, Salvador A (2003) *Talanta* 59:591–599
24. Hagedorn-Leweke U, Lippold BC (1995) *Pharm Res* 12:1354–1360
25. Marginean-Lazar G, Baillet A, Fructus AE, Arnaud-Battandier J, Ferrier D, Marty JP (1996) *Drug Cosmet Ind* 158:50–58
26. Walters KA, Brain KR, Howes D, James VJ, Kraus AL, Teetsel NM, Toulon M, Watkinson AC, Gettings SD (1997) *Food Chem Toxicol* 35:1219–1225
27. Pottard G, Laugel C, Baillet A, Schaefer H, Marty JP (1999) *Int J Pharm* 189:249–260
28. Jiang R, Roberts MS, Collins DM, Benson HA (1999) *Br J Clin Pharmacol* 48:635–637
29. Aghazarian V, Tchiakpe L, Reynier JP, Gayte-Sorbier A (1999) *Drug Dev Ind Pharm* 25:1277–1282
30. Fernandez C, Marti-Mestres G, Mestres JP, Maillols H (2000) *J Pharm Biomed Anal* 22:393–402
31. Pottard G, Laugel C, Schaefer H, Marty JP (2000) *Skin Pharm Appl Skin Physiol* 13:336–344
32. Jiménez MM, Pelletier J, Bobin MF, Martini MC (2004) *Int J Pharm* 272:45–55
33. Simeoni S, Scalia S, Benson AE (2004) *Int J Pharm* 280:163–171
34. EC (2003) Seventh amendment of Directive 76/768/EEC on Cosmetic Products, Directive 2003/15/EC. European Communities, Brussels
35. Balaguer A, Chisvert A, Salvador A (2006) *J Pharm Biomed Anal* 40:922–927
36. Scott PC, Walker M, Dugard PH (1986) *J Soc Cosm Chem* 37:35–41
37. Borrás-Blasco J, Díez-Sales O, López A, Herráez M (2004) *Int J Pharm* 269:121–129
38. Díez-Sales O, Garrigues TM, Herráez J.V, Belda R, Martín-Villodre A, Herráez M (2005) *J Pharm Sci* 94:1039–1047
39. Salvador A, Chisvert A (2005) *Anal Chim Acta* 537:15–24

3.3. Tanning and Whitening Agents in Cosmetics. Regulatory Aspects and Analytical Methods

A. Chisvert^{1*}, A. Balaguer² and A. Salvador²

¹Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology, Faculty of Sciences, University of Alicante, Ctra. San Vicente del Raspeig s/n, 03690 San Vicente del Raspeig, Alicante, Spain

²Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Valencia, Valencia, Spain

TANNING COSMETIC PRODUCTS

Tanning products are cosmetic products closely related to sunscreen products described in Section 3.1, although their functions are not the same as the reader will realize further on.

Firstly, it is necessary to differentiate between sunless tanning products, which are products typically applied to skin producing a darkening effect without sun, and tanning accelerators, which are products that increase tanning when sunbathing. The former are becoming more popular because people can have tanned-looking skin without the harmful effects that solar radiation can cause, like those described in Section 3.1. They are considered as cosmetics by the European Union (EU) Cosmetics Directive (Council Directive 76/768/EEC), by the United States (US) Food and Drug Administration (FDA) and in Japan (see Section 1.1). Products intended to use for treating dermal diseases (e.g. vitiligo, psoriasis, etc.), even containing any of the tanning agents discussed in this section, will not be considered, since they fall outside the scope of this book, which focuses on cosmetic products.

These products are usually formulated as lotions or creams, which are spread on user's skin, producing a darkening effect. Moreover, in the event of sunless tanning cosmetics, there are sunless tanning booths where sunless tanning products are sprayed homogeneously onto all parts of the user's body.

As opposed to sunscreen products, there are no positive lists for active ingredients contained in tanning products. Nevertheless, the most popular active ingredient in sunless tanning cosmetics is dihydroxyacetone (DHA). DHA is considered as a general cosmetic ingredient in the EU and Japan frameworks, with tanning properties, whereas in US it is considered as a colour additive exempt from certification, and in fact, it is the only colour additive currently authorized by the FDA for use as a tanning agent (FDA, 2003).

*Corresponding author. Email: alberto.chisvert@ua.es

Analysis of Cosmetic Products

Amparo Salvador and Alberto Chisvert

Copyright © 2007 by Elsevier B.V.

All rights of reproduction in any form reserved

DHA interacts with basic aminoacids found in the stratum corneum to form brown black compounds called melanoidins by means of Maillard reaction (Fu *et al.*, 2004). Since DHA does not promote the synthesis of melanin (i.e. the natural pigment responsible for pigmentation in human skin), the most important thing to bear in mind when using this type of cosmetic is that they do not provide an effective protection against the sun. Nevertheless, recent studies have revealed that DHA provides low protection against ultraviolet A (UVA) radiation, whereas it does not provide any protection against ultraviolet B (UVB) radiation (Monfrecola and Prizio, 2001). The tan provided by this type of product disappears a few days after applying the product. Dermatological side-effects from use of these products are infrequent, but some isolated cases of contact dermatitis have been reported (Morren *et al.*, 1991). Moreover, high DHA concentrations have been found to produce an uneven, streaky and unnatural yellow/orange tan and a strong drying out the skin that can be reduced or even eliminated by avoiding the use of DHA-based products and using erythrulose-based products (Jermann *et al.*, 2002). Erythrulose is a very similar compound to DHA that works in the same way. Similarly, other hydroxyaldehyde compounds have been proposed as an alternative to DHA, but to our knowledge, they are under different patents. The topical application of melanins has also been shown effective as sunless tanning agent (Pawelek, 1998).

There are also water-soluble dyes, which work by temporarily staining the skin. These products are essentially a form of make-up, since the tint only lasts until it is washed off. The tanned effect that they produce can easily be removed with soap and water (Fu *et al.*, 2004).

On the other hand, tanning accelerators usually contain tyrosine or tyrosine derivatives, which can affect the natural process of melanogenesis, that is, the process by which the natural pigment melanin is synthesized by specialized cells called melanocytes. By contrast to DHA-based products, tyrosine-based products need the presence of sun. Tyrosine participates in the melanogenesis by working as a substrate of the enzyme tyrosinase, which converts tyrosine to L-dopa, and then to dopaquinone (Brown, 2001), prior to transformation to melanin, which is responsible for tanning. It is assumed that topical-applied tyrosine can penetrate the skin, diffuse through body tissues, enter melanocytes, thus increase the substrate for tyrosinase and then increase production of melanin. FDA considers tyrosine as an unapproved drug (FDA, 2003).

Bergapten (5-methoxypsoralen) is a photosensitizing furocoumarine found in bergamot oil. Nowadays, EU legislation prohibits more than 1 mg/kg in cosmetic products, but in the past it was used as a tanning accelerator, since it increased skin sensitivity to UV light and thus stimulated melanocytes to produce melanin; however, it also intensified erythema formation and skin cancer (Ashwood-Smith *et al.*, 1980; Autier *et al.*, 1997).

The above-mentioned tanning agents and other compounds under development, such as dimethylsulfoxide, lysosomotropic agents (e.g. ammonium chloride), diacylglycerols, thymidine dinucleotides, DNA fragments, melanocyte-stimulating hormone analogs, 3-isobutyl-1-methylxanthine, nitric oxide donors and bicyclic monoterpene diols, all of which are attributed tanning accelerator properties, have been reviewed by Brown (2001) in an interesting article.

There are other ways of self-tanning, like for example UV-radiation booths, or tanning pills, which obviously fall outside the scope of this book and will not be reviewed here.

Determination of tanning agents

There are no official analytical methods for the determination of any of the aforementioned tanning agents. A bibliographic search updated to June 2006, using analytical chemistry databases, revealed that very few publications focused on the determination of tanning agents in cosmetic products, and they were published many years ago, which shows the low level of interest in this type of product nowadays, presumably due to the fact that most of the tanning agent used (i.e. DHA) do not cause severe safety problems, whereas the other tanning agents have either become obsolete or are under development. Regardless of this assumption, we think that the development of analytical methods to perform quality control of these products with a view to assuring their efficacy is necessary.

We will now provide an overview of the scarce bibliography on this topic; however it should be mentioned that most of these papers are not easily accessible, thus the review is made on the basis of their respective abstracts.

To our knowledge, the first published paper focusing on DHA determination in cosmetics dates from 1962 (Pollak and Lorant, 1962), where DHA was reacted with hydroxylamine hydrochloride, and the subsequent acid liberation was titrated. Almost 20 years later, a paper was published where DHA was determined by liquid chromatography (LC) with an ultraviolet/visible (UV/VIS) spectrometry detector (Baruffini *et al.*, 1981). Later, two other papers were published on LC determination of DHA. On the one hand, Galensa and Schuster (1985) proposed both normal-phase and reversed-phase LC methodologies, where DHA was previously derivatized by means of benzylation. On the other hand, Ferioli *et al.* (1995) also derivatized DHA but by means of its bis-2,4-dinitrophenylhydrazone derivative, to carry out its determination by reversed-phase LC. Gas chromatography (GC) has been also applied to DHA determination. So, on the one hand Oberleithner and Wolff (1981), Matissek and Harper (1984) and Hild (1993) proposed GC methodologies where DHA was previously derivatized by means of an acetylation process carried out with acetic anhydride, to increase its volatility. On the other hand, other authors also proposed derivatization strategies, but by using benzylation (Galensa and Schuster, 1985) or silylation (Cumpelik, 1982) reactions.

With regard to bergapten, most of the published papers deal with its determination by means of LC (Quercia *et al.* 1979; Bettero and Benassi, 1981, 1983; Verger, 1983), although GC has also been applied (Blaas *et al.*, 1985).

To our knowledge, there are no other published papers focusing on the determination of other tanning agents in cosmetic products.

WHITENING COSMETIC PRODUCTS

There is other type of product closely related to sunscreen products and to the aforementioned tanning products, but their function is completely contrary to the latter. Whitening products, also called skin-bleaching products, are commercial preparations containing chemicals that produce a whitening effect on the skin, by interfering in the biosynthesis of melanin by different mechanisms (Cabanes *et al.*, 1994; Briganti *et al.* 2003; Petit and PiØrard, 2003). In the EU, they are considered as cosmetics, whereas in US they are

considered as over-the-counter (OTC) drugs, and in Japan they are considered as quasi-drugs (see Section 1.1). These products are very popular in oriental countries, where people consider light skin as beautiful, as opposed to westerners, who prefer tanned skin.

Usually, skin-bleaching products may also contain peeling chemicals, such as α -hydroxyacids (glycolic, lactic or malic acids) or β -hydroxyacids (salicylic acid) to improve their effectiveness, since these chemicals remove the dead skin cells, making the task of the whitening agents easier (Ghadishah and Gorchynski, 2002; Bernett and Herderson, 2003; Monheit, 2004). Also sunscreen agents are added to protect users skin from sunlight to avoid tanning (Piamphongsant, 1998).

As in tanning products, there are no positive lists for the active ingredients they contain. Nevertheless, different chemicals with antioxidative properties have been attributed to cause a skin-bleaching phenomenon and they can be read about elsewhere. It is also worth mentioning that some of the whitening agents listed below may also have other functions than whitening the skin, such as antioxidant, emollient, chelating and/or buffering properties.

So, the most popular compounds used as whitening agents are arbutin (ARB), ascorbic acid (AA), azelaic acid (AZA), hydroquinone (HQ) (and its monomethyl (HQMM), monoethyl (HQME) and monobenzyl (HQMB) ethers), kojic acid (KA), phytic acid (PA) and retinoic acid (RA) among others (see Figure 3.3.1). Owing to its labile oxidative properties, KA is recently added to cosmetics by means of its dipalmitic ester, that is, as kojic dipalmitate (KDP). The same happens with AA, for which it is usual to find as ascorbyl palmitate (AP), ascorbyl dipalmitate (ADP), ascorbyl stearate (AS), magnesium (or sodium) ascorbyl phosphate (MAP, SAP), and more recently as ascorbyl glucoside (AG). Moreover, it should be mentioned that these derivatives change the solubility properties of the parent compound, which could be interesting in order to formulate new preparations. Plant extracts, like *Arctostaphylos uva ursi* and *Arbutus unedo* extracts that contain ARB have also been used. Mercury-containing cosmetic preparations have been used for years as skin-bleaching agents in US, but nowadays mercury is no longer permitted as such, because of the known hazards and its questionable efficacy as a skin-bleaching agent. Nor does the EU allow the use of mercury compounds for this purpose.

Special attention has to be paid to HQ, since it is the only FDA approved chemical in skin-bleaching OTC products (at concentration ranging from 1.5 to 2%) according to the

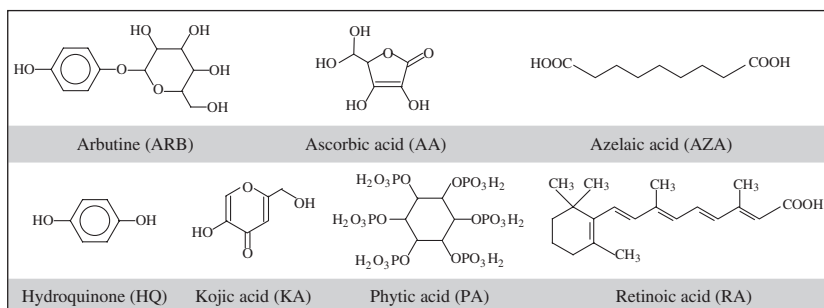


Figure 3.3.1 Some of the most commonly whitening agents used in cosmetics.

Tentative Final Monograph published for skin-bleaching products (FR, 1982), whereas this compound is not allowed in the EU framework as a bleaching agent because of its harmful side-effects (see further on) since the 24th adaptation (Commission Directive 2000/6/EC) of the EU Cosmetics Directive came into effect. Since then, under the EU Cosmetics Directive, it is allowed to be used only as hair-dyeing agent or in artificial nail systems under strict conditions of use. However, it may be used under medical prescription for treatment of skin spots, where these hydroquinone-based products are considered as pharmaceuticals instead of cosmetics. HQMM is also allowed by the EU Cosmetics Directive to be used in artificial nail systems under strict conditions of use, whereas HQME and HQMB are forbidden in cosmetic products. In Japan, the use of HQMB is also forbidden for cosmetic use (MHW, 2000).

RA is not allowed in the EU framework either.

Many dermatological side-effects and carcinogenic properties have been attributed to the use of HQ (Joseph *et al.*, 1998; Do Ceu Silva *et al.*, 2003; Gaskell *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006). Dermatitis has also been attributed to topical application of RA (Nordqvist and Mehr, 1977; Tosti *et al.*, 1992). KA has also been found to cause certain allergenic properties (Nakagawa *et al.*, 1995), and AZA as well (Fernández, 2000), although to a lesser extent than the aforementioned cases.

Those products intended to treat skin diseases such as brown spots called chloasma or melasma are excluded from the present book, although these products usually contain the same whitening agents at a higher concentration, since the aim of this book is to deal with cosmetic products.

Determination of whitening agents

Analytical methods to assure the compliance with different regulations are necessary. To our knowledge, there is only one official analytical method for controlling whitening agents in cosmetics in the EU framework (Commission Directive 95/32/EC). This method was compiled later by the European Commission in a compilation book (European Commission, 1999) and was validated by Borremans *et al.* (1999). The aforementioned method focuses on the determination of HQ and its methyl, ethyl and benzyl ethers (see Section 2.1). The method is based on their identification by means of thin-layer chromatography (TLC), followed by their quantitative determination using LC with UV/VIS detection, where the sample is extracted with a water/methanol mixture under heating. However, if a sample contains parabens, results obtained using this method could be inaccurate because of the interference that these compounds could cause. Nevertheless, according to the United States Pharmacopeia (2006), HQ can be determined by means of titration with cerium sulphate using diphenylamine as an indicator.

No other official methods have been published in either the EU framework or US and Japan frameworks. Thus, it is obvious that there is a need to develop analytical methods for controlling whitening agents in cosmetic products (or in OTC products or quasi-drugs, as are called in US and Japan, respectively). A bibliographic search updated to June 2006, using analytical chemistry databases, revealed almost 30 publications focusing on the analysis of these types of products. Table 3.3.1 shows a chronological summary of these

Table 3.3.1

Published papers until June 2006 on whitening agent s determination in cosmetic products (chronological order).

Authors	Target whitening agents ^a	Type of matrix	Sample preparation ^b	Analytical technique ^b
Herpol-Borremans and Masse (1986)	HQ, HQMB, HQME, HQMM			LC-UV/VIS, C ₁₈ column at 36 °C with isocratic MeOH:H ₂ O as mobile phase
Firth and Rix (1986)	HQ	Creams		LC-UV/VIS, C ₁₈ column with isocratic MeOH:H ₂ O as mobile phase
Gagliardi <i>et al.</i> (1987)	HQ, HQDM, HQMB, HQMM, HQMP, HQMPH	Creams	Sample is dissolved in MeOH, heated at 50 °C and centrifuged	LC-UV/VIS, C ₁₈ column with isocratic MeCN:H ₂ O as mobile phase
Teglia (1989)	ARB, HQ			LC-UV/VIS, C ₁₈ column
Luckewicz and Saccaro (1990)	ADP	Powders		DSC
Sakodiskaya <i>et al.</i> (1992)	HQ, HQDM, HQMB, HQMM, HQMP, HQMPH	Creams	Sample is mixed with MeOH:water mixture and vortexed by heating. Finally, filtered	MEKC
Lien <i>et al.</i> (1993)	ADP	Powders	Sample is dissolved in EtOH	LC-UV/VIS, C ₁₈ column with isocratic MeOH:40% acetic acid as mobile phase
Gatti <i>et al.</i> (1995)	AZA	Lotions and powders	Sample is dissolved in MeOH, centrifuged and filtered if necessary, and further diluted with H ₂ O. An aliquot is derivatized with 2-bromoacetyl-6-methoxynaphthalene	LC-FL, C ₁₈ column at 35 °C with isocratic MeCN:MeOH:THF:H ₂ O as mobile phase
Semenzato <i>et al.</i> (1995)	MAP	Creams	Sample is diluted with THF:0.3 M phosphate buffer pH 4 mixture. After homogenization, dilutions are made with phosphate buffer	LC-UV/VIS, NH ₂ column with MeCN:0.3 M phosphate buffer pH 4 as mobile phase

(Continued)

Table 3.3.1 (Cont.)

Authors	Target whitening agents ^a	Type of matrix	Sample preparation ^b	Analytical technique ^b
Wang (1995) Scalia <i>et al.</i> (1997)	HQ, HQDM, HQMB AZA	Creams	Sample is submitted to SPE with SAX column	DPV, using carbon paste electrode SPE+LC-UV/VIS, C ₁₈ column with MeCN:phosphate buffer as mobile phase
Sottofattori <i>et al.</i> (1998)	AP, MAP (different preservatives were also determined)	Creams	Sample is mixed with THF:0.025 M phosphate buffer pH 3.5 mixture until a homogeneous suspension is obtained	LC-UV/VIS, CN column with gradient MeOH:0.025 M phosphate buffer pH 3.5 as mobile phase
Shih and Zen (1999)	KA	Creams and lotions	Creams are dissolved in water and filtered, next an aliquot is mixed with buffer pH 10. Lotions are directly mixed with buffer	DPV, using screen-printed carbon electrode
Shih and Zen (2000)	ARB	Creams	Cream sample is dissolved in water, and diluted with ammonium buffer pH 10	DPV, using clay-coated screen-printed electrode
Desiderio <i>et al.</i> (2000)	HQ, HQDM, HQMB, HQMM, HQMP, HQMPH	Creams	Sample is mixed with MeOH:water mixture and vortexed by heating. Finally, filtered	CEC-DAD, C ₁₈ capillary column at 25 °C and MeCN:20 mM ammonium acetate buffer pH 6 as running buffer
Vieira and Fatibello-Filho (2000)	HQ	Creams	Sample is dissolved in MeOH. An aliquot is transferred to measurement cell	CV, sweet-potato tissue modified paraffin/graphite electrode in MeOH:phosphate buffer pH 7 containing 0.1 M TBAB and 1 mM H ₂ O ₂

Fatibello-Filho and Vieira (2000)	HQ	Creams	Sample is dissolved in MeOH. An aliquot is transferred to measurement cell	CV, sweet potato tissue modified stearic acid/graphite electrode in MeOH containing H ₂ O ₂
Masse <i>et al.</i> (2001)	ARB, KA	Creams	Sample is dispersed in MeCN, sonicated and centrifuged (or filtered)	LC-UV/VIS, Diol column with MeCN:0.05 M phosphate buffer pH 2.5 as mobile phase (TLC used for identification purposes)
Shih (2001)	KA, MAP	Creams and lotions	Sample is extracted with water and filtered	LC-DAD, C ₁₈ microbore column with 0.5 mM TBAB and 50 mM phosphate buffer pH 5 containing 5% MeOH as eluent
Zhang <i>et al.</i> (2002)	HQ		Samples are mixed with EtOH and sonicated	GC-MS
Chang and Chang (2003)	AA, ARB, MAP	Creams, gels and lotions	Sample is mixed with water and sonicated at 25 °C. Then it is filtered and deoxygenated by N ₂	LC-UV/VIS, C ₁₈ column with 5 mM phosphate buffer pH 2.5 containing 10 mM TBAH and 10% MeOH as mobile phase
Rueda <i>et al.</i> (2003)	HQ	Creams		FI-AMP, graphite electrode
Huang <i>et al.</i> (2004)	AG, ARB, HQ, KA, MAP		Sample is extracted with 0.05 M phosphate buffer pH 2.5	LC-UV/VIS, C ₁₈ column with MeOH:0.05 M phosphate buffer pH 2.5 as mobile phase
Liu (2004)	ARB, KA, MAP			LC
Xie <i>et al.</i> (2005)	KA		Sample is extracted with 40% aq. MeOH by sonication	LC-UV/VIS, C ₁₈ column with MeOH:0.01 M phosphate buffer containing 1 mM TBAB as mobile phase
Lin <i>et al.</i> (2005)	ARB	Creams and lotions	Sample is diluted with water. After mixing, it is submitted to dialysis vial and injected on-line	MD-LC-UV/VIS, PFP column with MeOH:0.02 M phosphate buffer pH 5.5 as mobile phase

(Continued)

Table 3.3.1 (Cont.)

Authors	Target whitening agents ^a	Type of matrix	Sample preparation ^b	Analytical technique ^b
L pez-Garc a <i>et al.</i> (2005)	HQ	Creams and gels	Method 1: Sample is dissolved in mobile phase Method 2: Sample is dissolved in 0.05 M H ₂ SO ₄	Method 1: LC-UV/VIS, C ₁₈ column at 25 °C with MeOH:H ₂ O as mobile phase Method 2: DUVS using 1st derivative spectra

^aKey abbreviation: AA, ascorbic acid; ADP, ascorbyl dipalmitate; AG, ascorbyl glucoside; AP, ascorbyl palmitate; ARB, arbutin; AZA, azelaic acid; HQ, hydroquinone; HQDM, hydroquinone dimethyl ether; HQMB, hydroquinone monobenzyl ether; HQME, hydroquinone monoethyl ether; HQMM, hydroquinone monomethyl ether; HQMP, hydroquinone monopropyl ether; HQMPH, hydroquinone monophenyl ether; KA, kojic acid; MAP, magnesium ascorbyl phosphate.

^bSymbol – means coupling between techniques, and symbol + means sequentially applied techniques. Key abbreviation: AMP, amperometry; C₁₈, octadecylsilica; CEC, capillary electrochromatography; CN, cyanopropyl silica; CV, cyclic voltammetry; DAD, diode-array detector; DPV, differential-pulse voltammetry; DSC, differential scanning calorimetry; DUVS, derivative ultraviolet spectrometry; FI, flow injection; FL, fluorimetry; GC, gas chromatography; LC, liquid chromatography; MD, microdialysis; MeCN, acetonitrile; MEKC, micellar electrokinetic chromatography; MeOH, methanol; MS, mass spectrometry; NH₂, aminopropyl silica; PFP, perfluorinated phenyl phase; SAX, strong anion exchanger; SPE, solid phase extraction; TBAB, tetrabutyl ammonium bromide; TBAH, tetrabutyl ammonium hydroxide; THF, tetrahydrofuran; TLC, thin layer chromatography; UV/VIS, ultraviolet/visible spectrometry.

published methods. It should be emphasized that the non-English publications have been reviewed on the basis of their respective abstracts, and thus, some data could be incomplete as shown by some blank cells in the aforementioned table.

On having a quick look at Table 3.3.1, the reader will realize that some of the above-mentioned whitening agents have not been determined in any of the published methods. Also, one notes the absence of a general methodology focused on determining all the currently used whitening agents worldwide.

As shown in Table 3.3.1, whitening agents have been determined by means of different analytical techniques.

The most frequently used analytical technique for their determination has been LC with an UV/VIS spectrometry detector, either as a single wavelength or as a diode array detector (DAD). Nevertheless, a paper where the determination of AZA is carried out by means of a fluorimetric (FL) detector has also been published (Gatti *et al.*, 1995). With regard to the columns employed, octadecylsilica (C₁₈) phase is the favourite option, although papers where other stationary phases are used have also been reported, as is the case of Semenzato *et al.* (1995) who employed an aminopropyl (NH₂) bonded silica column to determine MAP, and Sottofattori *et al.* (1998) who employed a cyanopropyl (CN)-bonded silica column to determine AP and MAP. Both papers justify the use of these columns by the fact that MAP, which is a highly polar compound, is not properly retained in other less-polar columns like C₁₈. The same justification is given by Masse *et al.* (2001), who employed a diol-based column to determine ARB and KA, and presumably the same reason made Lin *et al.* (2005) use a perfluorinated phenyl (PFP) phase to determine ARB.

Other chromatography-related techniques such as GC (Zhang *et al.*, 2002), micellar electrokinetic chromatography (MECK) (Sakodinskaya *et al.*, 1992) and capillary electrophoresis (CEC) (Desiderio *et al.*, 2000) have been much less used.

Other techniques, like electroanalytical ones, have also focused on whitening agent determination. Likewise, differential pulse voltammetry (DPV) by using carbon paste (Wang, 1995), screen-printed carbon (Shih and Zen, 1999) or clay-coated screen-printed electrodes (Shih and Zen, 2000) as working electrodes have been proposed for the determination of different whitening agents (see Table 3.3.1). Cyclic voltammetry (CV) based on sweet-potato tissue modified paraffin/graphite (Vieira and Fatibello-Filho, 2000) or stearic acid/graphite (Fatibello-Filho and Vieira, 2000) electrodes (where peroxidase present in this tissue catalyses an oxidation process) has been applied exclusively to HQ. In addition, Rueda *et al.* (2003) optimized a flow injection (FI) system with amperometric detection for HQ determination.

The use of derivative ultraviolet spectrometry (DUVS) was proposed to determine HQ in creams and gels, avoiding interferences from the matrix that direct ultraviolet spectrometry caused (Lpez-Garc a *et al.*, 2005).

Finally, a thermoanalytical technique like differential scanning calorimetry (DSC) has been applied to ADP determination (Luckewicz and Saccaro, 1990).

With regard to sample preparation, no complex operations are necessary. The sample is usually dissolved in a suitable solvent, or analytes are leached from the matrix, by means of gently mixing or sonication. Centrifugation or filtration can be employed to obtain clear solutions. Only Scalia *et al.* (1997) proposed a methodology based on solid-phase extraction (SPE) procedure by using strong anion exchange (SAX) phases.

Only in the case of Gatti *et al.* (1995), an additional derivatization step was necessary to transform AZA in a fluorescence derivative to be detected by FL detector.

SUMMARY

There are no positive lists for tanning nor whitening agents in any of the three main markets dealing with cosmetic products, that is, EU, US and Japan (in US, whitening agents are considered as OTC drugs, whereas they are considered as quasi-drugs in Japan); however, the use of some of them is restricted depending on the legislation.

On the other hand, certain undesirable effects have been found to be caused by some of these agents, especially hydroquinone.

However, although the analytical control of these products seems necessary, no official analytical methods have been published to determine most of these chemicals. Only the determination of hydroquinone and some of its ethers is covered by a method published by the European Commission.

Nevertheless, an overview of the background shows that there are several published papers focusing on their determination, although most of them do not deal with all the chemicals involved.

REFERENCES

- Ashwood-Smith M. J., G. A. Poulton, M. Baker and M. Mildenberger, 1980, *Nature*, 285, 407.
- Autier P., J. F. Dore, J. P. Cesarini and P. Boyle, 1997, *Ann. Oncol.* 8, 435.
- Baruffini A., G. Caccialanza and C. Gandini, 1981, *Farmaco, Ed. Practica* 36, 424.
- Bernett M. L. and R. L. Herderson, 2003, *Curr. Probl. Dermatol.* 15, 43.
- Bettero A. and C. A. Benassi, 1981, *Farmaco, Ed. Practica* 36, 140.
- Bettero A. and C. A. Benassi, 1983, *J. Chromatogr.* 280, 167.
- Blaas W., M. Kellert, L. Krull, M. Schramm and R. Weber, 1985, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 180, 230.
- Borremans M., J. De Beer and L. Goeyens, 1999, *Chromatographia* 50, 346.
- Briganti S., E. Camera and M. Picardo, 2003, *Pigment Cell Res.* 16, 101.
- Brown D. A., 2001, *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.* 63, 148.
- Cabanes J., S. Chazarra and F. Garciacarmona, 1994, *J. Pharm. Pharmacol.* 46, 982.
- Chang M. L. and C. M. Chang, 2003, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33, 617.
- Commission Directive 95/32/EC of 7 July 1995, *Relating to Methods of Analysis Necessary for Checking the Composition of Cosmetic Products.*
- Commission Directive 2000/6/EC of 29 February 2000, *Adapting to Technical Progress Annexes II, III, VI and VII to Council Directive 76/768/EEC On the Approximation of the Laws of the Member States Relating to Cosmetic Products.*
- Council Directive 76/768/EEC of 27 July 1976, *On the Approximation of the Laws of the Member States Relating to Cosmetic Products*, and its successive amendments and adaptations. <http://europa.eu.int/comm/enterprise/cosmetics/html/consolidated_dir.htm>
- Cumpelik B. M., 1982, *Cosmet. Toilet.* 97, 67.
- Desiderio C., L. Ossicini and S. Fenali, 2000, *J. Chromatogr.* A 887, 489.
- Do Ceu Silva M., J. Gaspar, I. Duarte Silva and D. Leao, 2003, *Mutagenesis* 18, 491.
- European Commission, 1999, *The Rules Governing Cosmetic Products in the European Union*, Methods of Analysis, vol. 2, European Commission, Bruxelles. <http://europa.eu.int/comm/enterprise/cosmetics/pdf/vol_2en.pdf>

- Fatibello-Filho O. and I. C. Viera, 2000, *Fresenius' J. Anal. Chem.* 368, 338.
- FDA Food and Drug Administration, 2003, *Sunscreen, Tanning Products and Safety*.
<<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/cos-220.html>>
- FDA Food and Drug Administration, *Code of Federal Regulations*, Title 21, Parts 70 82 for Colorants; Parts 330 360 for OTC drugs; Parts 700 740 for Cosmetics.<<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm>>
- Feroli V, F. Vezzalini, C. Rustichelli and G. Gamberini, 1995, *Chromatographia* 41, 61.
- Fernández J. M., 2000, *Acné*, Grupo Aula MØdica S.L., Madrid.
- Firth J. and I. Rix, 1986, *Analyst*, 111, 129.
- FR Federal Register, 1982, *Skin bleaching drug products for over-the-counter human use*, Tentative Final Monograph, 47, 39108.<<http://www.gpoaccess.gov/fr/index.html>>
- Fu J. M., S. W. Dusza and A.C. Halpern, 2004, *J. Am. Acad. Dermatol.* 50, 706.
- Gagliardi L., A. Amato, G. Cavazzutti, F. Chimenti, A. Bolasco and D. Tonelli, 1987, *J. Chromatogr.* 404, 267.
- Galensa R. and B. Schuster, 1985, *Dtsch. Lebensm. Rundsch.* 81, 273.
- Gaskell M., K. I. McLuckie and P.B. Farmer, 2005, *Carcinogenesis* 26, 673.
- Gatti R., V. Andrisano, A. M. Di Pietra and V. Cavrini, 1995, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 13, 589.
- Ghadishah D. and J. Gorchynski, 2002, *J. Emerg. Med.* 22, 353.
- Herpol-Borremans M. and M. O. Masse, 1986, *Int. J. Cosmet. Sci.* 8, 203.
- Hild J., 1993, *Dtsch. Lebensm. Rundsch.* 89, 48.
- Huang S. C., C. C. Lin, M. C. Huang, K. C. Wen, 2004, *Yaowu Shipin Fenxi* 12, 13.
- Jermann R., M. Toumiat and D. Imfeld, 2002, *Int. J. Cosmet. Sci.* 24, 35.
- Joseph P., A. J. Klein-Szanto and A. K. Jaiswal, 1998, *Br. J. Cancer* 78, 312.
- Li X. Y., Z. X. Zhuang, J. J. Liu, H. Y. Huang, Q. H. Wei and X. H. Yang, 2006, *Toxicol. Mech. Methods* 16, 1.
- Lien M. H., B. C. Huang and M. C. Hsu, 1993, *J. Chromatogr.* 645, 362.
- Lin C. H., S. L. Wu and Y. L. Huang, 2005, *J. Chromatogr. B* 829, 149.
- Liu S., 2004, *Seppu* 22, 660.
- Lopez-García P., M. I. Rocha Miritello Santoro, E. R. M. Kedor-Hackman and A. K. Singh, 2005, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 39, 764.
- Luckewicz W. and R. Saccaro, 1990, *J. Soc. Cosmet. Chem.* 41, 359.
- Masse M. O., V. Duvallet, M. Borremans and L. Goeyens, 2001, *Int. J. Cosmet. Sci.* 23, 219.
- Matissek R. and B. Harper, 1984, *Dtsch. Lebensm. Rundsch.* 80, 375.
- MHW Ministry of Health and Welfare, 2000, Notification No. 331/2000, *Standards for Cosmetics*.
<<http://www.mhlw.go.jp/english/topics/cosmetics/index.html>>
- Monfrecola G. and E. Prizio, 2001, *Comprehensive Series in Photosciences vol. 3, Sun Protection in Man: Self Tanning*, Ed. P. U. Giacomoni, Elsevier, Amsterdam.
- Monheit G.D., 2004, *Skin Therapy Lett.* 9, 6.
- Morren M., A. Dooms-Goossens, M. Heibuchel, F. Sente and M.C. Damas, 1991, *Contact Dermatitis* 25, 326.
- Nakagawa M., K. Kawai and K. Kawai, 1995, *Contact Dermatitis* 32, 9.
- Nordqvist B. C. and K. Mehr, 1977, *Contact Dermatitis* 3, 55.
- Oberleithner J. and G. Wolff, 1981, *Parfum. Kosmet.* 62, 233.
- Pawelek J. M., 1998, *Drug Cosmet. Indust.* 163, 28.
- Petit L. and G. E. PiØrard, 2003, *Int. J. Cosmet. Sci.* 25, 169.
- Piamphongsant T., 1998, *Int. J. Dermatol.* 37, 897.
- Pollak F. G. and B. Lorant, 1962, *Seifen Oele Fette Wachse* 99, 399.
- Quercia V, N. Pierini and L. Schreiber, 1979, *Relata Technica* 11, 18.
- Rueda M. E., L. A. Sarabia, A. Herrero and M.C. Ortiz, 2003, *Anal. Chim. Acta* 479, 173.
- Sakodinskaya I. K., C. Desiderio, A. Nardi and S. Fanali, 1992, *J. Chromatogr.* 596, 95.
- Scalia S., A. Bianchi, S. Villani and M. Guarneri, 1997, *Pharmazie* 52, 929.
- Semenzato A., R. Austria, C. Dall Aglio and A. Bettero, 1995, *J. Chromatogr. A* 705, 385.
- Shih Y., 2001, *J. AOAC Int.* 84, 1045.
- Shih Y. and J. M. Zen, 1999, *Electroanalysis* 11, 229.

- Shih Y. and J. M. Zen, 2000, *Anal. Chim. Acta* 412, 63.
- Sottofattori E., M. Anzaldi, A. Balbi and G. Tonello, 1998, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 18, 213.
- Teglia A., 1989, *Cosmet. Toilet. Ed. Ital.* 10, 6.
- Tosti A., L. Guerra, R. Morelli, B.M. Piraccini, 1992, *Contact Dermatitis* 26, 276.
- United States Pharmacopeia 29th Revision and National Formulary 24th Revision, 2006, The United States Pharmacopeial Convention Inc., Rockville.<<http://www.usp.org>>
- Verger G., 1983, *Parfums, Cosmetiques, Aromes* 51, 63.
- Vieira I. C. and O. Fatibello-Filho, 2000, *Talanta* 52, 681.
- Wang L. H., 1995, *Analyst* 120, 2241.
- Xie H. L., Y. G. Tan, B. N. Hu and H. X. Hu, 2005, *Huaxue Shiji* 27, 153.
- Zhang W. Y., Z. J. Yang, L. Liu and Y. Li, 2002, *Fenxi Kexue Xuebao* 18, 493.

A rapid and reliable size-exclusion chromatographic method for determination of kojic dipalmitate in skin-whitening cosmetic products

Angel Balaguer^a, Amparo Salvador^a, Alberto Chisvert^{b,*}

^a *Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad de Valencia, 46100 Burjassot, Valencia, Spain*

^b *Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Ciencias, Universidad de Alicante, P.O. Box 99, E-03080 Alicante, Spain*

Received 24 July 2007; received in revised form 31 October 2007; accepted 8 November 2007

Available online 17 November 2007

Abstract

A size-exclusion chromatographic method has been developed to determine the relatively novel skin-whitening agent called kojic dipalmitate (KDP) in skin-whitening cosmetic products.

Preliminary experiments were carried out in order to select the solvent for standard and sample solution, and also for mobile phase composition. A PLGel Mixed-D (polystyrene/divinylbenzene co-polymer) column and isocratic mobile phase of pure tetrahydrofuran (at 1.5 mL min⁻¹ flow rate) were used. Detection was carried out by means of an UV/vis spectrometry detector set at 248 nm.

A study of interferences reveals that KDP can be determined without interferences coming from cosmetic matrices. Most other cosmetic ingredients usually employed in skin-whitening cosmetic products, such as other whitening agents and common UV filters, do not interfere.

The accuracy and precision of the proposed method was tested by the analysis of six laboratory-made and five commercial skin-whitening cosmetic samples.

The sensitivity and limit of detection (3 µg mL⁻¹) obtained are suitable for the analysis of this type of samples. The chromatographic run takes less than 8 min to complete.

All these features make the method easy to apply to quality control in the cosmetic industry.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Kojic dipalmitate; Skin-bleaching agent; Skin-whitening agent; Cosmetic; Size-exclusion chromatography

1. Introduction

The appearance of brown-spots on skin, as a consequence of hyperpigmentation, is one of the most common aesthetic problems [1]. This skin disorder is a consequence of melanin excess, produced by hyperactivity of melanocytes, which are the cells responsible for skin pigmentation. This could be caused by over-exposure to solar radiation, ageing, hormone disorders, genetic predisposition, etc. [2,3].

This disorder can be reduced with cosmetic treatment based on the use of so-called skin-whitening (also referred to as skin-bleaching) cosmetic products [4], although the most serious cases could require medical assistance. These products contain different chemicals called skin-whitening (or skin-bleaching)

agents that produce a whitening effect on the skin, based on the inhibition that they produce in melanin biosynthesis via different mechanisms [4–6].

Most of the commercially available skin-whitening cosmetic products found elsewhere are based on the use of the active called kojic acid, whose skin-whitening efficacy has been proven [5,7]. However, due to its labile oxidative properties, which can be accelerated in presence of light and heat [8,9], recently, kojic acid is added to cosmetics by means of its dipalmitic ester, that is, as kojic dipalmitate (KDP) (see Fig. 1), which is hydrolyzed by means of esterases located in skin cells producing an *in situ* liberation of kojic acid [10].

Although no adverse effects have been reported concerning cosmetics containing KDP, it should be controlled in this type of products in order to assure their efficacy. However, as with other cosmetic ingredients, there are no official analytical methods; moreover, in contrast to other cosmetic ingredients, no published papers have been found reporting KDP determination,

* Corresponding author. Tel.: +34 96 590 34 00x3117; fax: +34 96 590 35 27.
E-mail address: alberto.chisvert@ua.es (A. Chisvert).

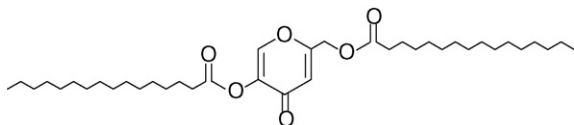


Fig. 1. Molecular structure of kojic dipalmitate (KDP).

as recently reviewed by the authors of this article [11], probably owing to the fact that it is a very recent cosmetic ingredient. Therefore, analytical methods to determine KDP must be developed for accurate and precise determination of this cosmetic ingredient, thus assuring the efficacy of this type of cosmetic products. Furthermore, it should be borne in mind that cosmetic industry demands rapid analytical methods.

In this respect, the aim of this paper focuses on developing a reliable and rapid analytical method based on liquid chromatography (LC), which is able to carry out the determination of KDP in cosmetic products. The method is based on the use of size-exclusion chromatography (SEC) with ultraviolet/visible spectrometry (UV/vis) detection.

2. Experimental

2.1. Apparatus

A Hitachi LC system equipped with a Hitachi L-7100 high-pressure pump and a Hitachi L7420 diode array detector (DAD) (Tokyo, Japan) was employed. The injections were carried out by means of a 7725i Rheodyne® (Rohnert Park, CA, USA) manual injector equipped with a 20 μ L loop. A personal computer equipped with a LC System Manager software connected to the LC system was used to process all chromatographic data.

A PLGel Mixed-D (polystyrene/divinylbenzene co-polymer) (300 mm \times 7.5 mm i.d., 5 μ m particle size) analytical column from Polymer Laboratories (Church Stretton, Shropshire, UK) and a PLGel Guard (50 mm \times 7.5 mm i.d. 5 μ m particle size) guard column made up of the same stationary phase were used in the proposed method.

An ultrasonic water bath from Torrecilla (Valencia, Spain) was used to improve KDP extraction.

2.2. Reagents and samples

Kojic dipalmitate (KDP) 98% from Chengdu Wonho Biology Engineering Co., Ltd. (Mainland, China) was used as standard.

LC-grade tetrahydrofuran (THF) from Scharlau Chemie (Barcelona, Spain) was used as solvent to prepare standard and sample solutions and mobile phase.

Five commercial samples (A–E) purchased in local markets containing different amounts of KDP were analysed. They were from different laboratories: Sesderma S.L. (Rafelbunyol, Valencia, Spain), Interpharma (Sta. Coloma de Gramanet, Barcelona, Spain), SVR Laboratoires (Bondoufle, France) and Industrial Farmacéutica Cantabria (Santander, España).

Six laboratory-made skin-whitening creams (LM1–LM6) containing different amounts of the target skin-whitening agent (1.52%, 0.49%, 2.16%, 2.66%, 1.05% and 2.84%, respectively)

were prepared in our laboratory. These formulations also contained different usual cosmetic ingredients employed in this type of cosmetics (emollients, surfactants, smoothing agents, UV filters, moisturizing agents, preservatives) (see Table 1), which were of cosmetic-grade and were provided by Guinama S.L. (Valencia, Spain).

2.3. Proposed method

Each sample was homogenized and, in triplicate, 0.02–0.07 g was weighed into a 10 mL volumetric flask, and dissolved in 5 mL approx. of THF. In order to accelerate the solubility, an ultrasonic water bath was used for 10 min. Next, the mixture was left to reach room temperature and diluted to the mark with the same solvent. Finally, the solution was filtered through a 0.45 μ m nylon membrane filter.

A 1000 μ g mL⁻¹ KDP stock standard solution was prepared in the same solvent as samples, and adequately diluted using the same solvent to prepare a set of standard solutions ranging from 20 to 100 μ g mL⁻¹.

Both sample and standard solutions were injected into the LC system through a 0.45 μ m nylon membrane filter, and each run was performed by using THF at 1.5 mL min⁻¹ as mobile phase. The UV detection was carried out at 248 nm.

3. Results and discussion

3.1. Preliminary studies

In order to select a suitable solvent to dissolve and dilute the analyte, 11 solvents of different polarity were assayed; namely heptane, dichloromethane, ethyl acetate, acetonitrile, tetrahydrofuran (THF), isobutyl methyl ketone, dimethylformamide, isopropanol, ethanol, methanol and water.

Only dichloromethane and THF were suitable for KDP solubilization. Samples were soluble in both solvents.

The addition of water to solutions of KDP in these two solvents was also assayed. Water is not miscible with dichloromethane, but when water was added (10% approx.) to THF, KDP precipitation occurred.

As its toxicity levels are lower, THF was chosen for further experiments.

Pure THF was chosen as mobile phase in order to avoid KDP precipitation inside the LC system. When reversed-phase chromatography was assayed, by means of a LiChrospher® RP-18 (250 mm \times 4 mm i.d., 5 μ m particle size) column, KDP was not retained in the column, since pure THF (at 1 mL min⁻¹ flow rate) has a considerable elution strength for reversed-phase chromatography, and thus, KDP eluted at dead time jointly with the rest of the unretained components of the sample, which interfered in the determination. Therefore, this chromatographic retention mechanism was rejected.

Thus, SEC (size-exclusion chromatography) was tested using a PLGel Mixed-D (polystyrene/divinylbenzene co-polymer) column, giving suitable retention by employing THF at 1 mL min⁻¹ flow rate. Owing to the large molecular structure of KDP (see Fig. 1) compared with other usual ingredients

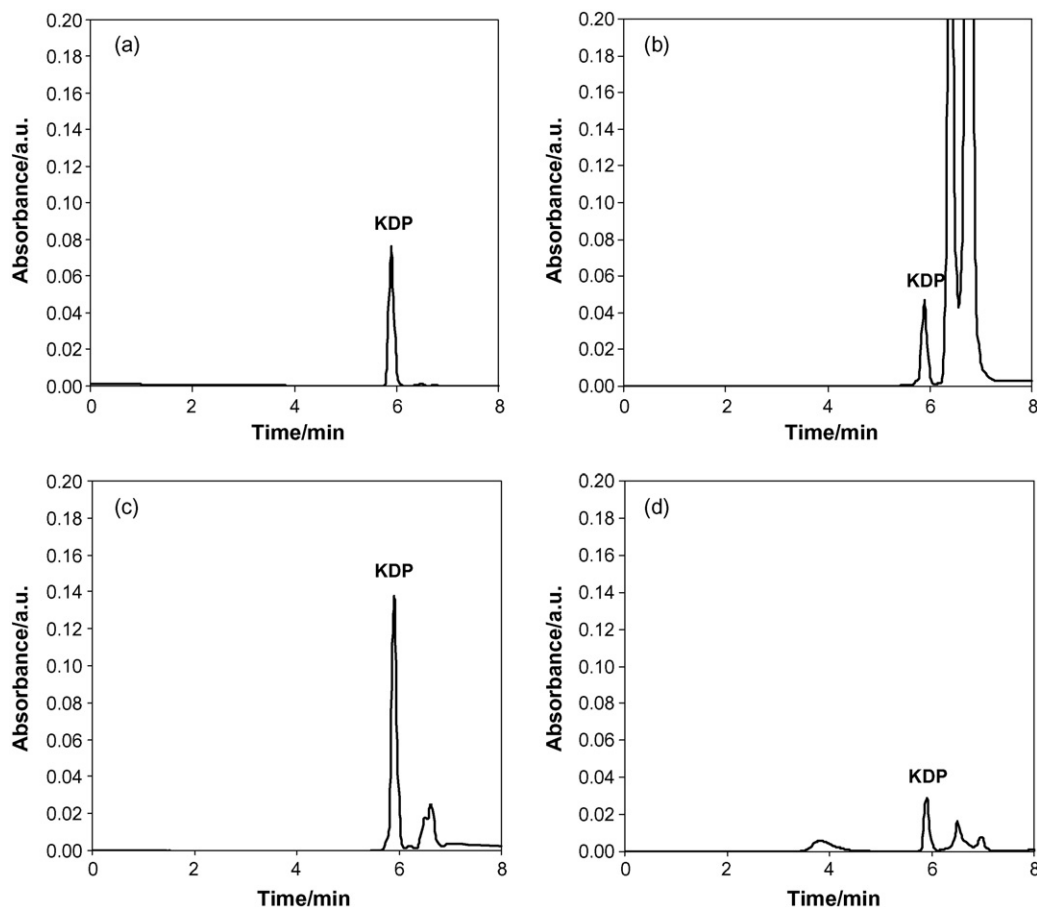


Fig. 2. Chromatograms of (a) KDP $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ standard solution, (b) laboratory-made sample LM1, (c) laboratory-made sample LM3 and (d) commercial sample D, obtained by using the proposed method.

employed in skin-whitening cosmetic products containing KDP, they were separated effectively. This study is further described in Section 3.2.

The effect of flow rate was studied over the range $0.5\text{--}1.5 \text{ mL min}^{-1}$. Higher flow rates were not possible because they caused pump pressures over the safety limit. Obviously, KDP retention time decreased when flow rate increased, but in any case the separation from other assayed ingredients changed significantly. A flow rate of 1.5 mL min^{-1} was chosen, since it provided a retention time for KDP of 5.90 min approx. and a suitable run time analysis of less than 8 min, as shown in Fig. 2.

3.2. Study of interferences

Different compounds that may commonly be present in skin-whitening cosmetic products, and thus, could interfere in determining the target analyte, were assayed at the conditions selected in the proposed method.

Thus, seven other common skin-whitening agents were assayed, namely arbutine, hydroquinone, kojic acid, ascorbic acid, ascorbyl glucoside, ascorbyl phosphate (sodium salt) and ascorbyl palmitate. Three of them, namely ascorbic acid, ascorbyl glucoside, ascorbyl phosphate (sodium salt) were not soluble in THF owing to their water-solubility behaviour, and were retained in the filter step. The other four were eluted after KDP

(retention time of 5.90 min) (6.21, 6.50, 6.51 and 6.53 min approx.), as expected given the smaller molecular size, and did not interfere.

Furthermore, the presence of UV filters was assayed. These compounds are added to skin-whitening cosmetics to protect users' skin from sunlight to avoid tanning [12]. Thus, five water-soluble UV filters, namely disodium phenyldibenzimidazole tetrasulphonate, PABA (*p*-aminobenzoic acid), phenylbenzimidazole sulphonic acid, benzophenone-4 and PEG-25 PABA were tested. All of them eluted after KDP, owing to their smaller size, except PEG-25 PABA (i.e. polyoxyethylene ethyl-4-aminobenzoate), whose molecular structure is quite large, and which interfered in the determination of KDP. Moreover, 14 fat-soluble UV filters were assayed, namely benzophenone-3, isoamyl methoxycinnamate, 4-methylbencyliden camphor, octocrylene, ethylhexyl dimethyl PABA, ethylhexyl methoxycinnamate, butyl methoxydibenzoylmethane, homosalate, ethylhexyl salicylate, diethylhexyl butamido triazone, ethylhexyl triazone, drometrisole trisiloxane, bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine and polysilicone-15. All of them also eluted after KDP, except polysilicone-15, which eluted before KDP (5.04 min approx.), and diethylhexyl butamido triazone, ethylhexyl triazone and drometrisole trisiloxane which interfered in KDP determination.

Table 1
Composition in percentage terms of the analysed laboratory-made samples

Ingredient	Laboratory-made samples					
	LM1	LM2	LM3	LM4	LM5	LM6
Base o/w ^a	19.6	20.7	19.2	17.4	17.8	17.2
KDP	1.52	0.49	2.16	2.66	1.05	2.84
Dimethicone 350	5.1	5.2	5.1	5.0	5.3	5.4
Avocado pear oil	5.1	5.7	0	0	0	0
Wheat germ oil	0	0	5.2	5.2	0	0
Coconut oil	0	0	0	0	5.2	5.6
Aloe vera	0	0	0	0	0.8	0.5
Propylene glycol	5.2	5.3	4.9	5.0	5.0	5.4
Hydroviton ^{®b}	4.3	3.8	4.1	4.0	3.9	3.9
Phenonip ^{®c}	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Benzophenone-3 ^d	5.2	4.8	0	0	0	0
Butyl methoxydibenzoyl methane ^d	2.6	2.4	0	0	0	0
Ethylhexyl methoxycinnamate ^d	5.0	5.2	0	0	5.3	5.2
Ethylhexyl salicylate ^d	0	0	0	0	2.7	2.8
Glycolic acid	0	0	0	0	4.9	5.0
Lactic acid	0	0	1.3	1.4	0	0
Resorcinol	0	0	0.5	0.5	0	0
Arbutin ^e	0	0	2.4	2.2	0	0
Azelaic acid ^e	0	0	1.9	2.1	0	0
Kojic acid ^e	0	0	1.6	0.9	0	0
Phytic acid ^e	0	0	0	0	1.1	1.1
Hydroquinone ^e	0	0	0.9	1.0	0	0
Water	Up to 100	Up to 100	Up to 100	Up to 100	Up to 100	Up to 100

^a Base for production of oil/water emulsions, made up of fatty substances, such as myristyl myristate, cethyl alcohol, glyceryl laurate, cetearyl ethylhexanoate, isopropyl myristate, among others.

^b Moisturizing cosmetic preparation made up of urea, sodium chloride, glycerine, sodium lactate, allantoin, amino acids and water, among others.

^c Cosmetic preparation containing a mixture of preservatives such as: phenoxyethanol, methyl-, ethyl-, propyl-, butyl- and isobutylparaben.

^d Common UV filters combined with KDP in cosmetics.

^e Other cosmetic ingredients employed as skin-whitening agents.

Fortunately, these four UV filters, which coelute with KDP when the proposed method is used, have not been found mixed with KDP in the present commercial skin-whitening products. Nevertheless, this limitation should be taken into account for the analysis of further formulations.

3.3. Analytical figures of merit of the proposed method

The repeatability of the measurements was tested by injecting a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ KDP standard solution five times. Retention time and its standard deviation was 5.90 ± 0.01 min. Relative standard deviation (R.S.D.) in area was 0.9%. Results indicate suitable precision in both cases.

The upper linearity limit ($650 \mu\text{g mL}^{-1}$) was established by injecting standard solutions of KDP in THF (from 10 to $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$). Nevertheless, the working range was set from 20 to $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (number of calibration points, $N=5$), showing a calibration line such as $A_{\text{KDP}} = (6050 \pm 40)C_{\text{KDP}} - (0 \pm 2000)$; $R^2 = 0.99998$, where A_{KDP} is the KDP peak area expressed in $\mu\text{V s}$, C_{KDP} is KDP concentration expressed in $\mu\text{g mL}^{-1}$ and R^2 is the regression coefficient.

Thus, the sensitivity of the instrumental measurements estimated by means of the slope of the calibration line was 6050 ± 40 ($\mu\text{V s})/(\mu\text{g mL}^{-1})$.

The limit of detection estimated as $3s_{y/x}/b$ (where $s_{y/x}$ is the standard deviation of the calibration curve and b is the slope) was $3 \mu\text{g mL}^{-1}$, which is suitable for the analysis of this type of samples.

In order to evaluate the accuracy of the method, six laboratory-made skin-whitening cosmetic products containing known amounts of the analyte, whose composition is shown in Table 1, were analysed. Fig. 2 shows the chromatograms of laboratory-made samples LM1 and LM3. The results are shown in Table 2. The obtained R.S.D. in concentration values ranged from 0.1% to 2.5%, demonstrating precise results. The method has a low relative error (<4%), thus results are accurate. The data obtained using the proposed method (Y) were compared to the nominal values (X) by using a linear regression model.

Table 2
Results obtained in the analysis of six laboratory-made skin-whitening samples by using the proposed method

Sample	Real content (% w/w)	Found content $\pm s^a$ (% w/w)	Error (%)
LM1	1.52	1.46 ± 0.02	-3.9
LM2	0.49	0.490 ± 0.008	0.0
LM3	2.16	2.08 ± 0.01	-3.7
LM4	2.66	2.692 ± 0.002	1.2
LM5	1.05	1.028 ± 0.002	-2.1
LM6	2.84	2.81 ± 0.07	-1.1

^a Average values of three determinations \pm standard deviation (s).

Table 3
Results (and recoveries) obtained in the analysis of commercial skin-whitening cosmetic products by using the proposed method

Sample	Found content \pm s ^a (% w/w)	Recovery (%)
A	1.11 \pm 0.01	99 \pm 2
B	1.79 \pm 0.08	101 \pm 2
C	1.58 \pm 0.03	102 \pm 2
D	2.14 \pm 0.08	102 \pm 2
E	0.34 \pm 0.01	100 \pm 2

^a Average values of three determinations \pm standard deviation (s).

The equation obtained was: $Y = (1.00 \pm 0.02)X - (0.03 \pm 0.04)$; $R^2 = 0.998$; $N = 6$, where Y and X are expressed in % KDP (w/w). The theoretical t -value for a 5% significance level and $N - 2$ degrees of freedom is 2.78, and the experimental t -values for the slope and the intercept were 0.01 and 0.61, respectively, which statistically proves the accuracy of the proposed method.

Finally, the robustness was proven by analyzing the six laboratory-made samples with small changes in the mobile phase flow rate (± 0.1 ml min⁻¹) and in the monitoring wavelength (± 1 nm). The results were compared by an ANOVA test [13], showing the comparability for a 5% confidence level, and thus showing the robustness of the method.

3.4. Application of the proposed method to the analysis of commercial skin-whitening cosmetic products

The method was employed to determine the target skin-whitening agent in five commercial samples (data given in Table 3). A chromatogram obtained for one of these samples is shown in Fig. 2.

On the other hand, according to the results obtained, the R.S.D. in concentration is obviously in the same order as that obtained in the analysis of laboratory-made samples.

As no methods have been published for KDP determination, it was not possible to evaluate the accuracy of the obtained values, since the nominal values were unknown. Therefore, solutions of the five commercial samples were spiked with known amounts of the target analyte and the recoveries were evaluated. Excellent recoveries were obtained, as shown in Table 3.

4. Conclusions

A rapid and reliable analytical method to determine the relatively novel skin-whitening agent called kojic dipalmitate (KDP)

is proposed here for the first time. The method is based on size-exclusion chromatography with conventional UV/vis detection.

The chromatographic run takes less than 8 min to complete, with good resolution.

The study of interferences reveals that KDP can be determined without interferences coming from cosmetic matrices. Most of other cosmetic ingredients usually employed in skin-whitening cosmetic products, such as other whitening agents and common UV filters, do not interfere.

Thus, the proposed method has been proven accurate and precise, and its sensitivity and limit of detection are suitable for the analysis of this type of samples. It has been validated by analysing laboratory-made and commercial skin-whitening products.

All these features make the method easy to apply to quality control in the cosmetic industry.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support of the Spanish Government (Project CTQ2006-00296), especially A. Balaguer for his predoctoral grant.

References

- [1] M.D. Pawaskar, P. Parikh, T. Markowski, A.J. McMichael, S.R. Feldman, R. Balkrishnan, *J. Dermatol. Treat.* 18 (2007) 5.
- [2] M.I. Pérez, *Cutis* 75 (2005) 217.
- [3] P. Grimes, J.J. Nordlund, A.G. Pandya, S. Taylor, M. Rendon, J.P. Ortonne, *J. Am. Acad. Dermatol.* S255 (54) (2006).
- [4] S. Briganti, E. Camera, M. Picardo, *Pigment Cell Res.* 16 (2003) 101.
- [5] J. Cabanes, S. Chazarra, F. Garcíacarmona, *J. Pharm. Pharmacol.* 46 (1994) 982.
- [6] L. Petit, G.E. Piérard, *Int. J. Cosmet. Sci.* 25 (2003) 169.
- [7] K. Maeda, M. Fukuda, *J. Soc. Cosmet. Chem.* 42 (1991) 361.
- [8] T. Nishimura, T. Kometani, H. Takii, Y. Terada, S. Okada, *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.* 42 (1995) 602.
- [9] M. Gallarate, M.E. Carloti, M. Trotta, A.E. Grande, C. Talarico, *J. Cosmet. Sci.* 55 (2004) 139.
- [10] M. Aparecida-Nicoletti, E.M. Almeida-Orsine, A.C. Nogueira-Duarte, G. Arbex-Buono, *Cosmet. Toilet (Ed. Portuguese)* 14 (2002) 46.
- [11] A. Chisvert, A. Balaguer, A. Salvador, in: A. Salvador, A. Chisvert (Eds.), *Analysis of Cosmetics Products*, Elsevier, Amsterdam, 2007, pp. 128–140.
- [12] T. Piamphongsant, *Int. J. Dermatol.* 37 (1998) 897.
- [13] J.C. Miller, J.N. Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 4th ed., Prentice Hall, Harlow, UK, 2000, p. 57.

Angel Balaguer¹
Alberto Chisvert²
Amparo Salvador¹

¹Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Valencia, Valencia, Spain

²Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology, Faculty of Sciences, University of Alicante, Alicante, Spain

Original Paper

Environmentally friendly LC for the simultaneous determination of ascorbic acid and its derivatives in skin-whitening cosmetics

Ascorbic acid (AA), also known as vitamin C, is a very popular skin-whitening agent used in cosmetics. However, the use of AA (and also its sodium or magnesium salts) in cosmetic products is limited owing to its labile oxidative properties. In order to avoid its early degradation, different derivatives have been designed, such as ascorbyl phosphate (APH; as magnesium or sodium salts) and ascorbyl palmitate (AP), and more recently the ascorbyl glucoside (AG). Bearing in mind that all these chemicals in skin-whitening cosmetic products must be determined in order to control the efficacy of such products, this paper focuses on developing a wide-ranging LC analytical method able to determine the above-mentioned compounds simultaneously in cosmetic products. The chromatographic variables were studied and selected in order to achieve the total separation and subsequent determination of all the analytes involved. Thus, an octadecylsilica (C₁₈) stationary phase and a mobile phase gradient of ethanol: 50 mM phosphate buffer at different pHs (containing 0.1 M NaCl) were used. Detection was carried out with a UV/visible spectrometry detector set at different wavelengths. The LOD ranged from 2 to 6 µg/mL depending on the analyte. The proposed method was validated by analysing a laboratory-made and six commercial skin-whitening cosmetic samples. The method allows any mixture of the four skin-whitening agents studied to be both separated at good resolution and determined without interferences from samples, and moreover it does not require the use of either highly toxic organic solvents or hazardous chemicals.

Keywords: Ascorbic acid / Cosmetic / Liquid chromatography / Skin bleaching agent / Skin whitening agent

Received: September 3, 2007; revised: October 22, 2007; accepted: October 25, 2007

DOI 10.1002/jssc.200700414

1 Introduction

Skin hyperpigmentation, provoked by melanin accumulation resulting from melanocyte hyperactivity, can cause a number of aesthetic problems for many people [1], since differently sized spots appear on different parts of the human body, particularly visible parts (e.g. face and hands).

Correspondence: Dr. Alberto Chisvert, Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Ciencias, Universidad de Alicante, Ctra. San Vicente del Raspeig, s/n. P. O. Box 99, E-03080 Alicante, Spain
E-mail: alberto.chisvert@ua.es
Fax: +34-96-5903527

Abbreviations: AA, ascorbic acid; AG, ascorbyl glucoside, AP, ascorbyl palmitate; APH, ascorbyl phosphate; EtOH, ethanol; MeOH, methanol; PABA, *p*-aminobenzoic acid; UV/Vis, UV/visible spectrometry

Although medical treatment may be necessary in the most serious cases, sometimes a cosmetic treatment could help to eliminate, or at least to hide, the spots caused by this disorder. Thus, leaving the use of make-up products out, cosmetic treatments based on the use of the so-called skin-whitening cosmetic products might be a solution for this disorder [2].

Skin-whitening cosmetic products, also called skin-bleaching cosmetic products, are commercial preparations containing chemicals (referred to as skin-whitening, or skin-bleaching, agents) that produce a whitening effect on the skin, by interfering in the biosynthesis of melanin *via* different mechanisms [2–5].

The most popular skin-whitening chemicals used in cosmetics are hydroquinone, arbutin, ascorbic acid (AA), azelaic acid, kojic acid and phytic acid, among others [5, 6].

It should be mentioned that AA (or its sodium or magnesium salts) is one of the most interesting active ingre-

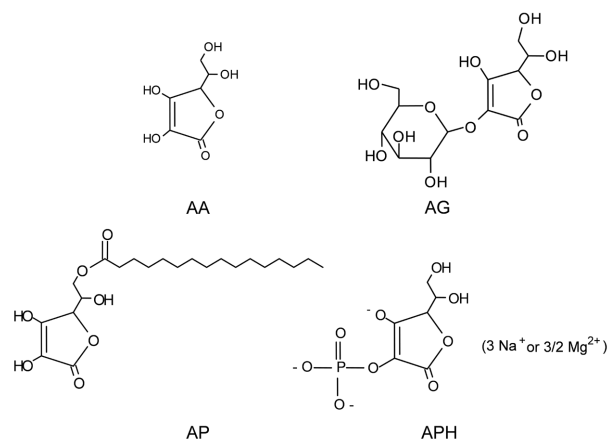


Figure 1. Molecular structures of AA, AG, AP and APH (sodium or magnesium salt).

dients, since apart from its skin-whitening properties, it adds brightness to the skin, prevents the formation of wrinkles and has important antioxidative properties, thus it is considered as antiaging agent [7, 8].

However, the use of AA in cosmetic products has been limited owing to its labile oxidative properties, which can be accelerated in the presence of oxygen, water, light, heat and metals [9–11]. In order to avoid its early degradation, different derivatives have been designed, such as ascorbyl phosphate (APH; as magnesium or sodium salts) and ascorbyl palmitate (AP), and more recently ascorbyl glucoside (AG). As can be seen from their molecular structures shown in Fig. 1, the enediol moiety, responsible for AA oxidation, is blocked in case of APH and AG, leading to higher stability than AP. All these derivatives are hydrolysed by the skin cells, which cause the *in situ* liberation of the AA [12, 13].

No substantive dermatological problems associated to the use of skin-whitening cosmetics containing AA and its derivatives have been reported [14]; however, their determination in cosmetic products is necessary in order to control the efficacy of such products. Despite this, no official analytical methods have been published to control them. Moreover, unfortunately, there are only few papers reporting the determination of AA and/or some of its derivatives in skin-whitening products, as recently reviewed by Chisvert *et al.* [6]. LC with UV/visible spectrometry (UV/Vis) detection is the technique of choice in determining AA [15, 16], AG [17, 18], AP [19] and APH [15, 17, 19–23]. Octadecylsilica (C_{18}) columns are the most popular columns employed, although the use of amipropyl [20] or cyanopropyl [19] bonded silica columns are proposed by some authors to carry out the retention and subsequent determination of the most ionic analyte (*i.e.* APH). Another strategy to retain and determine ionic analytes, using C_{18} columns, is the use of mobile phase modifiers that make the retention of AA [15] and APH [21, 23] possible by ion-pairs formation.

On the other hand, in a recently published paper, the simultaneous determination of AA, APH and AP is carried out by micellar electrokinetic CE [24].

Three other papers, proposing voltammetry for the individual determination of APH [25] and AG [26], and for the simultaneous determination of AA, AP and APH [27] can be found in the literature.

However, most of these methods employ non-environmentally friendly organic solvents. Moreover, taking into account that these four skin-whitening agents can usually be mixed in cosmetic products, there is need for a wide-ranging method able to determine AA together with all its derivatives currently used in skin-whitening cosmetics.

Thus, the aim of this paper focuses on developing an analytical method able to determine the four above-mentioned compounds in cosmetic products. The method is based on the use of LC-UV/Vis, using environmentally friendly solvents in every step of the analytical procedure.

2 Experimental

2.1 Apparatus

A Jasco LC system equipped with a Jasco PU-2089 Plus high-pressure pump and a Jasco MD-2010 Plus diode array detector (DAD; Tokyo, Japan) was employed. The injections were carried out by means of a 7725i Rheodyne® (Rohnert Park, CA, USA) manual injector equipped with a 20 μ L loop. A PC equipped with a Jasco ChromPass Chromatography Data System program connected to the LC system *via* a Jasco LC-Net II/ADC interface was used to process all chromatographic data.

A LiChrospher® 60 Select-B (250 \times 4 mm id, 5 μ m particle size) column from Merck (Darmstadt, Germany) was used in the proposed LC method.

A LiChrospher RP-18 (125 \times 4 mm id, 5 μ m particle size) column from Merck and a Kromasil 60 CN (250 \times 4 mm id, 5 μ m particle size) from Scharlab, S. L. (Barcelona, Spain) were used in the LC methods used as reference.

A Crison (Alella, Barcelona, Spain) microPH 2000 pH meter was used for the pH measurements.

2.2 Reagents and samples

AA (L-AA) 98% from Guinama (Valencia, Spain), AG (L-AA 2-glucoside) >99% kindly provided by DKSH France S. A. (Miribel Cedex, France) and AP (6-O-palmitoyl-L-AA) >99% and APH trisodium salt (2-phospho-L-AA trisodium salt) >98% from Fluka (Buchs, Germany) were used as standards.

All reagents used were of analytical reagent grade: sodium dihydrogenophosphate monohydrate from

Merck, *ortho*-phosphoric acid, sodium chloride and sodium hydroxide from Scharlau Chemie (Barcelona, Spain) and tetrabutylammonium hydroxide (TBAH) 30-hydrate from Fluka.

LC-grade ethanol (EtOH), methanol (MeOH) and THF from Scharlau Chemie and deionized water obtained from a water purification system (Easypure®) supplied by Barnstead (Iowa, USA) were used as solvents to prepare the mobile phases.

Six commercial samples containing different mixtures of the target compounds were analysed before their expiration dates. They were from different laboratories: Vichy Laboratoires (Asnieres Cedex, France), Laboratoires Galénic (Boulogne, Paris, France), Laboratorios Medea S. A. (Sant Joan Despí, Barcelona, Spain), Olay (Weybridge, Surrey, Ireland), Laboratorios Dermofarm (Rubí, Barcelona, Spain) and Sesderma S. L. (Rafelbunyol, Valencia, Spain).

A laboratory-made skin-whitening cream containing the four target skin-whitening agents (0.88, 0.85, 0.87 and 1.27% for APH, AG, AA and AP, respectively) was prepared in our laboratory. As can be seen in Table 1, this formulation contained other usual ingredients usually employed in skin-whitening cosmetics formulations, which were of cosmetic-grade and were provided by Guinama S. L.

2.3 Proposed method

Each sample was homogenized and, in triplicate, 0.05–0.6 g was weighed into a 10 mL volumetric flask, and dissolved in 5 mL approximately of EtOH: 50 mM phosphate buffer pH 3 (containing 0.1 M NaCl; 65:35, v/v). In order to accelerate the solubility, an ultrasonic water bath was used for 10 min. Next, the mixture was diluted to the mark with the same solvent. Finally, the solution was filtered through a 0.45 µm nylon membrane filter.

A stock standard solution for the four analytes was freshly prepared daily in the same solvent as samples, which was properly diluted using the same solvent to prepare a set of standard solutions ranging from 10 to 100 µg/mL.

Both sample and standard solutions were injected, within the same working session in which they were prepared, into the LC system through a 0.45 µm nylon membrane filter, where the column (LiChrospher 60 Select-B) was set at room temperature. The used gradient timetable is shown in Table 2. The UV detection was carried out at 244 nm for APH and AA, at 256 nm for AG and at 272 nm for AP.

2.4 Reference methods

As mentioned before, no standard analytical methods have been reported to determine either AA or any of its

Table 1. Composition of the analysed laboratory-made sample

Ingredient	%w/w
Base o/w ^{a)}	18
Dimethicone 350	5
Avocado pear oil	5
Propylene glycol	5
Hydroviton ^{®b)}	4
Glycolic acid	3
Aloe vera	0.5
APH (trisodium salt)	0.95 (0.88% as acid)
AG	0.85
AA	0.87
AP	1.27
Kojic acid ^{c)}	1.5
Arbutin ^{c)}	1
Phenylbenzimidazole sulphonic acid ^{d)}	1
Butyl methoxydibenzoyl methane ^{d)}	1
Ethylhexyl methoxycinnamate ^{d)}	2
Phenonip ^{®e)}	0.5
Water	Up to 100

a) Base for production of oil–water emulsions, made up of fatty substances, such as myristyl myristate, cetyl alcohol, glyceryl laurate, cetearyl ethylhexanoate, isopropyl myristate, among others.

b) Moisturizing cosmetic preparation made up of urea, sodium chloride, glycerine, sodium lactate, allantoin, amino acids and water, among others.

c) Other cosmetic ingredients employed as skin-whitening agents.

d) Substances employed as UV filters in cosmetics.

e) Cosmetic preparation containing a mixture of preservatives such as: phenoxyethanol, methyl-, ethyl-, propyl-, butyl- and isobutylparaben.

derivatives employed as skin-whitening agents in cosmetics. Moreover, simultaneous determination of the four target analytes has been not carried out in any of the methods published in the literature. Therefore, we adapted different published methods, used to determine some of the target analytes, in order to evaluate the accuracy of the proposed method. It should be emphasized that we were unable to reproduce the methods for AG determination, since we did not have the instrumentation or the chromatographic columns employed in the only three methods published in the literature determining this novel skin-whitening agent [17, 18, 26].

2.4.1 AA and APH determination

This methodology was adapted from the method published by Chang and Chang [15].

Each sample was homogenized and, in triplicate, 0.05–0.3 g was weighed into a 10 mL volumetric flask, and dissolved in 5 mL approximately of deionized water. Solutions were sonicated for 15 min. Next, the mixture

was diluted to the mark with the same solvent. Finally, the solution was filtered through a 0.45 μm nylon membrane filter.

A stock standard solution for the two analytes was prepared in deionized water, which was conveniently diluted by using the same solvent to prepare a set of standard solutions ranging from 10 to 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Both sample and standard solutions were injected into the LC system through a 0.45 μm nylon membrane filter, where the column (LiChrospher RP-18) was set at room temperature. The employed mobile phase (flowing at 1.1 mL/min) was MeOH: 5 mM phosphate buffer pH 2.5 (containing 10 mM TBAH; 10:90, v/v). The UV detection was carried out at 240 nm.

2.4.2 AP determination

This methodology was adapted from the method published by Sottofattori *et al.* [19], although authors reported problems related to the quantitative extraction of AP from the cosmetic samples. Thus, sample treatment was adapted from the method published by Austria *et al.* [10].

Each sample was homogenized and, in triplicate, 0.1–0.5 g were weighed into a 10 mL volumetric flask, and dissolved in 5 mL approximately of THF/H₂O (90:10, v/v). Solutions were sonicated for 5 min. Next, the mixture was diluted to the mark with the same solvent. Finally, the solution was filtered through a 0.45 μm nylon membrane filter.

A stock standard solution for the target analyte was also prepared in THF/H₂O (90:10, v/v), which was conveniently diluted by using the same solvent to prepare a set of standard solutions ranging from 10 to 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Both sample and standard solutions were injected into the LC system through a 0.45 μm nylon membrane filter, where the column (Kromasil 60 CN) was set at room temperature. The mobile phase (flowing at 1 mL/min) was a linear gradient of MeOH/25 mM phosphate buffer pH 3.5 from 40:60 to 80:20 v/v in 8 min, which was kept for 4 min, and rapidly the initial conditions were reached and maintained for 5 min to re-equilibrate the system prior a new injection. The UV detection was carried out at 240 nm.

3 Results and discussion

3.1 Preliminary study of the solvent for sample preparation

Although the four target analytes belong to the same chemical family, they display different physico-chemical behaviour due to the different chemical moieties of their molecular structures. On one hand, AA, APH and AG are water-soluble chemicals, whereas on the other hand, AP is a fat-soluble chemical. Given the different solubility

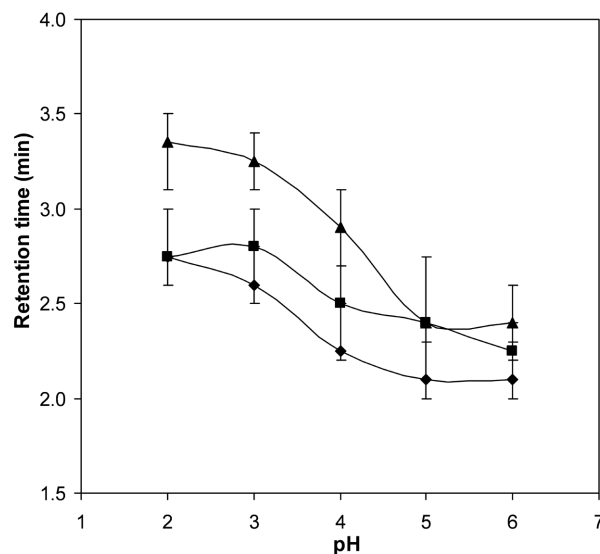


Figure 2. Effect of the pH in the retention time of APH (\blacklozenge), AG (\blacksquare) and AA (\blacktriangle). The vertical bracket-lines show the peak width. Experimental conditions: injection volume = 20 μL ; flow rate = 1 mL/min; mobile phase = 100% 50 mM phosphate buffer at different pHs, $\lambda = 244$ nm.

properties of these four target analytes, a study of the solvent was necessary. As expected, high EtOH content made AA, APH and AG solubility difficult, whereas AP solubility became easier. Moreover, high EtOH content helps to solve other components from sample, thus making analyte lixiviation easier. An optimal EtOH content of 65% was used to solve all four target analytes, and moreover, it was enough to lixiviate the analytes from samples.

3.2 Study of the chromatographic variables

First of all, the study was focused to exclude AP, since it is the most fat-soluble target analyte, thus it eluted later than the others. In this first step, a solution of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of the other three target analytes in EtOH/50 mM phosphate buffer at the same pH as the mobile phase (65:35, v/v) was injected using different mobile phases (at 1 mL/min) constituted by 100% 50 mM phosphate buffer at a pH ranging from 2 to 6. As can be seen in Fig. 2, the best resolution was achieved at pH 3, where although AA was resolved from AG and APH, these last compounds overlapped.

In order to achieve a better resolution of the peaks, the effect of the flow rate was studied over the range of 0.5–1.5 mL/min (results not shown), by injecting a solution of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of the target analytes into EtOH/50 mM phosphate buffer pH 3 (65:35, v/v). As expected, when the flow rate increased, the peak width decreased giving a better separation, but on the contrary, retention time also decreased leading to the contrary effect. A flow rate of

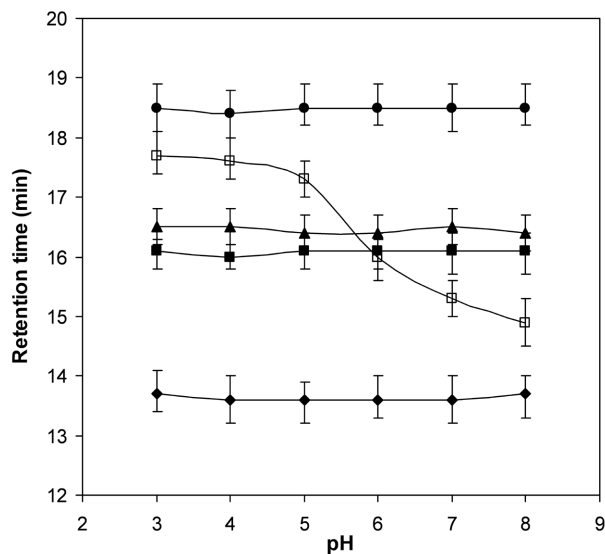


Figure 3. Effect of the pH in the separation of AP (□) from different common UV filters employed in cosmetics that elute near: benzophenone-3 (◆), isoamyl methoxycinnamate (■), 4-methylbenzylidene camphor (▲) and octocrylene (●). The vertical bracket-lines show the peak width. Experimental conditions: injection volume = 20 μ L; mobile phase (at 0.5 mL/min flow rate) = EtOH/50 mM phosphate buffer pH 3 (containing 0.1 M NaCl; 0:100, v/v) from 0 to 7.0 min, then a linear gradient elution of EtOH/50 mM phosphate buffer at different pHs from 0:100 to 70:30 v/v in 0.1 min, and then maintaining it for 15 min; λ = 244 nm.

0.5 mL/min was finally chosen, although the resolution was not completely satisfactory.

Finally, the effect of sodium chloride as mobile phase modifier was tested, over the range of 0–0.7 M, by injecting a solution of 50 μ g/mL of the target analytes in EtOH/50 mM phosphate buffer pH 3 (containing the same amount of NaCl as the mobile phase) (65:35, v/v). The mobile phase was made up of 50 mM phosphate buffer pH 3 (containing different amount of NaCl) at 0.5 mL/min flow rate. A concentration of 0.1 M NaCl was chosen, since it provided a good resolution of the peaks without causing excessive widening when NaCl concentration increased.

In a second step, a solution of 50 μ g/mL of the four target analytes in EtOH/50 mM phosphate buffer pH 3 (containing 0.1 M NaCl; 65:35, v/v) was injected using the above-mentioned chromatographic conditions. As expected, AP was not eluted from the column, so the EtOH content had to be increased. A pronounced gradient from 0 to 100% v/v EtOH in 0.1 min (at 1 mL/min) when the water-soluble target analytes were eluted, *i.e.* from 7.0 min on, led to satisfactory elution of AP. However, when real samples were injected, overlapping was observed of AP and different UV filters commonly employed in cosmetics. In order to separate AP from these UV filters, different EtOH contents were assayed,

but no satisfactory results were obtained. In the best of cases, by employing a mobile phase with EtOH content of 70% v/v (based on our experience in previous papers where determination of UV filters were carried out [28, 29]) AP was separated from some UV filters but overlapped with octocrylene (a common UV filter employed in cosmetics). In order to achieve effective separation, the effect of the pH of the mobile phase was studied. Thus, we assayed an isocratic mobile phase of EtOH/50 mM phosphate buffer pH 3 (containing 0.1 M NaCl; 0:100, v/v; at 1 mL/min flow rate) from 0 to 7.0 min; then, a linear gradient elution of EtOH/50 mM phosphate buffer at different pHs from 0:100 to 70:30 v/v in 0.1 min, maintaining it for 15 min. The retention time of AP and the UV filters that eluted near it (*i.e.* benzophenone-3, 4-methylbenzylidene camphor, isoamyl methoxycinnamate and octocrylene) are shown in Fig. 3. As can be seen, the retention times of these UV filters did not change significantly, whereas the retention time of AP went down when pH increased. The separation of AP from UV filters was achieved at pH 5 or 8, thus, either one of these conditions could be suitable for AP determination without interference from UV filters. However, some unidentified compounds from the matrix samples coeluted with AP when some real samples were analysed using pH 5 in this second step. Therefore, in order to propose a wide-ranging analytical method able to determine AA and all its derivatives in any type of skin-whitening cosmetic sample, a final pH of 8 was selected to carry out the elution of the second step.

The flow rate was studied in this second step, with a view to decreasing the run time. Flow rates over the range of 0.5–1.5 mL/min were assayed. A 1.5 mL/min flow rate was selected because it gave a satisfactory resolution with a shorter run time. Higher flow rates were not possible because of technical problems related to the pressure system.

Finally, the time necessary to reach the initial conditions and thus leave the system ready for the following run was studied. The final gradient time-table is shown in Table 2. A separation of the four target analytes by using the optimized gradient time-table is shown in Fig. 4.

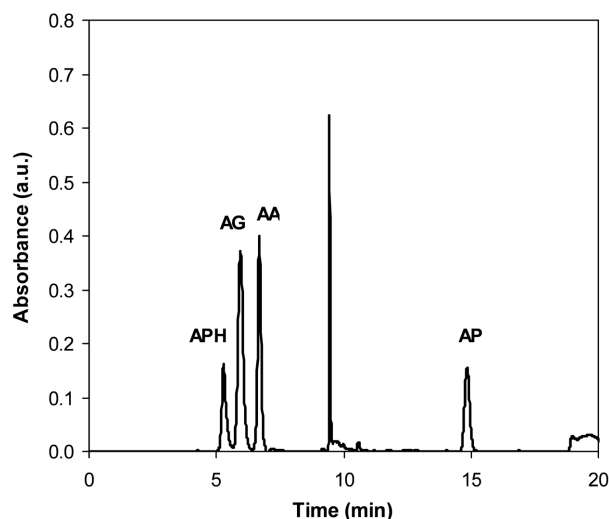
3.3 Study of interferences

Different ingredients commonly used in skin-whitening cosmetic products, *e.g.* UV filters to protect users' skin from sunlight to avoid tanning, and other skin-whitening agents, and thus, could interfere in the determination of the target analytes, were assayed under the conditions selected in the proposed method.

Consequently, six water-soluble UV filters, namely disodium phenyldibenzimidazole tetrasulphonate, PABA (*p*-aminobenzoic acid), phenylbenzimidazole sul-

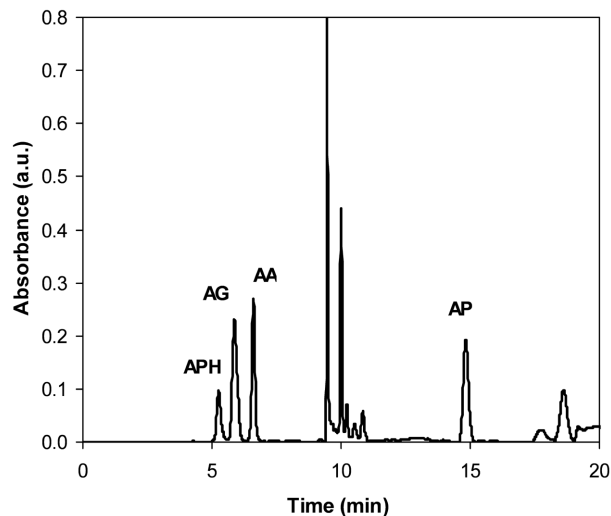
Table 2. Gradient time-table used in the proposed LC method for the determination of AA and its derivatives used as skin-whitening agents

t (min)	EtOH (%v/v)	50 mM phosphate buffer (%v/v)		Flow rate (mL/min)
		pH = 3 (containing 0.1 M NaCl)	pH = 8	
0	0	100	0	0.5
7	0	100	0	0.5
7.1	70	0	30	1.5
19	70	0	30	1.5
19.1	0	100	0	1.5
29	0	100	0	1.5
30	0	100	0	0.5

**Figure 4.** A chromatogram showing the separation of the four target analytes (100 µg/mL) by using the proposed method.

phonic acid, terephthalylidene dicamphor sulphonic acid, benzophenone-4 and PEG-25 PABA were found not to interfere, since they eluted jointly with the elution front of the second step (10 min approximately) when the EtOH content was increased.

On the other hand, 14 fat-soluble UV filters were also assayed, namely benzophenone-3, isoamyl methoxycinnamate, 4-methylbenzylidene camphor, octocrylene, ethylhexyl dimethyl PABA, ethylhexyl methoxycinnamate, butyl methoxydibenzoylmethane, homosalate, ethylhexyl salicylate, diethylhexyl butamido triazone, ethylhexyl triazone, drometrizole trisiloxane, bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine and polysilicone-15. Obviously, the first four did not interfere, since method was optimized bearing these UV filters in mind, which eluted near AP. The rest eluted later than octocrylene, and thus did not interfere.

**Figure 5.** A chromatogram of a laboratory-made skin-whitening sample obtained by using the proposed method.

Finally, two other common skin-whitening agents were assayed, namely arbutine and kojic acid, which were also eluted jointly with the elution front of the second step (10 min approximately).

3.4 Analytical figures of merit of the proposed method

The repeatability of the measurements was tested by injecting a solution of the analytes five times. Retention times and SD are indicated for each analyte in Table 3. RSD in area values is also given.

The calibration parameters, linearity and LOD of the studied compounds are also shown in Table 3.

To estimate the accuracy of this method a laboratory-made skin-whitening cosmetic product was analysed (see chromatogram in Fig. 5), which contained known amounts of the analytes. The results are shown in Table 4. The obtained RSD in concentration values were very low (0.2–0.6%), showing the results to be precise. The method has a low relative error (<5%), demonstrating the accuracy of the results.

3.5 Application of the proposed method to the analysis of commercial skin-whitening cosmetic products

The method was employed to determine the four target skin-whitening agents in six commercial samples (data given in Table 5). Those whitening agents that were not declared at the label were not found when the analysis was carried out. A chromatogram obtained for some of these samples is shown in Fig. 6. Table 5 also shows the

Table 3. Analytical features of the proposed chromatographic method

Analyte	Retention time (min)	RSD in area ^{a)} (%)	Dynamic range ^{b)} (µg/mL)	Intercept/10 ⁺⁴ (mAU min)	Slope/10 ⁺⁶ (mAU min)/(µg/mL)	R ²	LOD ^{c)} (µg/mL)
APH ^{d)}	5.19 ± 0.02	0.7	<215	-12 ± 5	1327 ± 4	0.99991	2
AG	5.79 ± 0.02	0.4	<420	-13 ± 4	1247 ± 3	0.99997	2
AA ^{d)}	6.50 ± 0.04	0.6	<175	10 ± 20	2150 ± 30	0.9994	5
AP	14.90 ± 0.04	0.7	<745	-23 ± 4	517 ± 2	0.99993	6

a) Referred to a solution containing 73, 55, 77 and 80 µg/mL of APH, AG, AA and AP, respectively.

b) The working range was set over the range of 10–100 mg/mL.

c) LOD = limit of detection. Estimated as $3s_{y/x}/b$, where $s_{y/x}$ is the SD of the calibration line and b the slope.

d) Expressed as acid.

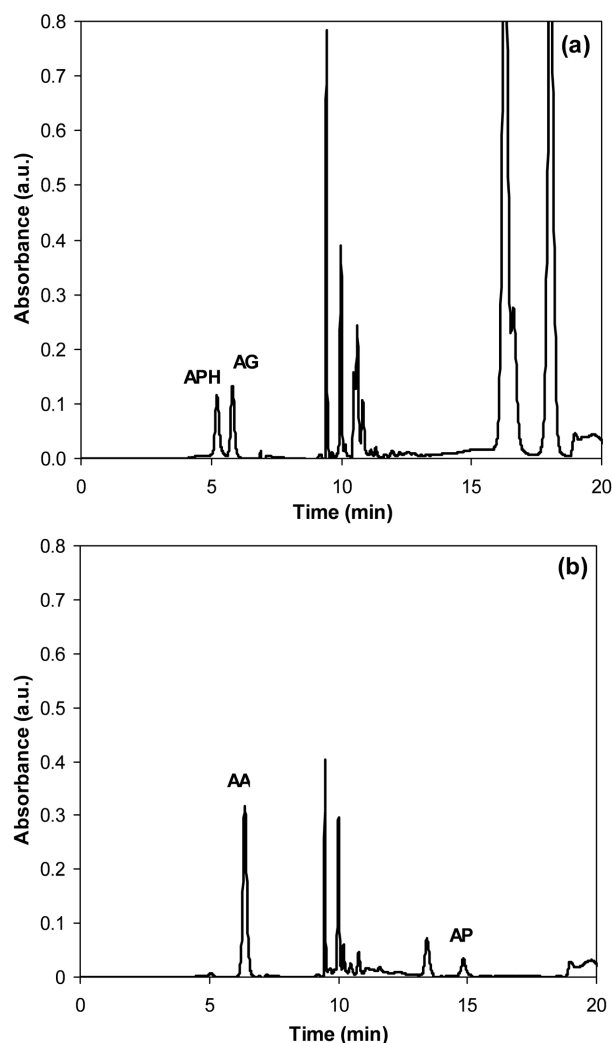


Figure 6. Chromatograms of some of the analysed commercial skin-whitening cosmetic products obtained by using the proposed method. (a) Sample A, (b) sample F.

results obtained by other analytical methods that were used as reference (see Section 2.4).

It is worth mentioning that the proposed method enables the determination of AA in all the samples, whereas this analyte was overlapped with matrix compounds when the reference method was employed.

Table 4. Results obtained in the analysis of a laboratory-made skin-whitening sample

Analyte	Real content (%w/w)	Found content ± s ^{a)} (%w/w)	Error (%)
APH ^{b)}	0.88	0.873 ± 0.002	-0.8
AG	0.85	0.814 ± 0.002	-4.2
AA ^{b)}	0.87	0.858 ± 0.002	-1.4
AP	1.27	1.231 ± 0.008	-3.1

a) Average values of three determinations ± SD (s).

b) Expressed as acid.

On the other hand, as can be seen in the results obtained by the proposed method, the RSD values were in the 1.2–5.7% range, which are similar to those obtained employing other methods.

In order to evaluate the accuracy of the results obtained by the proposed method, the results obtained for all the analytes and samples were compared with those obtained by the reference methods, by means of a linear regression model. The obtained equation was: $Y = (0.995 \pm 0.005)X - (0.008 \pm 0.006)$, $R^2 = 0.99991$, $N = 8$, where Y and X are expressed in % w/w of each analyte and are the results obtained by the proposed method and the results taken as reference, respectively. The theoretical t -value for a 5% significance level and $N-2$ degrees of freedom is 2.45, and the experimental t -values for the slope and the intercept were 1.07 and 1.27, respectively, which shows the comparability of the results.

In the case of AG (contained in sample A), for which no reference method was applied, recovery was obtained using the proposed method by means of the standard calibration approach, showing a value statistically comparable to 100% for this analyte in sample A, which shows the absence of proportional error caused by the matrix of the sample.

4 Concluding remarks

An environmentally friendly, wide-ranging method is proposed, based on LC with conventional UV/Vis detection able to determine AA and all its derivatives, cur-

Table 5. Results obtained in the analysis of commercial skin-whitening cosmetic products

Analyte	Found content \pm s ^{a, b, c} (%w/w)					
	Sample A	Sample B	Sample C	Sample D	Sample E	Sample F
APH ^d	0.173 \pm 0.002 (0.180 \pm 0.003) ^e	ND (ND) ^e	ND (ND) ^e	0.024 \pm 0.001 (0.025 \pm 0.001) ^e	2.99 \pm 0.06 (3.01 \pm 0.01) ^e	ND (ND) ^e
AG	0.223 \pm 0.004	ND	ND	ND	ND	ND
AA ^d	ND (ND) ^e	0.69 \pm 0.02 (0.72 \pm 0.04) ^e	0.42 \pm 0.02 (NR) ^e	D (ND) ^e	ND (ND) ^e	0.250 \pm 0.009 (0.246 \pm 0.007) ^e
AP	ND (ND) ^f	ND (ND) ^f	ND (ND) ^f	ND (ND) ^f	ND (ND) ^f	0.070 \pm 0.004 (0.085 \pm 0.005) ^f

a) Average values of three determinations \pm SD (s).

b) ND = not detected, NR = not resolved.

c) According to the label, sample A contains APH and AG, sample B and C contain AA, samples D and E contain APH, and sample F contains AA and AP.

d) Expressed as acid.

e) Values obtained by method adapted from ref. [15] (see Section 2.4).

f) Values obtained by method adapted from ref. [19] (see Section 2.4).

rently employed as skin-whitening agents in cosmetics. The determination takes 30 min, with good resolution and without interference from either cosmetic matrices or other compounds usually employed in skin-whitening cosmetics, such as UV filters and other skin-whitening agents.

The proposed method is accurate and precise, and its sensitivity and limits of detection are suitable for the analysis of such samples. It has been validated by analysing laboratory-made and commercial skin-whitening products.

Every step of the analytical procedure can be considered as environmentally friendly, since neither hazardous solvents nor reagents are employed.

All these features make the method easy to apply to quality control in the cosmetic industry.

The authors acknowledge the financial support of the Spanish Government (project CTQ2006-00296), especially A. Balaguer for his predoctoral grant.

5 References

- Pawaskar, M. D., Parikh, P., Markowski, T., McMichael, A. J., Feldman, S. R., Balkrishnan, R., *J. Dermatol. Treat.* 2007, 18, 5–9.
- Briganti, S., Camera, E., Picardo, M., *Pigment Cell Res.* 2003, 16, 101–110.
- Cabanes, J., Chazarra, S., Garcíacarmona, F., *J. Pharm. Pharmacol.* 1994, 46, 982–985.
- Kim, Y. J., Uyama, H., *Cell Mol. Life Sci.* 2005, 62, 1707–1723.
- Petit, L., Piérard, G. E., *Int. J. Cosmet. Sci.* 2003, 25, 169–181.
- Chisvert, A., Balaguer, A., Salvador, A., in: Salvador, A., Chisvert, A. (Eds.), *Analysis of Cosmetics Products*, Elsevier Science B. V., Amsterdam 2007, pp. 128–140.
- Raschke, T., Koop, U., Dusing, H. J., Filbry, A., Sauermann, K., Jaspers, S., Wenck, H., Wittern, K. P., *Skin Pharmacol. Physiol.* 2004, 17, 200–206.
- Farris, P. K., *Dermatol. Surg.* 2005, 31, 814–818.
- Tsao, C. S., Young, M., *Med. Sci. Res.* 1996, 24, 473–475.
- Austria, R., Semenzato, A., Bettero, A., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1997, 15, 795–801.
- Gallarate, M., Carlotti, M. E., Trotta, M., Bovo, S., *Int. J. Pharm.* 1999, 188, 233–241.
- Kumano, Y., Sakamoto, T., Egawa, M., Iwai, I., Tanaka, M., Yamamoto, I., *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 1998, 44, 345–359.
- Špiclin, P., Homar, M., Zupancic-Valant, A., Gašperlin, M., *Int. J. Pharm.* 2003, 256, 65–77.
- Espinal-Pérez, L. E., Moncada, B., Castanedo-Cazares, J. P., *Int. J. Dermatol.* 2004, 43, 604–607.
- Chang, M. L., Chang, C. M., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003, 33, 617–626.
- Maia, A. M., Baby, A. R., Yasaka, W. J., Suenaga, E., Kaneko, T. M., Velasco, M. V. R., *Talanta* 2007, 71, 639–643.
- Huang, S. C., Lin, C. C., Huang, M. C., Wen, K. C., *J. Food Drug Anal.* 2004, 12, 13–18.
- Lin, C. H., Wu, H. L., Huang, Y. L., *Anal. Chim. Acta* 2007, 581, 102–107.
- Sottofattori, E., Anzaldi, M., Balbi, A., Tonello, G., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1998, 18, 213–217.
- Semenzato, A., Austria, R., Dall'Aglio, C., Bettero, A., *J. Chromatogr. A* 1995, 705, 385–389.
- Shih, Y., *J. AOAC Int.* 2001, 84, 1045–1049.
- Liu, S., *Sepu* 2004, 22, 660–660.
- Varvaresou, A., Tsirivas, E., Iakovou, K., Gikas, E., Papatomas, Z., Vonaparti, A., Panderi, I., *Anal. Chim. Acta* 2006, 573–574, 284–290.
- Wang, C. C., Wu, S. M., *Anal. Chim. Acta* 2006, 576, 124–129.
- Shih, Y., Zen, J. M., *J. Chin. Chem. Soc.* 1999, 46, 865–870.
- Shih, Y., Zen, J. M., *J. Chin. Chem. Soc.* 2006, 53, 857–862.
- Chang, M. L., Chang, C. M., *J. Food Drug Anal.* 2005, 13, 205–211.
- Chisvert, A., Pascual-Martí, M. C., Salvador, A., *Fresenius J. Anal. Chem.* 2001, 369, 638–641.
- Salvador, A., Chisvert, A., *Anal. Chim. Acta* 2005, 537, 15–24.

available at www.sciencedirect.comjournal homepage: www.elsevier.com/locate/aca

A solid-phase extraction and size-exclusion liquid chromatographic method for polyethylene glycol 25 *p*-aminobenzoic acid determination in urine: Validation for urinary excretion studies of users of sunscreens

A. Balaguer^a, A. Chisvert^b, A. Salvador^{a,*}, M. Herraiz^c, O. Diez^c

^a Departamento de Química Analítica, Universitat de València, 50 Doctor Moliner St., 46100-Burjassot, Valencia, Spain

^b Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Universidad de Alicante, Alicante, Spain

^c Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universitat de València, Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 December 2007

Received in revised form

23 January 2008

Accepted 25 January 2008

Published on line 9 February 2008

Keywords:

Polyethylene glycol 25

p-aminobenzoic acid

Ultraviolet filter

Sunscreen

Urine

Solid-phase extraction

Size-exclusion liquid

chromatography

Fluorescence detection

ABSTRACT

No previous publications about percutaneous absorption of polyethylene glycol 25 *p*-aminobenzoic acid (PEG-25 PABA) have been found in the literature and the expected levels to be found in human urine after sunscreens use are unknown. The method proposed here is suitable to determine PEG-25 PABA in the urine of sunscreens users in order to carry out studies on body accumulation/excretion. It is based on solid-phase extraction (SPE) with size-exclusion liquid chromatography determination. Solid-phase extraction allows the analyte to be retained and subsequently eluted for a clean-up, using a silica-based cartridge. The size-exclusion liquid chromatography of the eluted allows the rest of matrix interferences to be avoided. Fluorescence intensity was measured at $\lambda_{em} = 350$ nm ($\lambda_{exc} = 300$ nm). The sensitivity of the proposed method is in the order of 450 ± 5 mL ng⁻¹ and the detection limit ($3S_{y/x}/b$) in the measured solutions is in the order of 13 ng mL⁻¹, that is 2.6 ng mL⁻¹ in urine samples. The method enables PEG-25 PABA to be determined in both, spiked and unspiked human urine samples. Results obtained for spiked human urine samples (11–100 ng mL⁻¹) demonstrated the accuracy of the method. The mean relative standard deviation of the results was in the order of 3–10%. Three volunteers applied a sunscreen lotion containing a 8% PEG-25 PABA sunscreen cream and their urinary excretion was controlled from the moment of application until the excreted amounts were no longer detectable.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Sunscreen products contain different chemicals that have high UV light absorbing properties, which are commonly referred to as UV filters. Authorized UV filters and their permitted contents depend on the legislation in force in each country. Different published articles can be found in analyt-

ical literature devoted to determine the content of UV filters in sunscreen formulations, as recently reviewed [1,2].

On the other hand, although UV filters should be designed to remain on the skin surface without any percutaneous absorption, it has recently been proven that the human body can absorb some organic UV filters contained in sunscreen formulations through the skin. Different methodologies have

* Corresponding author. Tel.: +34 96 3543175; fax: +34 96 3544436.

E-mail address: amparo.salvador@uv.es (A. Salvador).

0003-2670/\$ – see front matter © 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

doi:10.1016/j.aca.2008.01.082

been applied to study this percutaneous absorption and excretion process in the human body, such as: *in vivo* or *in vitro* tape-stripping methods, *in vitro* methods using percutaneous diffusion cells, *in vivo* methods based on the analysis of biological tissues or *in vivo* methods based on the analysis of biological fluids, as can be seen in a recent review [3]. These studies will enable the most suitable UV filters to be selected, having high remaining on the skin and low percutaneous absorption, thus maximising sun protection efficacy and reducing possibilities of systemic side-effects. Most published articles refer to a few UV-filters, making it necessary to study all the compounds included in the lists of authorized UV filters.

Some interesting articles have been published and reviewed [3], devoted to determining the content of a few UV filters in urine from volunteers who applied sunscreen cosmetics to their skin. The INCI (International Nomenclature Cosmetic Ingredient) names of the UV filters determined until now are: 4-methylbenzylidene camphor [4,5], benzophenone-3 [5–11], ethylhexyl methoxycinnamate [5], terephthalylidene dicamphor sulphonic acid [12], *p*-aminobenzoic acid [13,14], phenylbenzimidazole sulphonic acid [15] and disodium phenyl dibenzimidazole tetrasulfonate [16].

Different analytical techniques have been proposed, such as liquid chromatography with UV detection [6–8,10,11], liquid or gas chromatography with mass spectrometry detection [4,9] or molecular fluorescence [15,16]. Preparation sample methods allowing clean-up and preconcentration steps have been based on liquid extraction and centrifugation, solid-phase extraction [15,16] or microextraction [9,10]. The levels of the studied UV filters in urine are reported to be between 10 and 990 ng mL⁻¹, showing they are percutaneously absorbed.

The cosmetic ingredient known as *p*-aminobenzoic acid (PABA) has been greatly used as a UV filter in sunscreen cosmetics for many years. It is a water-soluble compound that is especially useful for sun protection in the UVB range (290–320 nm). However, it causes allergic skin reactions in some people who are sensitive to it [17–20] and, moreover, it stains clothing. The maximum authorized content of PABA in cosmetics differs depending on each legislation, for instance in the European Union (EU) it is 5%. Because of the drawbacks of PABA, cosmetic chemists have proposed different PABA derivatives to be used as UV filters, such as esters, which can be formed by the reaction of PABA with long-chain alcohols. An example is polyethylene glycol 25 *p*-aminobenzoic acid (PEG-25 PABA) or ethoxylated ethyl 4-aminobenzoate with 25 mol polyoxyethylene average molar ratio (Fig. 1) which does not cause skin irritation or stain cloths, with a maximum authorized content in the EU twice that of PABA. No data have been found in the literature about percutaneous absorption of PEG-25 PABA or the expected levels to be found in human urine after sunscreen products use. However, an interesting

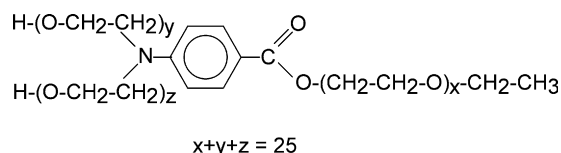


Fig. 1 – Chemical structure of PEG-25 PABA.

article [21] should be cited, in which remnants of PEG-25 PABA and another UV filter (benzophenone-4) on skin, were studied using a stripping method.

The aim of this work is to develop a selective and sensitive method that enables traces of PEG-25 PABA to be determined in urine without matrix interferences, in order to study excretion from the human body after the topical application of cosmetic products containing this UV filter. The proposed method is based on solid-phase extraction (SPE) followed by a size-exclusion liquid chromatographic separation with fluorescence detection.

2. Experimental part

2.1. Apparatus

Urine samples were filtered through a porous glass filter (10–16 μm porous size) from Schott Duran (Mainz, Germany) using an N86KT.18 KNF vacuum pump from Laboport (Trenton, NJ, USA).

1 mL Bond Elut cartridge packed with 100 mg of silica packing (SI) from Varian (Lake Forest, CA, USA) was used for SPE of urine samples.

A liquid chromatography system equipped with a 515 isocratic pump from Waters (Eschborn, Germany), an AS100 Spectra System automatic injector from Thermo (Allschwil, Switzerland), and a Series 200 fluorescence detector from Perkin Elmer (Norwalk, CT, USA), was employed for PEG-25 PABA determination. An exclusion PLGel Mixed-D (30 cm × 7.5 mm I.D., 5 μm particle size) column with a PLGel Guard precolumn (5 cm × 7.5 mm I.D., 5 μm particle size) from Polymer Laboratories (Church Stretton, United Kingdom) were employed for the chromatographic separation.

A F4500 spectrofluorimeter from Hitachi (Tokyo, Japan) and a 8453 UV/vis spectrometer from Agilent (Madrid, Spain) were used for the preliminary studies.

2.2. Reagents and samples

PEG-25 PABA (>99%) kindly provided by Basf Española S.A (Barcelona, Spain) was used as standard. The following reagents were also used: *N,N*-dimethylformamide (DMF) and ethanol (EtOH) LC grade from Scharlab Chemie S.A (Barcelona, Spain), dihydrogen sodium phosphate monohydrate from Merck (Darmstadt, Germany), sodium hydroxide from Scharlab Chemie S.A. (Sentmenat, Spain) and deionized water.

A home-made sunscreen cream was prepared according to a procedure provided by Guinama (Alboraya, Spain). This cream contained PEG-25 PABA (8%, w/w) and other commonly used ingredients (also purchased from Guinama) such as myristyl myristate, cetyl alcohol, glyceryl laurate, avocado oil, propylene glycol.

The urine samples were taken from three volunteers after applying approximately 2 mg cm⁻² of sunscreen cream to their arms, thighs and upper part of the back. Their urinary excretion was controlled from the moment of application until the excreted amount of PEG-25 PABA was no longer detectable.

For the accuracy study, eight PEG-25 PABA free human urine samples were also taken from four volunteers and spiked

before the analysis with different concentrations between 11 and 100 ng mL⁻¹ of PEG-25 PABA.

2.3. Proposed method

2.3.1. Samples and standard preparation

Urine samples (about 80 mL) were filtered through a porous glass filter by using a vacuum pump. The following procedure was carried out in triplicate: 25 mL of the filtered urine were passed through a silica-based SPE cartridge (charge step) (previously conditioned by passing 1 mL of EtOH and 1 mL of deionized water) and afterwards 10 mL of deionized water was passed (washing step). The elution of PEG-25 PABA was achieved by passing 4 mL of DMF. The eluted solution was collected in a volumetric flask and diluted to 5 mL with DMF.

Solutions of PEG-25 PABA in DMF (from 20 to 1000 ng mL⁻¹) were used as standards.

2.3.2. Chromatographic procedure

DMF was used as mobile phase with a 2 mL min⁻¹ flow rate. 50 µL of sample or standard solutions were injected. Fluorescence intensity was measured at $\lambda_{em} = 350$ nm ($\lambda_{exc} = 300$ nm).

3. Results and discussion

The following steps were carried out in the study.

As a low PEG-25 PABA content was expected in urine from volunteers as well as some interference from the matrix, SPE was recommended in order to perform a preconcentration and a clean-up. Then, first of all, the behaviour of PEG-25 PABA for different SPE cartridges packing, washing solvents and elution solvents was studied.

As direct fluorimetric determination after the SPE step was not possible because of the remaining interferences coming from the urine matrix, liquid chromatography separation was studied.

After optimization of the chromatographic procedure, the method was validated by the analysis of PEG-25 PABA free urine samples (from four volunteers) which were spiked at different concentration levels.

Finally, three volunteers applied a cream containing a known amount of PEG-25 PABA and their urinary excretion was analyzed until the excreted amounts of PEG-25 PABA were no longer detectable, in order to obtain the urinary excretion curves, the excreted percentage and the time required for complete elimination of PEG-25 PABA.

3.1. Study of experimental variables

3.1.1. Selection of the retention/elution conditions in SPE

The following cartridge packings (100 mg) were studied: octadecyl (C18), aminopropyl (NH₂), trimethyl aminopropyl (SAX), propylsulfonic acid (PRS), all bonded silica (or silica-based) sorbents; silica (Si) and activated carbon (C).

The experiments were carried out by the following procedure. A PEG-25 PABA standard (65 µg mL⁻¹) solution was prepared in a NaH₂PO₄·H₂O solution (10 g L⁻¹) that was buffered at pH 6 (by adding a few drops of a concentrated sodium hydroxide solution). Then, 2 mL of this PEG-25 PABA

solution were passed through each of the target SPE packings and the absorbance of the extract was measured at the wavelength corresponding to the maximum of the absorbance peak (308 nm). SPE cartridge packings based on C18, SAX and NH₂ retained less than 50% of the total PEG-25 PABA, whereas a quantitative retention was achieved by using packings based on C, PRS and Si.

A further study was carried out to select the best solvent elution for the three packings that provided a quantitative retention. Two milliliters of the abovementioned PEG-25 PABA solution (pH 6) were passed through each of the cartridge packings. The corresponding cartridges were washed with 10 mL of deionized water (no loss of analyte occurred by water washing) and air dried. Then 2 mL of the target solvents were passed through and eluent absorbance measured at 308 nm. The elution from the C packing and the Si packing was assayed using different solvents: ethanol, methanol, acetonitrile, DMF. None of them gave good results for the C packing, while only DMF provided a quantitative elution of PEG-25 PABA in the case of Si packing. The elution of PEG-25 PABA from the PRS packing was achieved using a 0.25 M sodium hydroxide solution.

Consequently, either Si or PRS could be used for quantitative retention/elution of PEG-25 PABA. However, PRS has some disadvantages when compared with Si, due to the basicity of the required solvent elution that causes a shorter lifespan of the packing, lower fluorescence of the analyte and, moreover, instability of the fluorescence signal of the analyte (probably due to ester degradation caused by hydrolysis). Then, Si packing was preferred, with DMF solvent employed as eluent.

Fluorescent features were studied of PEG-25 PABA in DMF solution. The selected wavelengths of excitation and emission were 300 and 350, respectively.

The fluorescence spectra of PEG-25 PABA solutions did not display significant changes over time at room temperature for more than 2 days, indicating good stability in DMF.

The following experiments were carried out to check whether the cartridge was working properly and its validity for the analytical problem.

PEG-25 PABA standard solutions (25–750 ng mL⁻¹) in a NaH₂PO₄·H₂O solution (10 g L⁻¹) that was buffered at pH 6 were used to study the linear range that provided the extraction procedure. Only one cartridge was used for all the experiments. 25 mL of these standard solutions were passed through the Si cartridge, 10 mL of deionized water were passed to wash and remove unretained interferences, and finally, 4 mL of DMF was passed to elute the analyte. The eluted solution was collected into a volumetric flask and diluted to 5 mL with DMF. Fluorescence of these DMF elution solutions was measured directly, because higher sensitivity is achieved than DMF/water mixtures. Good linearity was observed without any remnants of analyte between the consecutive extractions.

3.1.2. Interference from urine matrix

In order to study the urine interferences, 25 mL of a PEG-25 PABA-free human urine (blank) was passed through the Si cartridge and the same procedure was followed as the standard solutions in order to obtain the elution solution. A slight signal was observed and then a second washing step previous to elution with DMF was assayed by using 10 mL of the solvents which gave bad results as eluents (water, ethanol, methanol

and acetonitrile). None of the washing solvents were able to elute the urine matrix interferences as the fluorescence signal remained. As SPE was not enough to provide good results, chromatographic analysis of the extracts with fluorimetric detection was assayed.

3.1.3. Selection of the chromatographic conditions

The study of liquid chromatographic separation of the solid-phase extracted solution containing PEG-25 PABA and urine matrix fluorescent interferences showed that separation was not possible by a C18 column with the mobile phases and conditions assayed (pure DMF and 90:10 DMF/water mixtures). Higher percentage of water was unsuitable because it decreases the analytical signal.

However, as the molecular size of PEG-25 is higher than most of the urine compounds but lower than macromolecules (such as peptides), a size-exclusion column gave good resolution by using pure DMF as mobile phase.

In order to study the chromatographic procedure, 25 mL of a PEG-25 PABA free human urine (blank) were passed through the SPE system, 10 mL of water were used for the washing step and then eluted with 4 mL of DMF. The eluted solution was collected in a volumetric flask and diluted to 5 mL with DMF. This blank solution as well as a 160 ng mL⁻¹ PEG-25 PABA in DMF standard solution were injected into the chromatographic system (50 µL) comprising an analytical size-exclusion column and a precolumn (see Section 2.1). Flow rates between 0.5 and 2 mL min⁻¹ were assayed. A 2 mL min⁻¹ flow rate was selected as this provided both lower retention time and lower width for the analyte peak with a reasonable pressure (2500 psi). Two chromatograms for a standard solution (a) and for a blank (PEG-25 PABA free urine) (b) are shown in Fig. 2 where PEG-25 PABA retention time is 4.5 min and good resolution with regard all the matrix bands, with the exception of a small peak appearing at 5.05 min, which did not cause interference if peak height was used as an analytical signal instead of the peak area. The shape of the PEG-25 PABA peak was very similar for each human urine sample studied, thus these conditions were considered suitable for all urine samples.

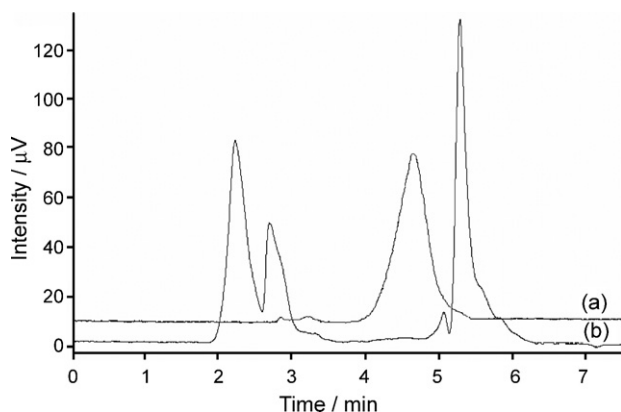


Fig. 2 – Chromatograms obtained for a PEG-25 PABA standard solution (160 ng mL⁻¹) (a) and for a blank (eluted solution coming from the SPE of a PEG-25 PABA free human urine) (b).

Table 1 – Analytical parameters obtained in the determination of PEG-25 PABA determination (see text for experimental conditions)

Linear range	Up to 1000 ng mL ⁻¹
Working range	20–1000 ng mL ⁻¹
Calibration line	$y = (1000 \pm 1000) + (450 \pm 5) \times (y = \text{high peak, } x = \text{ng mL}^{-1})$
R ²	0.9998
Sensitivity	450 ± 5 mL ng ⁻¹
Instrumental limit of detection	13 ng mL ⁻¹ (in the DMF solutions) (value estimated as 3 S _{y/x} /b, being b the slope of the calibration line)
Sample limit of detection	2.6 ng mL ⁻¹ (in the urine samples)

3.2. Analytical features of the method

3.2.1. Chromatographic parameters

The following results related to the precision were obtained from 5 injections of a PEG-25 PABA solution in DMF (112 ng mL⁻¹): mean retention time ± standard deviation of the results = 4.531 ± 0.002 min, relative standard deviation for the analytical signal results = 1% for peak area signal and 1% for peak height signal.

3.2.2. Calibration parameters

Table 1 gives a representative calibration line and the analytical parameters obtained in the liquid chromatographic determination of PEG-25 PABA with fluorimetric detection. The analytical parameters were suitable for this analytical case, with a detection limit in the order of 2.6 ng PEG-25 PABA per mL of urine sample.

3.2.3. Method accuracy

Method accuracy was studied by analysing 8 spiked human urine samples. Urine samples from 4 volunteers were free of PEG-25 PABA and were each spiked with 2 known amounts of the analyte. The obtained results ± standard deviation can be seen in Table 2.

The correlation line for the mean values of PEG-25 obtained using the proposed method vs. the added contents was studied. The line obtained was $y = (0.9 \pm 0.5) + (0.993 \pm 0.008) \times x$ ($r^2 = 0.9996$, $N = 8$), where x and y are expressed in ng mL⁻¹.

The confidence intervals were [0.97, 1.01] and [-2.1, 0.3] for slope and intercept, respectively (5% significance level, $N - 2 = 6$ degrees of freedom) which include the values of the ideal line (1 and 0, respectively), which shows the comparability of the obtained results with real spiked values.

The relative standard deviation of the concentration values obtained for the analyzed samples was in the order of 3–10%, with a mean value of 6%, indicating a good level of repeatability, taking into account that traces of PEG-25 PABA are determined.

3.2.4. Stability of the urine samples. Intra- and inter-day data

Due to the special features of biological samples, differences among analytical results obtained from inter-day studies may be due not only to the irreproducibility of the analytical method but also to sample decomposition. In order to

Table 2 – Results obtained for spiked human urine samples analysis

Volunteer	Age/years	Sex	Concentration in the human urine samples PEG-25 PABA/ng mL ⁻¹	
			Spiked	Obtained
1	26	Man	19	18 ± 1
			64	62 ± 5
2	27	Woman	82	79 ± 2
			100	99 ± 4
3	17	Woman	11	10 ± 1
			36	35 ± 2
4	23	Man	57	56 ± 3
			77	77 ± 4

determine both the stability of urine samples and the reproducibility of the proposed method, the following experiment was carried out. Two portions were taken from a PEG-25 PABA-free urine sample spiked with 150 ng mL⁻¹ of PEG-25 PABA. One of them was stored at room temperature (around 25 °C) and the other one in a refrigerator (7 °C), both in the dark. The analyte content of both portions was determined over the following 3 days. The obtained results indicated that samples must be analyzed during the first day after collection or stored in the refrigerator and used within 2 days, because longer conservation times lead to relative errors above 10%.

On the other hand, different PEG-25 PABA in DMF standards were prepared and measured immediately (day “zero”) and after 24, 48 and 72 h. The slopes of the calibration lines were compared with those obtained from standards prepared on day “zero” by the Student’s t-test. The statistical $t_{\text{experimental}}$ employed was calculated as $(b_1 - b_2) [S^2(1/n_1 + 1/n_2)]^{-1/2}$, where b_1 and b_2 are the slopes of the calibration lines, n_1 and n_2 are

the number of points of the lines and s is the pooled standard deviation. Results obtained for $t_{\text{experimental}}$ during the 3 days after preparation were lower than the $t_{\text{theoretical}}$ value (2.78) for a 5% significance level, thus indicating the stability of the solutions up to 3 days. The inter-day relative standard deviation obtained for the slopes was 2%.

3.3. Application of the proposed method to PEG-25 PABA determination in the urinary excretion of cosmetic users

In order to assess the usefulness of the proposed method, it was used to analyse urine from 3 volunteers (1 man and 2 women, aged between 17 and 55 years). The experiment was carried out as follows.

A urine sample was collected from each volunteer early in the morning (blank). Later the volunteers applied approximately 2 mg cm⁻² dose of sunscreen cream (containing 8%

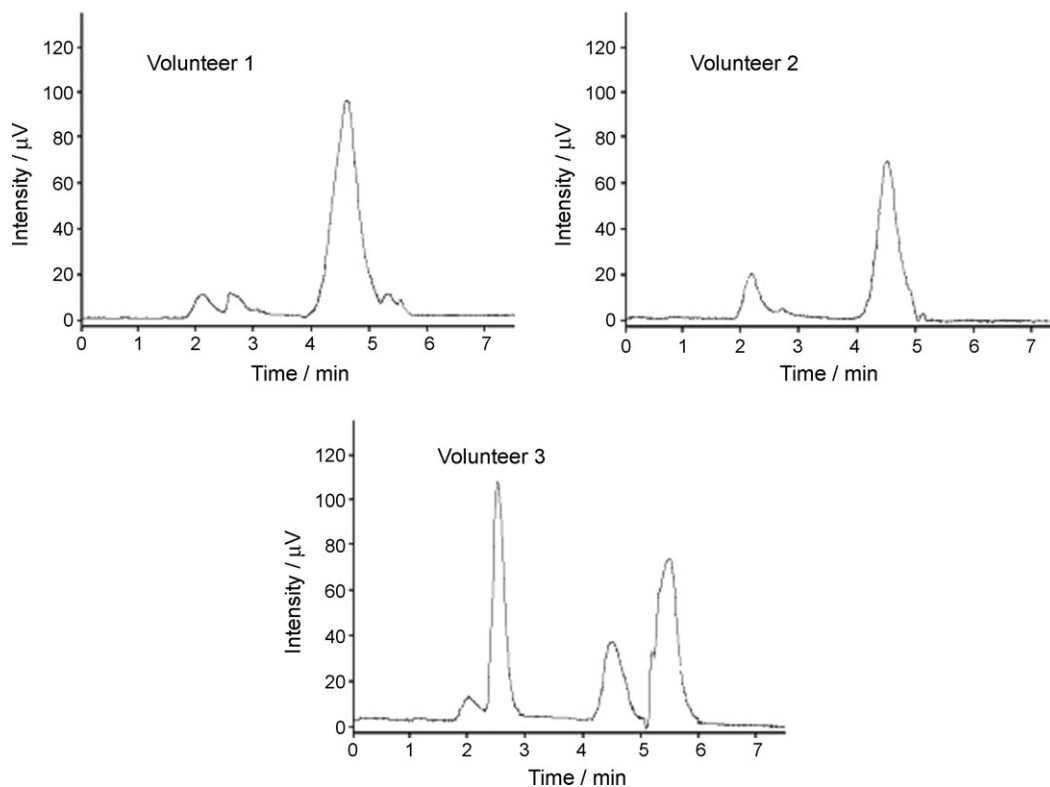


Fig. 3 – Chromatograms obtained for some urine samples taken from the volunteers.

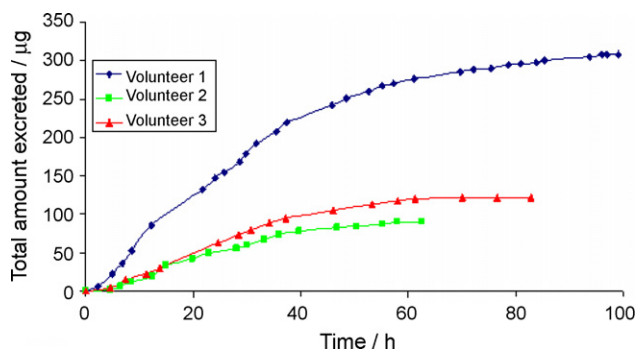


Fig. 4 – Kinetics of the urinary excretion of PEG-25 PABA for the three volunteers.

PEG-25 PABA) to their arms, legs and back. It must be emphasized that the total amount of sunscreen cream applied was different for each volunteer (20.5, 10.9 and 10.1 g for volunteers 1, 2 and 3, respectively) as their approximate body surface were different (1.03, 0.55 and 0.49 m², respectively). Volunteers waited 15 min before dressing to avoid product loss. The first urine sample (corresponding to the excretion before the cream was applied) was analyzed being PEG-25 PABA undetectable. Later, at every urinary evacuation, the total amount of excreted urine was collected, and its volume measured; 80 mL were kept and the rest was thrown away. The samples were stored in the refrigerator until the analysis. Fig. 3 shows an example of one of the chromatograms obtained for each volunteer.

The maximum concentration detected in the urine samples was 210 ng mL⁻¹ for volunteer number 1; 89 ng mL⁻¹ for volunteer 2; and 107 ng mL⁻¹ for volunteer 3. The average variation coefficient was 6%. In order to show the results more clearly, they are represented in terms of total µg excreted, according to the number of hours elapsed since the cream application. The kinetics of the urinary excretion of PEG-25 PABA for the three volunteers is shown in Fig. 4. Looking at the figure, one can see that between 60 and 90 h after application of the cream, the organism has eliminated most of the PEG-25 PABA. The percentage of PEG-25 PABA excreted in terms of the total applied was 0.019% for volunteer 1, 0.011% for volunteer 2 and 0.014% for volunteer 3, which gives an average of 0.015 ± 0.004%.

4. Conclusions

An analytical method has been developed here that is able to determine PEG-25 PABA in the urine of cosmetic users.

Despite the trace levels at which PEG-25 PABA is found in urine, the analysis can be carried out satisfactorily using the method proposed here, given that the detection level achieved is very low, just 2.6 ng mL⁻¹. The analytical method gives sta-

tistically accurate results. Furthermore, the results give an average precision of 6%.

In all three volunteers, one can observe that PEG-25 PABA is excreted through urine for up to 60–90 h after applying the cosmetic formulation under study and that urinary excretion is in the order of 0.015% of the total PEG-25 PABA applied.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support of the Spanish Ministry of Education for the research project CTQ2006-00296. A. Balaguer is also grateful for his grant.

REFERENCES

- [1] A. Salvador, A. Chisvert, *Anal. Chim. Acta* 537 (2005) 1.
- [2] A. Chisvert, A. Salvador, *UV Filters in Sunscreens and other Cosmetics. Regulatory Aspects and Analytical Methods in Analysis of Cosmetic Products*, Elsevier, Amsterdam, 2007.
- [3] D.L. Giokas, A. Salvador, A. Chisvert, *Trac-Trends Anal. Chem.* 26 (2007) 360.
- [4] U.M.D. Schauer, W. Volkel, A. Heusener, T. Colnot, T.H. Broschard, F. von Landenberg, W. Dekant, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 216 (2006) 339.
- [5] N.R. Janjua, B. Mogensen, A.M. Andersson, J.H. Petersen, M. Henriksen, N.E. Skakkebaek, H.C. Wulf, *J. Invest. Dermatol.* 123 (2004) 57.
- [6] H. Gonzalez, A. Farbrot, O. Larko, A.M. Wennberg, *Br. J. Dermatol.* 154 (2006) 337.
- [7] H. Gustavsson-Gonzalez, A. Farbrot, O. Larko, *Clin. Exp. Dermatol.* 27 (2002) 691.
- [8] V. Sarveiya, S. Risk, H.A.E. Benson, *J. Chromatogr. B* 803 (2004) 225.
- [9] T. Felix, B.J. Hall, J.S. Brodbelt, *Anal. Chim. Acta* 371 (1998) 195.
- [10] L. Vidal, A. Chisvert, A. Canals, A. Salvador, *J. Chromatogr. A* 1174 (2007) 95.
- [11] C.G.J. Hayden, M. Roberts, H.A.E. Benson, *Lancet* 350 (1997) 863.
- [12] F. Benech-Kieffer, W.J.A. Meuling, C. Leclerc, L. Roza, J. Leclaire, G. Nohynek, *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 16 (2003) 343.
- [13] A. Arancibia, G. Borie, E. Cornwell, C. Medrano, *Farmaco Edizione Practica* 36 (1981) 357.
- [14] L.H. Wang, W.S. Huang, H.M. Tai, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007) 1430.
- [15] M.T. Vidal, A. Chisvert, A. Salvador, *Talanta* 59 (2003) 591.
- [16] A. Balaguer, A. Chisvert, A. Salvador, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 40 (2006) 922.
- [17] P. Tornero, M. De Barrio, M.L. Baeza, T. Herrero, *Contact Dermatitis* 51 (2004) 57.
- [18] W. Uter, H. Lessman, J. Geier, D. Becker, T. Fucks, G. Richter, *Allergy* 57 (2002) 319.
- [19] A. Darvay, I.R. White, R.J. Rycroft, A.B. Jones, J.L. Hawk, J.P. McFadden, *Br. J. Dermatol.* 145 (2001) 597.
- [20] S. Schauder, H. Ippen, *Contact Dermatitis* 37 (1997) 221.
- [21] C. Couteau, N. Pere Cullel, A.E. Connan, L.J.M. Coiffard, *Int. J. Pharm.* 222 (2001) 153.

Desarrollo de un método cromatográfico limpio para la determinación simultánea de ácido kójico y arbutina en productos cosméticos para el blanqueamiento de la piel

AMPARO SALVADOR, ANGEL BALAGUER, JUDIT SISTERNES, ALBERTO CHISVERT

Dirección: Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad de Valencia, C/ Doctor Moliner, 50, 46100-Burjassot, Valencia
Tel.: +34-96 354 31 75. e-mail: amparo.salvador@uv.es (Prof. Amparo Salvador)
Web: <http://www.uv.es/gicapc/index.wiki> (Grupo de Investigación para el Control Analítico de los Productos Cosméticos)

INTRODUCCIÓN

Los cosméticos para el blanqueamiento de la piel (o despigmentantes) constituyen actualmente uno de los grupos de productos de mayor interés en el mercado de la cosmética de tratamiento, ya que permiten eliminar o mejorar considerablemente el aspecto de algunas manchas que aparecen en la piel por el paso del tiempo, problemas hormonales, toma de algunos medicamentos, etc.

La hidroquinona ha sido históricamente el agente despigmentante más utilizado, pero la restricción de 2000 de la directiva de productos cosméticos en la que se restringe su uso solo en colorantes de oxidación para el tinte del cabello y en sistemas de uñas artificiales [1], ha generado un mayor desarrollo de otros activos despigmentantes tales como el ácido kójico (AK) y la arbutina (AR), cuya estructura se muestra en la Figura 1.

El objetivo del presente trabajo es el desarrollo y puesta a punto de un método limpio basado en la cromatografía líquida (CL) (en inglés *High Performance Liquid Chromatography* ó *HPLC*) con detección en el ultravioleta (UV) para la determinación simultánea de AK y AR, activos que a menudo se utilizan juntos en las modernas formulaciones cosméticas despigmentantes ya que su combinación suele conducir a mejores resultados. No se han incluido en este estudio otros despigmentantes tales como el ácido ascórbico y sus derivados, o el kójico dipalmitato, ya que fueron objeto de publicaciones previas de nuestro grupo [2-3].

No existen métodos oficiales de análisis para la determinación de agentes despigmentantes en productos cosméticos (excepto para la hidroquinona y alguno de sus éteres), aunque se pueden encontrar algunos artículos en la bibliografía analítica tal y como queda reflejado en una reciente publicación sobre métodos de análisis de productos cosméticos [4].

En cuanto a los activos aquí estudiados, en la bibliografía se pueden encontrar algunos métodos analíticos publicados para la determinación de AK [5-10] , y AR [7-9, 11-14]. La mayor parte de ellos se basan en el uso de la CL, aunque también se han utilizado técnicas afines a las cromatográficas, así como diferentes técnicas electroanalíticas.

Debido a que el control de calidad del sector cosmético requiere la realización del análisis de un gran número de muestras, es necesario disponer de métodos analíticos ecológicos y seguros para el operador. Sin embargo, los métodos anteriormente mencionados no pueden considerarse limpios ya que no se

utilizan disolventes inocuos para el operador y/o el medio ambiente. Por ello, la finalidad del presente trabajo ha sido diseñar un método de análisis limpio y rápido, que permita la determinación simultánea de AR y AK.

PARTE EXPERIMENTAL

Aparatos

Se utilizó un cromatógrafo de líquidos, con una bomba de alta presión modelo L-7100 con sistema de gradiente y con detector UV de fila de diodos modelo L-7455 (Merck Hitachi). Se empleó una columna analítica C₈ (LiChrospher® 60 RP-Select B (250 x 4 mm, 5µm) de Merck) y una válvula de inyección con bucle de 20 µL (Rheodyne). Se utilizó también una columna analítica C₁₈ (LiChrospher® 100 RP-18 (125 x 4 mm, 5µm) de Merck) en la etapa del estudio del método de análisis. En la Figura 2 se muestra una imagen del dispositivo instrumental.

Se utilizó un baño de ultrasonidos Selecta (Torrecilla) para facilitar la solubilización de los analitos.

Reactivos y muestras

Patrones: arbutina (AR) (>99%) (Bioland Ltd, Chungnam, Korea) y ácido kójico (AK) (99,2%) (Guinama, Valencia, España)

Disolventes: etanol absoluto (EtOH) grado HPLC (Scharlau Chemie, S.A Barcelona, España), ácido acético glacial grado HPLC (Scharlau Chemie, S.A Barcelona, España), agua desionizada obtenida a través de un sistema NANOpure II de Barnstead (Boston, EEUU).

Muestras: Siete muestras de cremas despigmentantes comerciales procedentes de diferentes laboratorios cosméticos conteniendo los analitos y otros componentes (hidratantes, emulgentes, conservantes, etc.). Una crema despigmentante sintética preparada en nuestro laboratorio (conteniendo concentraciones conocidas de los analitos y otros componentes habituales en este tipo de productos)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudio de las variables cromatográficas experimentales

Se estudiaron diferentes variables que influyen en la determinación tales como la composición de la fase móvil, el caudal y el gradiente de elución.

-Estudio preliminar con columna analítica C₁₈ de 125 mm de longitud

Se escogió como fase móvil una mezcla de EtOH y agua, con una pequeña proporción de ácido acético como tampón. Se ensayó esta fase móvil empleando una columna estándar C₁₈ de 125 mm de longitud.

Se prepararon mezclas de EtOH y ácido acético al 1% de distintas proporciones (entre 0% y 10% de EtOH). Estas mezclas se prepararon con distintos pH de la disolución de ácido acético que oscilaban entre 2,5 y 5,0.

El procedimiento experimental seguido fue el siguiente: se acondicionó la columna con la fase móvil a estudiar durante 15 minutos a un caudal constante

de 0,5 mL/min. Se inyectaron 20 μ L de una disolución patrón multicomponente conteniendo 60 μ g/ml de AR y AK. Se obtuvieron los cromatogramas correspondientes realizando la detección a una longitud de onda de 280 nm. No se obtuvo buena separación de los analitos considerados en ningún caso. Tampoco mejoraron los resultados trabajando solo con ácido acético al 1% como fase móvil, ni modificando el caudal en el transcurso de la separación cromatográfica.

Por tanto se optó por realizar ensayos con una columna algo más polar y de mayor longitud. Se utilizó una columna analítica C₈, cuyos resultados se discuten a continuación.

-Estudio del efecto de la composición de la fase móvil empleando una columna C₈ de 250 mm de longitud

Se realizaron ensayos preliminares con una columna C₈ de 250 mm en las mejores condiciones obtenidas con la columna C₁₈ de 125 mm que correspondían a un pH de 2,5. Se consiguieron separar con buena resolución AR y AK trabajando con proporciones de EtOH en la fase móvil comprendidas entre 5-10 % y un caudal de 1 ml/min. Con un 5 % EtOH el pico del AK presentaba una cola que se corregía cuando la fase móvil contenía un 10 % de EtOH. Finalmente se ensayaron fases móviles a diferentes pHs con un 10 % de EtOH y no se obtuvieron mejoras en la resolución de los picos. Se optó por utilizar un 10% de EtOH y un 90% tampón pH 2,5 (disolución acuosa de ácido acético al 1%).

-Estudio del efecto del aumento de caudal

Se realizó un estudio del caudal de la fase móvil, ensayando caudales entre 0,5 y 2 ml/min. Se observó que con un caudal de 0,5 ml/min se obtenían picos demasiado anchos, en cambio con caudales de 1,5 y 2 ml/min se obtenían picos solapados.

A continuación se modificó el caudal de 1 ml/min a 2 ml/min pero a un tiempo anterior a la elución del AK para mejorar la forma del pico. El procedimiento experimental fue el mismo que en el apartado anterior. No se obtuvo ninguna mejoría apreciable, por tanto se optó por trabajar con un caudal de 1 ml/min.

Descripción del método propuesto

-Procedimiento para la preparación de las muestras

Se pesa, por triplicado, cantidades de muestra comprendidas entre 0,007-0,2 g (en función del contenido) en un matraz aforado de 10 ml, se añade 1 ml de EtOH, un pequeño volumen de disolución de AcOH al 1% (pH = 2,5) y se homogeneiza. Posteriormente se enrasa con esta misma disolución de AcOH y se introduce en el baño de ultrasonidos durante 15 minutos. Se deja enfriar y se filtran unos pocos mililitros de disolución a través de una micromembrana de Nylon de tamaño de poro de 0,45 μ m. Esta disolución filtrada es la que se inyectará en el sistema cromatográfico.

-Preparación de las disoluciones patrón

Se prepara una disolución patrón multicomponente de 1000 μ g/ml de AK y AR, empleando como disolvente una mezcla EtOH:AcOH (1%) (10:90). A partir de esta disolución, se preparan disoluciones diluidas de concentración variable

entre 20 y 100 µg/ml empleando el mismo disolvente. Las disoluciones de las muestras y de los patrones se inyectan a través de micromembrana de nylon de tamaño de poro de 0,45 µm en el sistema cromatográfico.

-Procedimiento cromatográfico

La elución de los analitos se realiza en modo isocrático utilizando como fase móvil una mezcla de EtOH:AcOH (1%) (10:90).

Se trabaja con un caudal constante de 1 ml/min.

El volumen del bucle de inyección es de 20 microlitros.

La detección se efectúa a 265 nm para el AK y 280 nm para la AR.

Se utiliza como señal analítica el área de los picos y la calibración se realiza de modo convencional.

Mediante las disoluciones patrón de ambos analitos, se obtienen las dos rectas de regresión (área vs concentración) y se interpolan los valores de las áreas de las muestras. Para obtener la concentración de AK y AR en las muestras se debe tener en cuenta el factor de dilución correspondiente.

Validación del método propuesto

-Precisión de las lecturas de las áreas de los picos cromatográficos y de los tiempos de retención

Se estimó la precisión de las lecturas de los tiempos de retención y de las áreas mediante la realización de 5 medidas de una disolución patrón multicomponente de 60 µg/ml de AK y AR. A continuación se muestran los resultados obtenidos que muestran los valores medios obtenidos.

La precisión obtenida tanto para los tiempos como para las áreas es buena. Los coeficientes de variación de las áreas están comprendidos entre 0.6 % y 2 %, por lo que no se considera necesaria la utilización de calibrado con patrón interno.

-Parámetros relacionados con la calibración

En la tabla siguiente se indican los parámetros de las rectas de regresión obtenidas en el intervalo de concentraciones utilizado.

La sensibilidad del método para cada analito se puede estimar mediante el valor de la pendiente de su curva de calibración (b).

El límite de detección instrumental (LD) se puede estimar a partir de la desviación estándar de los residuales y de la pendiente de la curva de calibración mediante la expresión: $LD = S_{y/x} / b$. Para AK es 1,0 µg/ml y para AR es 1,9 µg/ml. Estos valores son adecuados para la determinación de los analitos en las muestras cosméticas.

-Estimación de la exactitud mediante el análisis de una muestra sintética

Se aplicó el método propuesto a una muestra sintética preparada en nuestro laboratorio y que contenía por tanto concentraciones conocidas de AK y AR así como también otros ingredientes habituales en este tipo de productos cosméticos.

En la Tabla 3 se indican los valores de concentración hallados (C) y los valores reales (µ).

Los errores relativos son bajos, indicando una buena exactitud del método.

-Aplicación del método propuesto a muestras reales

Se analizaron 7 muestras comerciales de cremas despigmentantes.

A modo de ejemplo, en la Figura 3 se muestran los cromatogramas obtenidos tanto para la muestra sintética como para las 7 muestras comerciales. Estos cromatogramas se han obtenido a 270 nm, siendo esta una longitud de onda de compromiso. No obstante, recordemos que el uso del detector de fila de diodos permite poder determinar cada uno de los analitos a la longitud de onda de máxima absorbancia (265 nm para AK y 280 nm para HQ), lo que mejora la sensibilidad del método.

Así, se observa el pico de AR a 3,06 min y el pico de AK a 3,43 min; en algunas muestras se observan también picos debidos a otros componentes de las muestras que presentan absorción molecular a dicha longitud de onda.

En la Tabla 4 se indican los resultados obtenidos para cada muestra así como las desviaciones estándares correspondientes. Los coeficientes de variación de las concentraciones obtenidas están comprendidos entre 1-5%.

Cabe indicar que, como complemento a este estudio, se analizaron también las muestras mediante otro método basado en la cromatografía de gases con detección mediante espectrometría de masas (CG-EM) que estamos desarrollando también en nuestro grupo de investigación y que se publicará en breve [15].

Los resultados obtenidos mediante el método limpio propuesto (CL-UV) tanto para AR como para AK se compararon con los obtenidos mediante CG-EM, mediante un test estadístico basado en el parámetro t "Student". Se obtuvo comparabilidad estadística para todas las muestras para un nivel de probabilidad del 95 %.

CONCLUSIONES

El método propuesto (CL-UV) permite la determinación conjunta de AK y AR en productos cosméticos con un tiempo de desarrollo inferior a 4 minutos, y buenos límites de detección.

Se puede considerar un método de análisis limpio, tanto en la preparación de la muestra como en el procedimiento cromatográfico.

AGRADECIMIENTOS

A. Balaguer desea agradecer al Ministerio de Ciencia y Tecnología su Beca Predoctoral. Los autores agradecen igualmente al Ministerio la subvención concedida al Proyecto de Investigación CTQ2006-00296.

Los autores también agradecen la colaboración de Dña. Ana Torrens Tomás de la empresa Corporación Dermoestética (Massalfasar, Valencia, España).

Deseamos también mencionar la contribución de nuestra compañera de grupo de investigación la Prof. Carmen Pascual Martí que falleció el pasado año, junto con quien iniciamos hace años nuestros primeros pasos en el empleo de las técnicas cromatográficas.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Vigesimocuarta Directiva 2000/6/CE de la Comisión, de 29 de febrero de 2000, *por la que se adaptan al progreso técnico los anexos II, III, VI y VII de la Directiva 76/768/CEE del Consejo relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en materia de productos cosméticos.*
- [2] Balaguer A, Chisvert A, Salvador A. Environmentally friendly LC for the simultaneous determination of ascorbic acid and its derivatives in skin-whitening cosmetics. *Journal of Separation Science* 2008; 31 (2): 229-236.
- [3] Balaguer A, Salvador A, Chisvert A. A rapid and reliable size-exclusion chromatographic method for determination of kojic dipalmitate in skin-whitening cosmetic products. *Talanta* 2008; 75 (2): 407-411.
- [4] Chisvert A, Balaguer A, Salvador A. Tanning and whitening agents in cosmetics. Regulatory aspects and analytical methods. En el libro de Salvador A, Chisvert A (Editores): *Analysis of Cosmetics Products*. Amsterdam: Elsevier, 2007; 128-140.
- [5] Shih Y, Zen JM. Voltammetric determination of kojic acid in cosmetic bleaching products using a disposable screen-printed carbon electrode. *Electroanalysis* 1999; 11 (4): 229-233.
- [6] Shih Y. Simultaneous determination of magnesium L-ascorbyl-2-phosphate and kojic acid in cosmetic bleaching products by using a microbore column and ion-pair liquid chromatography. *Journal of AOAC Internacional* 2001; 84 (4): 1045-1049.
- [7] Masse MO, Duvallet V, Borremans M, Goeyens L. Identification and quantitative analysis of kojic acid and arbutin in skin-whitening cosmetics. *International Journal of Cosmetic Science* 2001; 23 (4): 219-232.
- [8] Huang SC, Lin CC, Huang MC, Wen KC. Simultaneous determination of magnesium ascorbyl phosphate, ascorbyl glucoside, kojic acid, arbutin and hydroquinone in skin whitening cosmetics by HPLC. *Journal of Food and Drug Analysis* 2004; 12 (1): 13-18.
- [9] Liu S. Simultaneous determination of magnesium L-ascorbyl-2-phosphate, arbutin and kojic acid in cosmetics by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Sepu* 2004; 22 (6): 660-660.
- [10] Xie HL, Tan YG, Hu BN, Hu HX. Determination of kojic acid in cosmetics by ion-pair high performance liquid chromatography. *Huaxue Shiji* 2005; 27 (3): 153-157.
- [11] Teglia A. Cosmetic products for lightening the skin: HPLC determination of hydroquinone and its monoglucoside (arbutin). *Cosmetic & Toiletries (Edición italiana)* 1989; 10 (4): 6-26.
- [12] Shih Y, Zen JM. An electrochemical sensor based on a clay-coated screen-printed electrode for the determination of arbutin. *Analytica Chimica Acta* 2000; 412 (1-2): 63-68.
- [13] Chang ML, Chang CM. Simultaneous HPLC determination of hydrophilic whitening agents in cosmetic products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2003; 33(4): 617-626.
- [14] Cheng-Hui L, Hsin-Lung W, Yeou-Lih H. Microdialysis sampling coupled to on-line high-performance liquid chromatography for determination of arbutin in whitening cosmetics. *Journal of Chromatography B* 2005; 829 (1-2): 149-152.
- [15] Chisvert A, Sisternes J, Balaguer A, Salvador A. Development and validation of a gas chromatography-mass spectrometry method to determine

skin-whitening agents in cosmetic products: fraud detection. *Resultados no publicados.*

Pies de figures.

Figura 1. Fórmulas moleculares de los agentes despigmentantes estudiados.

Figura 2. Cromatógrafo de líquidos utilizado.

Figura 3. Cromatogramas obtenidos para las muestras analizadas.

Encabezados de tablas.

Tabla 1. Repetibilidad de los valores de los tiempos de retención y de las áreas.

Tabla 2. Rectas de regresión obtenidas para los analitos estudiados.

Tabla 3. Comparación de los valores obtenidos en el análisis de la muestra sintética con los reales.

Tabla 4. Resultados obtenidos en el análisis de muestras comerciales mediante CL con detección UV.

1 **Development and validation of a gas chromatography-mass spectrometry**
2 **method to determine skin-whitening agents in cosmetic products: fraud**
3 **detection.**

4
5 Alberto Chisvert*, Judit Sisternes, Ángel Balaguer, Amparo Salvador

6
7 Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad de Valencia,
8 46100 Burjassot, Valencia, Spain.

10
11 **Abstract**

12 An analytical method is proposed here to determine three allowed (kojic acid,
13 azelaic acid and arbutin) and two forbidden (resorcinol and hydroquinone) skin-
14 whitening agents in cosmetics. The method is based on gas chromatography coupled
15 with mass spectrometry detection, which allows the two prohibited target compounds to
16 be identified unequivocally by means of their mass spectra acquired in full-scan mode
17 at the retention time of these compounds.

18 Owing to their low volatility, target analytes are converted to their
19 trimethylsilylethers by using N,O-bis-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) as
20 derivatizing agent prior to injection into the chromatographic system.

21 Preliminary experiments were carried out in order to select the amount of
22 derivatizing agent. Afterwards, the chromatographic conditions were studied and
23 selected in terms of resolution and run time analysis.

24 The accuracy and precision of the proposed method was evaluated by analysing
25 a laboratory-made skin-whitening cosmetic sample containing the five target
26 compounds.

27 The method can be easily applied by the manufacturers in the quality control of
28 their own products, and also by safety authorities to prevent fraudulent operations and
29 thus look after consumers' health.

30
31 **Keywords:** Cosmetic; Gas chromatography-mass spectrometry; Skin-bleaching Agent; Skin-
32 whitening Agent

33
34
35 * Corresponding author: Tel.: +34 96 354 49 00; Fax: + 34 96 354 44 36
36 e-mail address: alberto.chisvert@uv.es (A. Chisvert)

37 1. Introduction

38

39 Currently, brown skin-spots or staining represent one of the most important
40 aesthetic problems in humans [1]. This skin disorder, consequence of melanin excess
41 produced by hyperactivity of melanocytes, could have different causes, such as
42 overexposure to solar radiation, ageing, or they can also be caused by hormonal
43 dysfunctions during pregnancy or taking certain medicines like contraceptives, among
44 others [2-4].

45 Although these spots are not normally harmful to the health, many people are
46 affected by them and seek specialist advice to try to remove these anti-aesthetic marks
47 from their skin. Thus, apart from the most serious cases, which could require medical
48 treatment, in most cases a cosmetic treatment can be employed, based on skin-
49 whitening (also referred to as skin-bleaching) products. These products contain the so-
50 called skin-whitening agents, which act by inhibiting melanin biosynthesis via different
51 mechanisms [5-7].

52 Different compounds have been used as skin-whitening agents in cosmetics [8].
53 Among them, hydroquinone (HQ) (see Figure 1) is one the most commonly used due to
54 its well-know effectiveness [9-10]. Its use as a whitening agent in cosmetics (up to 2%)
55 was first approved in the European Union in 1984 by the Commission Directive
56 84/415/EEC [11]. However, its use was restricted to hair-dye products and artificial nail
57 systems sixteen years later by Commission Directive 2000/6/EC [12], since different
58 safety problems were attributed to its use in skin-whitening cosmetics, such as
59 ochronosis, irritation, allergy [10,13-14], and particularly due to its carcinogenic
60 properties over long-term use [15]. Furthermore, there is evidence of its percutaneous
61 absorption and it has been found present in the body fluids of users of skin-whitening
62 cosmetics containing HQ [16-17], which makes its toxic potential more serious.
63 Nevertheless, it can be used in specialised pharmaceutical products, which are not
64 considered cosmetics, thus being regulated by the legislation concerning

65 pharmaceutical products. Likewise, in the United States framework, HQ was allowed at
66 concentrations up to 1.5-2% (higher concentrations are only permitted in prescription
67 drugs) in skin-whitening products [18], which are considered over-the-counter drugs,
68 but it has recently been banned in this type of product by the United States Food and
69 Drug Administration [19].

70 Whitening properties have also been attributed to resorcinol (RS), an isomer of
71 HQ (see Figure 1) [20-21], but its use as a whitening agent is not permitted in either the
72 European Union or United States.

73 Arbutin (ARB), which is a glucosylic ether of HQ (see Figure 1), has been
74 proposed as a good alternative to HQ. Although it is less effective it does not present
75 the side-effects attributed to the use of HQ. Other skin-whitening agents used at length
76 are kojic acid (KA) and azelaic acid (AZA) (see Figure 1), although they are much less
77 effective than HQ. Nevertheless, it should be mentioned that contact allergies have
78 been also reported for KA [22] and, moreover, carcinogenic properties have been
79 detected in laboratory mice in studies monitoring oral ingestion [23]. At habitually used
80 concentrations AZA does not normally cause serious side-effects [24], with only
81 moderate erythemas and transitory irritations having been detected. Ascorbic acid and
82 its derivatives have also been used at length as whitening agents, although their
83 effectiveness is also lower than HQ. On the other hand no substantive dermatological
84 problems have been associated to them [25].

85 Taking all this into account, skin-whitening products should be controlled for
86 various reasons: on one hand, by the manufacturers themselves, in order to assure
87 that they contain the correct amount of whitening agent, i.e. to assure the efficacy of
88 these products; and, on the other hand, by safety authorities, to prevent fraudulent use
89 of both HQ and RS in this type of product, i.e. to assure user safety.

90 No official analytical methods have been found in the literature, except those
91 proposed by the EU Commission [26] and the United States Pharmacopeia [27]. In the
92 former, HQ (and some of its ethers, with the exception of ARB) can be identified by

93 means of thin-layer chromatography (TLC), followed by their quantitative determination
94 using liquid chromatography (LC) with ultraviolet/visible detection. In the latter, HQ can
95 be determined by means of titration with cerium sulphate using diphenylamine as
96 indicator.

97 Therefore, the development and validation of analytical methods to control skin-
98 whitening cosmetic products is of great interest, as they will assure the efficacy and
99 safety of this type of cosmetic product.

100 A bibliographic search revealed more than 30 publications focusing on the
101 determination of skin-whitening agents in cosmetics, which were recently critically-
102 reviewed [8]. Analytical techniques where determination is carried out in the liquid
103 phase are preferred over others dealing with the vapour phase, owing to the low
104 volatility of these compounds, with LC being the technique of choice [28-32]. Capillary
105 electrochromatography [33], micellar electrokinetic chromatography [34] and micellar
106 electrokinetic capillary electrophoresis [35] have been used to a much lesser extent.
107 There are also a few papers where the determination is performed by electroanalytical
108 techniques, such as differential pulse voltammetry [36-38], cyclic voltammetry [39-40]
109 and amperometry [41]. On the contrary, there is only one published article using gas
110 chromatography (GC) [42], which describes HQ determination.

111 Taking all this into account, the aim of this paper focuses on developing and
112 validating a reliable analytical method to determine three of the most commonly used
113 skin-whitening agents (ARB, KA and AZA), which are often combined in modern skin-
114 whitening cosmetics, as well as two prohibited skin-whitening agents (HQ, RS) using
115 the potential GC offers. In order to increase their volatility, analytes are converted to
116 their trimethylsilylethers, by using N,O-bis-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) as
117 derivatizing agent. Moreover, the method couples GC with a mass-spectrometry (MS)
118 detector, enabling forbidden skin-whitening agents to be detected at very low
119 concentrations by means of acquisition in selected ion monitoring (SIM) mode, as well

120 as reliably identifying them by means of their complete mass spectra acquired in full-
121 scan (FS) mode.

122 Ascorbic acid and its derivatives are excluded from this study, owing to their low
123 volatility. Moreover, they were considered in a previous work where authors of this
124 paper proposed their determination via a LC method [32].

125 To our knowledge, there are no published papers reporting RS determination in
126 skin-whitening cosmetics, and neither has a wide-ranging analytical method been
127 published to determine HQ, ARB, KA and AZA together. Thus, this is the first report
128 where these skin-whitening agents are determined simultaneously.

129

130

131 **2. Experimental**

132

133 2.1. Apparatus

134

135 An Agilent 6890N gas chromatograph, equipped with an Agilent 7683
136 autosampler and coupled to an Agilent 5973 mass spectrometry detector, from Agilent
137 Technologies (Palo Alto, CA, USA) was employed. A Zebron ZB-5ms (95% dimethyl-
138 5% phenylpolysiloxane, 30 m, 0.25 mm i.d., 0.25 μ m film thickness), analytical column
139 from Phenomenex¹ (Torrance, CA, USA) was used.

140 An ultrasonic water bath from Selecta (Valencia, Spain) was used to improve the
141 extraction of the analytes.

142

143 2.2. Reagents and samples

144

145 High-purity helium (99.9999%) from Carbueros Metálicos S.A. (Paterna, España)
146 was used as carrier.

147 Arbutin (ARB) >99% from Bioland Ltd. (Chungnam, Korea), and kojic acid (KA)
148 99.2%, hydroquinone (HQ) >99%, resorcinol (RS) >99% and azelaic acid (AZA) >99%
149 all from Guinama S.L. (Valencia, Spain) were used as standards. Caffeine 99.4%, used
150 as internal standard, was also purchased in Guinama S.L.

151 LC-grade N,N-dimethylformamide (DMF) from Scharlau Chemie (Barcelona,
152 Spain) was used as solvent to prepare standard and sample solutions.

153 N,O-bis-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) containing 1%
154 trimethylchlorosilane from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) was used as
155 derivatizing agent for GC analysis.

156 Nine commercial skin-whitening cosmetics (A-K) were analysed. They were from
157 different laboratories. For confidential reasons the names will not be shown.

158 A laboratory-made skin-whitening cream (LM) containing different amounts of the
159 target skin-whitening agents (0.60%, 1.01%, 1.07%, 2.17% and 2.31%, for RS, HQ,
160 KA, AZA and ARB, respectively) were prepared in our laboratory. These formulations
161 contained different usual cosmetic ingredients employed in this type of cosmetics
162 (emollients, surfactants, smoothing agents, UV filters, moisturizing agents,
163 preservatives), which were of cosmetic-grade and were provided by Guinama S.L.

164

165 2.3. Proposed method

166

167 Each sample was homogenized and, in triplicate, 0.007-0.2 g was weighed into a
168 10 mL volumetric flask, and dissolved in approximately 5 mL of DMF. In order to
169 accelerate the solubility, an ultrasonic water bath was used for 10 minutes. Next, the
170 mixture was left to reach room temperature and diluted to the mark with the same
171 solvent. Finally, the solution was filtered through a 0.45 μm nylon membrane filter.

172 A multi-component stock standard solution containing 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of RS and 400
173 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of HQ, KA, AZA and ARB was prepared in DMF, and adequately diluted using

174 the same solvent to prepare a set of standard solutions ranging from 1 to 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$
175 for RS and 5 to 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for the other analytes.

176 A stock solution containing 700 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of caffeine was also prepared in DMF.

177 200 μL of sample or standard solution were placed in a 1.5 mL injection vial.
178 Afterwards, 50 μL of caffeine solution and 100 μL of BSTFA were added to the vial,
179 and the trimethylsilylethers were formed.

180 These solutions were injected into the GC-MS system in SIM mode under the
181 conditions shown in Table 1. Internal standard calibration (using caffeine as internal
182 standard) was used by plotting analyte area/caffeine area versus analyte
183 concentration.

184 If any sample contained any of the prohibited skin-whitening agents under study
185 (i.e. HQ and RS), it was re-injected in FS acquisition mode, in order to identify them by
186 comparing the mass spectrum (as well as their retention time).

187

188

189 **3. Results and discussion**

190

191 **3.1. Study of the amount of BSTFA needed**

192

193 Owing to the low volatility of the target analytes, a derivatization step was
194 necessary. BSTFA (with 1% trimethylchlorosilane) in DMF was selected as
195 derivatizing agent, since the reaction took place rapidly at room temperature. As is
196 well-know, when a silylating agent is used, the OH moieties are turned into
197 trimethylsilyl ethers, and the COOH moieties into trimethylsilyl esters, being these
198 derivatives more volatile than the parent compounds. In this sense, the proposed
199 chemical structure for the target analytes, after silylation, is shown in Figure 2, which
200 was confirmed later by means of their mass spectra by comparing with the NIST Mass
201 Spectral Library.

202 Therefore, the amount of necessary BSTFA was studied in a preliminary study.
203 For this purpose, a relatively high amount of a model sample was weighed (0.2 g) in a
204 10 mL volumetric flask. An aliquot of the multi-component standard solution was added
205 in order to have, at least, $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ of the target analytes, and afterwards was diluted
206 to the mark with DMF. $200 \mu\text{L}$ of this solution was mixed with $50 \mu\text{L}$ of caffeine ($200 \mu\text{g}$
207 mL^{-1}) in a 1.5 mL injection vial. Volumes ranging from 25 to $200 \mu\text{L}$ of BSTFA were
208 added at room temperature to different vials, and DMF was also added to reach to an
209 equal volume of $450 \mu\text{L}$ in all the assayed vials. The resulting solutions were injected
210 into the GC-MS system (see conditions in Table 1, except for oven temperature, which
211 was set at 120°C (1 min), $10^\circ\text{C}/\text{min}$, 280°C (5 min). Results (not shown) revealed that it
212 was necessary to add at least $75 \mu\text{L}$ of BSTFA. Nevertheless, $100 \mu\text{L}$ was preferred in
213 order to ensure the total derivatization of the analytes in case a greater amount of
214 sample should be needed.

215

216 3.2. Study of the chromatographic variables

217

218 In order to achieve the total chromatographic separation of the five target
219 analytes and the internal standard in the shortest run time analysis, the oven
220 temperature and carrier flow rate were studied (the rest of the conditions were set as in
221 Table 1), by injecting a derivatized standard solution of $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ of the target
222 analytes containing $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ of caffeine as internal standard. An initial temperature
223 of 120°C (for 3 min) was employed, and different oven temperature programmes
224 (ranged from 5 to $20^\circ\text{C}/\text{min}$) up to 280°C (maintained for 10 min) were tested. Flow
225 rates ranged from 0.4 to 1 mL min^{-1} . The best resolution with the lower run-time
226 analysis was achieved by using an oven temperature programme of $20^\circ\text{C}/\text{min}$ and a
227 carrier flow rate of 1 mL min^{-1} . More extreme conditions were not tested. Figure 3
228 shows a chromatogram obtained under the selected conditions. The obtained mass

229 spectrum for each peak, corresponding to each derivatized target analyte and caffeine
230 are shown in Figure 4.

231

232 3.3. Analytical figures of merit of the proposed method

233

234 The repeatability of the measurements was tested by injecting a derivatized
235 standard solution containing $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ of all the target analytes five times. Results are
236 shown in Table 2, displaying that high precision was achieved in both retention time
237 and area quotient.

238 The calibration parameters and limit of detection of the studied compounds are
239 also shown in Table 2.

240 To estimate the accuracy of this method a laboratory-made skin-whitening
241 cosmetic product was analysed (see chromatogram in Figure 5), which contained
242 known amounts of the analytes. The results are shown in Table 3. The obtained RSD
243 in concentration values ranged from 0.9 to 4.8%, showing precise results. The method
244 has a low relative error (<5%), which demonstrates the good accuracy of the results.

245

246 3.4. Application of the proposed method to the analysis of commercial skin-whitening 247 cosmetic products

248

249 The method was applied to determine the target skin-whitening agents in 9
250 commercial skin-whitening cosmetic products (data given in Table 4). As can be seen,
251 there were discrepancies between the results obtained and the label claims. On one
252 hand, samples F and H should have contained KA and AZA according to the label, but
253 no AZA was found when these samples were analyzed. However, HQ was found in its
254 place in sample F, while RS was found in sample H, even though both compounds are
255 not allowed in skin-whitening cosmetics. Furthermore, HQ was also found in sample E,
256 and RS in sample G, although they were not declared on the label given their use is

257 prohibited. These four samples were produced by the same manufacturer, who is
258 evidently committing fraud, using forbidden ingredients in their cosmetic formulations
259 that could cause damage to human health. Moreover, it should be pointed out that HQ
260 was present at a very high concentration (8.5% and 9.1%, for samples E and F,
261 respectively), which increases its toxicity to an even greater extent.

262 It should be pointed out that these four samples were re-injected in full-scan
263 acquisition mode in order to confirm these findings, by analysing the whole mass
264 spectrum. The mass spectra, jointly with the retention time, provided unequivocal proof
265 of the fraud.

266 Nevertheless, authors of this paper should emphasize that these are isolated
267 cases, and may not be widespread, taking into account the responsibility of the cosmetic
268 manufacture. To our knowledge, these samples were immediately removed from the
269 market after our findings.

270

271

272 **4. Conclusions**

273

274 A gas chromatography-mass spectrometry method is proposed to determine
275 three allowed and two forbidden skin-whitening agents in cosmetics, with good limits of
276 detection. The mass spectra obtained at the retention time of the target skin-whitening
277 agents, whose use is banned, provide unequivocal proof of their identification.

278 The proposed method is accurate and precise, as can be concluded by the
279 results obtained in the analysis of a laboratory-made skin-whitening sample.

280 The method can be easily applied both by the manufacturers themselves to
281 perform the quality control of their products, and by safety authorities in order to avoid
282 fraudulent operations and thus look after consumers' health.

283

284

285 **Acknowledgements**

286 The authors acknowledge the financial support of the Spanish Government
287 (Project CTQ2006-00296), especially A. Balaguer for his predoctoral grant. The
288 collaboration of Ana Torrens (from Corporación Dermoestética S.L., Paterna, Valencia,
289 Spain) is deeply acknowledged. Authors are also grateful to Prof. Isabel Fernández,
290 from Department of Organic Chemistry at University of Valencia, for her assistance in
291 the interpretation of mass spectra.

292 Authors would like to make special mention of the contribution of our colleague,
293 Prof. M.C. Pascual-Martí who passed away last year.

294

295 **References**

296

- 297 [1] M.D. Pawaskar, P. Parikh, T. Markowski, A.J. McMichael, S.R. Feldman, R.
298 Balkrishnan, *J. Dermatol. Treat.*, 18 (2007) 5.
- 299 [2] P.E. Grimes, *Arch. Dermatol.*, 131 (1995) 1453.
- 300 [3] M.I. Rendon, *J. Drugs Dermatol.*, 3 (2004) 827.
- 301 [4] P. Grimes, J.J. Nordlund, A.G. Pandya, S. Taylor, M. Rendon, J.P. Ortonne, J.
302 *Am. Acad. Dermatol.*, 54 (2006) S255.
- 303 [5] S. Briganti, E. Camera, M. Picardo, *Pigment Cell Res.*, 16 (2003) 101.
- 304 [6] J. Cabanes, S. Chazarra, F. Garcíacarmona, *J. Pharm. Pharmacol.*, 46 (1994)
305 982.
- 306 [7] L. Petit, G.E. Piérard, *Int. J. Cosmeti. Sci.*, 25 (2003) 169.
- 307 [8] A. Chisvert, A. Balaguer, A. Salvador, Tanning and whitening agents in
308 cosmetics. Regulatory aspects and analytical methods, in: A. Salvador, A.
309 Chisvert (Eds.), *Analysis of Cosmetics Products*, Elsevier, Amsterdam, 2007, p.
310 128.
- 311 [9] J.J. Nordlund, P.E. Grimes, J.P. Ortonne, *J. Eur. Acad. Dermatol. Venerol.*, 20
312 (2006) 781.
- 313 [10] Z.D. Draelos, *Dermatol. Therapy*, 20 (2007) 308.
- 314 [11] Fifth Commission Directive 84/415/EEC of 18 July 1984 adapting to technical
315 progress Annexes II, III, IV, V and VI to Council Directive 76/768/EEC on the
316 approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products.
- 317 [12] Twenty-fourth Commission Directive 2000/6/EC of 29 February 2000 adapting to
318 technical progress Annexes II, III, VI and VII to Council Directive 76/768/EEC on
319 the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic
320 products.
- 321 [13] J.G. Camarasa, E. Serra-Baldrich, *Contact Dermatitis*, 31 (1994) 57.

- 322 [14] A. Mahe, F. Ly, G. Aymard, J.M. Dangou, *Br. J. Dermatol.*, 148 (2003) 493.
- 323 [15] T.J. Kooyers, W. Westerhof, *J. Eur. Acad. Dermatol. Venerol.*, 20 (2006) 777.
- 324 [16] E.D. Barber, T. Hill, D.B. Shum, *Toxicol. Lett.*, 80 (1995) 167.
- 325 [17] R.C. Wester, J. Melendres, X. Hui, R. Cox, S. Serranzana, H. Zhai, D. Quan, H.I.
326 Maibach, *J. Toxicol. Environ. Health, A* 54 (1998) 301.
- 327 [18] Federal Register, Skin bleaching drug products for over-the-counter human use,
328 Tentative final monograph 47 (1982) 39108.
- 329 [19] Federal Register, Skin bleaching drug products for over-the-counter human use,
330 Proposed rule 71 (2006) 51146.
- 331 [20] K. Sakuma, M. Ogawa, K. Sugibayashi, K. Yamada, K. Yamamoto, *Arch. Pharm.*
332 *Research*, 22 (1999) 335.
- 333 [21] I. Kubo, I. Kinst-Hori, Y. Yokokawa, *J. Natur. Products*, 57 (1994) 545.
- 334 [22] M. Nakagawa, K. Hawaii, K. Kawai, *Contact Dermatitis*, 32 (1995) 9.
- 335 [23] T. Takizawa, K. Mitsumori, T. Tamura, M. Nasu, M. Ueda, T. Imai, M. Hirose,
336 *Toxicol. Sci.*, 73 (2003) 287.
- 337 [24] Z.D. Draelos, *Cutis* 74 (2004) 257.
- 338 [25] L.E. Espinal-Pérez, B. Moncada, J.P. Castanedo-Cazares, *Int. J. Dermatol.*, 43
339 (2004) 604.
- 340 [26] Commission Directive 95/32/EC of 7 July 1995 relating to methods of analysis
341 necessary for checking the composition of cosmetic products.
- 342 [27] United States Pharmacopeia 29th Revision and National Formulary 24th Revision,
343 2006, The United States Pharmacopeial Convention Inc., Rockville.
- 344 [28] L. Gagliardi, A. Amato, G. Cavazzutti, F. Chimenti, A. Bolasco, D. Tonelli, *J.*
345 *Chromatogr.*, 404 (1987) 267.
- 346 [29] S. Scalia, A. Bianchi, S. Villani, M. Guarneri, *Pharmazie*, 52 (1997) 929.
- 347 [30] M.-O. Masse, V. Duvallet, M. Borremans, L. Goeyens, *Int. J. Cosmet. Sci.*, 23
348 (2001) 219.
- 349 [31] C.-H. Lin, H.-L. Wu, Y.-L. Huang, *Anal. Chim. Acta*, 581 (2007) 102.

- 350 [32] A. Balaguer, A. Chisvert, A. Salvador, *J. Sep. Sci.*, 31 (2008) 229.
- 351 [33] C. Desiderio, L. Ossicini, S. Fanali, *J. Chromatogr. A*, 887 (2000) 489.
- 352 [34] I.K. Sakodinskaya, C. Desiderio, A. Nardi, S. Fanali, *J. Chromatogr.*, 596 (1992)
- 353 95.
- 354 [35] C.-C. Wang, S.-M. Wu, *Anal. Chim. Acta*, 576 (2006) 124.
- 355 [36] L.H. Wang, *Analyst*, 120 (1995) 2241.
- 356 [37] Y. Shih, J.M. Zen, *Anal. Chim. Acta*, 412 (2000) 63.
- 357 [38] M.-L. Chang, C.-M. Chang, *J. Food Drug Anal.*, 13 (2005) 205.
- 358 [39] I.C. Vieira, O. Fatibello-Filho, *Talanta*, 52 (2000) 681.
- 359 [40] O. Fatibello-Filho, I.C. Vieira, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 368 (2000) 338.
- 360 [41] M.E. Rueda, L.A. Sarabia, A. Herrero, M.C. Ortiz, *Anal. Chim. Acta*, 479 (2003)
- 361 173.
- 362 [42] W.-Y. Shang, Z.-J. Yang, L. Liu, Y. Li, *Fenxi Kexue Xuebao*, 18 (2002) 493.

Figure legends

Fig. 1. Molecular structure of the studied skin-whitening agents.

Fig. 2. Molecular structure of the studied skin-whitening agents after silylation.

Fig. 3. Total ion chromatogram of derivatized target analytes (1 = resorcinol bis(trimethylsilyl ether), 2 = hydroquinone bis(trimethylsilyl ether), 3 = kojic acid bis(trimethylsilyl ether), 4 = azelaic acid bis(trimethylsilyl ester) and 5 = arbutine penta(trimethylsilyl ether)), and caffeine. For experimental conditions see Table 1.

Fig. 4. Mass spectra of resorcinol bis(trimethylsilyl ether) (a), hydroquinone bis(trimethylsilyl ether) (b), kojic acid bis(trimethylsilyl ether) (c), azelaic acid bis(trimethylsilyl ester) (d), caffeine (e) and arbutine penta(trimethylsilyl ether) (f).

Fig. 5. Total ion chromatogram obtained for a laboratory-made skin-whitening cosmetic sample by using the proposed method. For experimental conditions see Table 1. Peaks: 1 = resorcinol bis(trimethylsilyl ether), 2 = hydroquinone bis(trimethylsilyl ether), 3 = kojic acid bis(trimethylsilyl ether), 4 = azelaic acid bis(trimethylsilyl ester) and 5 = arbutine penta(trimethylsilyl ether).

7. Table

Table 1. GC-MS operating conditions.

Injector temperature	280°C
Injection volume	3 µL, split ratio 1:20
Oven temperature programme	120°C (3 min), 20°C/min, 280°C (10 min)
Carrier flow rate	1 mL min ⁻¹
Transfer line temperature	280°C
Ionisation energy	Electron impact at 70 eV
Mass monitoring (m/z)	
FS mode	50-500
SIM mode	254 [M] ⁺ and 239 [M - CH ₃] ⁺ for RS and HQ ⁺ and 147 [(C ₃ H ₇) ₃ Si-O-Si(CH ₃) ₂] ⁺ for KA ⁺ and 201 [M ₃ - C ₃ H ₇ - CO ₂ - (CH ₃) ₂ Si(CH ₂) ₂] ⁺ for AZA ⁺ , 361 [M - HO-Ph-O-Si(CH ₃) ₃] ⁺ and 254 (unknown) for ARB (109 and 194 for caffeine)
Solvent delay	4 min

Table 2. Analytical features of the proposed chromatographic method.

Analyte	retention time ^a (min)	RSD in $A_{\text{analyte}}/A_{\text{caffeine}}$ ^b (%)	working range ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	intercept	slope ($\text{mL } \mu\text{g}^{-1}$)	R^2	LOD ^c ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
RS	5.249 \pm 0.002	0.4	1-25	-0.008 \pm 0.004	0.0501 \pm 0.0003	0.9995	0.5
HQ	5.418 \pm 0.001	1.7	5-125	-0.05 \pm 0.06	0.0622 \pm 0.0008	0.9998	0.5
KA	7.491 \pm 0.001	0.7	5-125	-0.02 \pm 0.05	0.0289 \pm 0.0006	0.9995	0.9
AZA	8.132 \pm 0.002	0.6	5-125	0.009 \pm 0.005	0.0097 \pm 0.0004	0.9997	1.3
ARB	11.601 \pm 0.002	0.8	5-125	0.06 \pm 0.01	0.0356 \pm 0.0008	0.9998	1.0

^a Caffeine (internal standard) retention time was 8.747 \pm 0.002.

^b Referred to a solution containing 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of RS, HQ, KA, AZA and ARB.

^c LOD=limit of detection. Estimated as $3.s_{y/x}/b$, where $s_{y/x}$ and b are, respectively, the residual standard deviation and the slope of the calibration line.

Table 3. Results obtained on analysing a laboratory-made skin-whitening sample using the proposed method.

Analyte	Real content (% w/w)	Found content \pm s (% w/w)	Error (%)
RS	0.60	0.62 \pm 0.03	3.3
HQ	1.01	0.99 \pm 0.03	-2.0
KA	1.07	1.10 \pm 0.04	2.8
AZA	2.17	2.21 \pm 0.05	1.8
ARB	2.31	2.32 \pm 0.02	0.4

^a Average values of three determinations \pm standard deviation (s).

Table 4. Results obtained on analysing commercial skin-whitening cosmetic products using the proposed method.

Sample	Found content \pm s ^{a,b,c} (% w/w)				
	RS	HQ	KA	AZA	ARB
A	ND	ND	2.51 \pm 0.05	4.45 \pm 0.04	ND
B	ND	ND	0.86 \pm 0.02	ND	1.70 \pm 0.04
C	ND	ND	ND	ND	2.0 \pm 0.1
D	ND	ND	1.38 \pm 0.06	ND	ND
E	ND	8.5 \pm 0.4	8.3 \pm 0.4	ND	ND
F	ND	9.1 \pm 0.1	9.5 \pm 0.5	ND	ND
G	0.058 \pm 0.002	ND	4.7 \pm 0.2	ND	ND
H	0.200 \pm 0.003	ND	4.88 \pm 0.09	ND	ND
I	ND	ND	1.11 \pm 0.06	3.81 \pm 0.05	ND

^a Average values of three determinations \pm standard deviation (s).

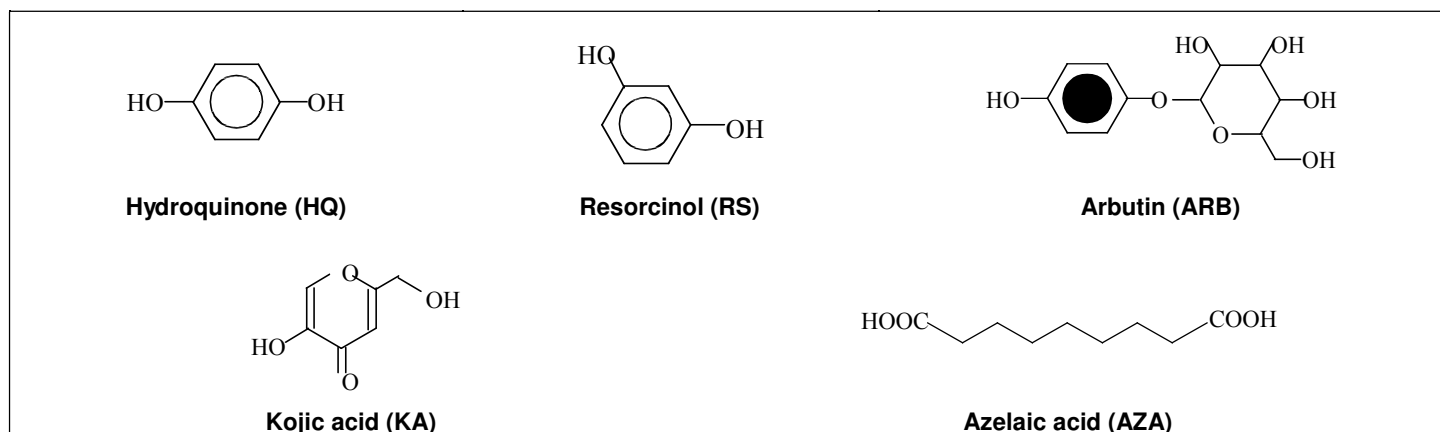
^b ND= not detected.

^c According to the label, samples A, F, H and I contain KA and AZA, sample B contains KA and ARB, sample C contains ARB and samples D, E and G contain KA.

8. Figure

[Click here to download 8. Figure: Chisvert_Figure1.doc](#)

Figure 1.



8. Figure

[Click here to download 8. Figure: Chisvert_Figure2.doc](#)

Figure 2.

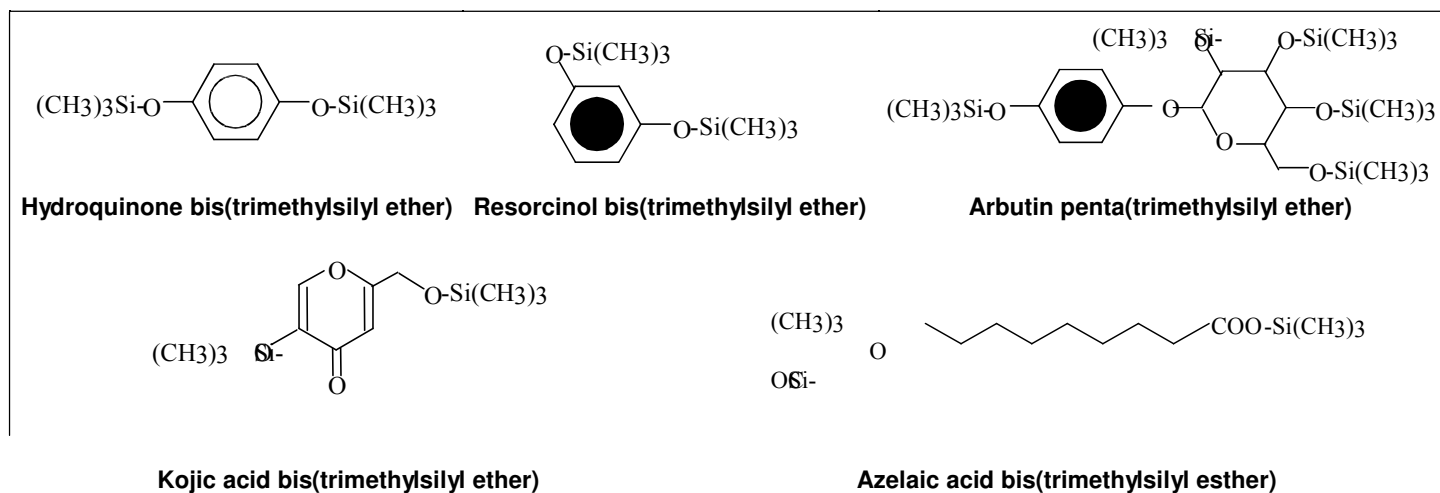


Figure 3.

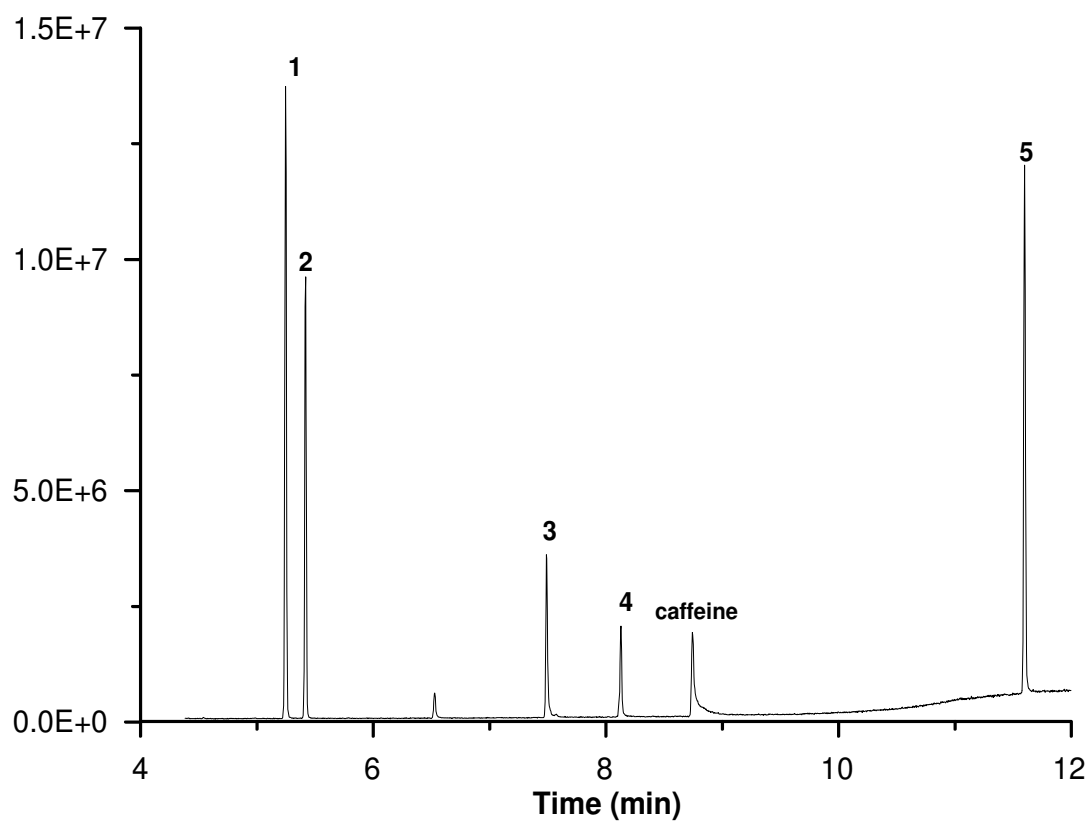


Figure 4.

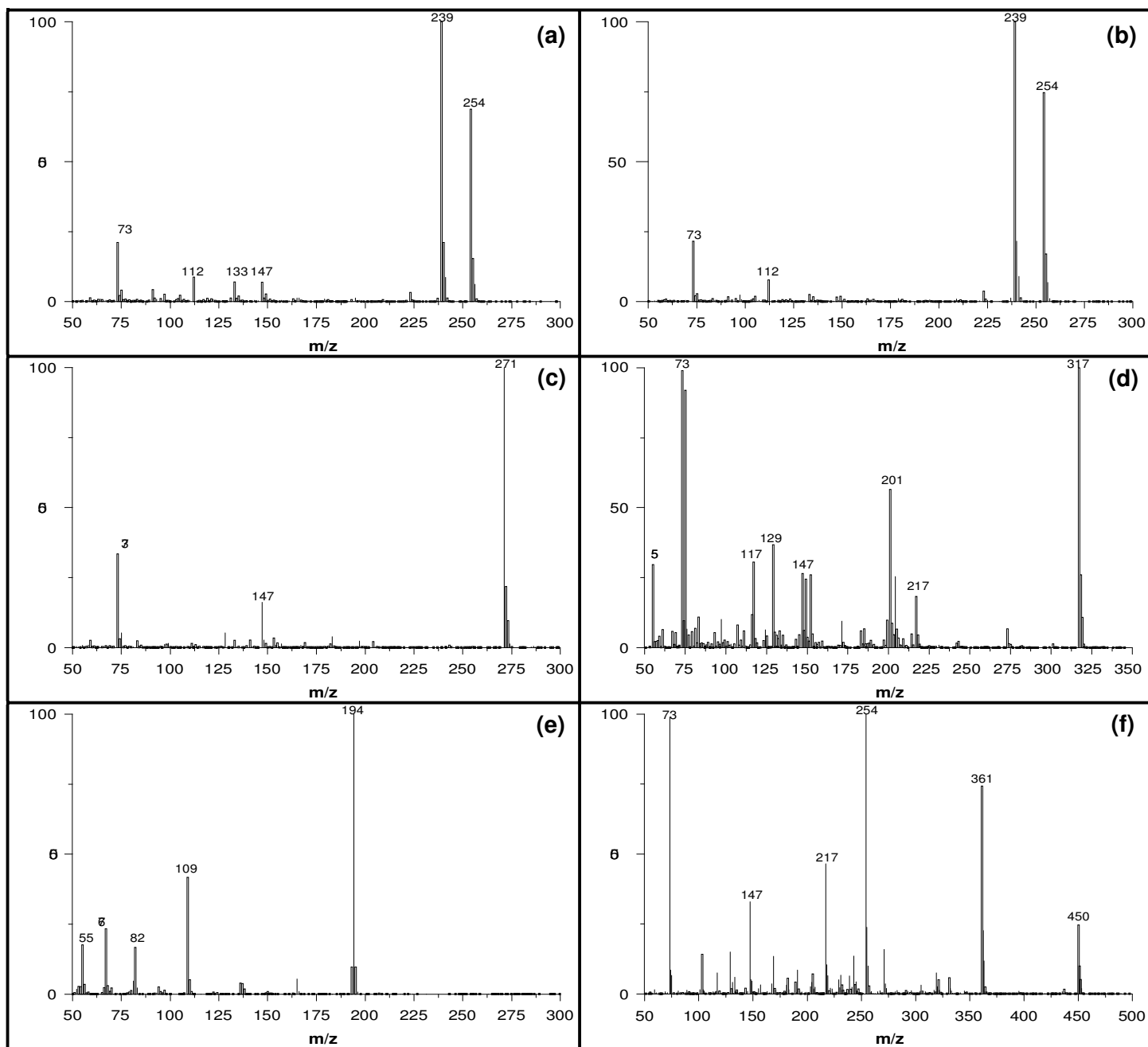


Figure 5.

