Pomeranian J Life Sci 2017;63(4):110-115

Przydatność sztucznych błon o właściwościach lipofilowych i hydrofilowych do oceny przenikania in vitro p-hydroksybenzoesanu metylu*

Suitability of lipophilic and hydrophilic artificial membranes for the evaluation of in vitro methyl p-hydroxybenzoate penetration

Dorota Piwowarczyk[1], Anna Nowak[2], Adam Klimowicz[2]✉

[1] Absolwentka Kosmetologii Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie
[2] Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie, Katedra i Zakład Chemii Kosmetycznej i Farmaceutycznej, ul. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin
✉ adklim@pum.edu.pl

ABSTRACT

Introduction: Parabens are the group of the most frequently applied preservatives in cosmetics as well as topical therapeutics. From the chemical point of view they are the esters of p-hydroxybenzoic acid. Their popularity is due to their broad spectrum of antimicrobial activity, applicability in a wide pH range, as well as low production costs. Despite the controversy regarding the safety of their use, parabens seem to be recognized as non-toxic and low allergenic agents.

The aim of the study was to determine paraben M (methyl-4-hydroxybenzoate) penetration through the hydrophilic and lipophilic artificial membranes.

Materials and methods: Paraben M penetration into acceptor fluid of pH 5.4, comparable to skin surface pH, as well as into that of pH 7.4, corresponding to the deeper skin layers, was evaluated with Franz diffusion cells. The samples of acceptor fluid were collected after 0.5, 1, 2 and 4 hours, and paraben M concentrations were determined by the HPLC method.

Results: The results of the studies suggest the ability of paraben M to penetrate through both tested artificial membranes. The compound penetrated to a higher degree after 0.5% cream application as compared to 0.5% gel, regardless of the character of the membrane. Moreover, paraben M had a higher penetration into acceptor fluid of pH 7.4 as compared to that of pH 5.4.

Conclusion: Membrane character, i.e. hydrophilic or lipophilic, seems not to have an impact on paraben M penetration. However, the form of the product (i.e. gel vs. cream) affects its permeation. The lower penetration of the studied compound into acceptor fluid of pH 5.4 could suggest the possibility of certain increase of the epidermal barrier effectiveness.

Keywords: parabens; permeation; preservatives; cosmetic vehicle.

ABSTRAKT

Wstęp: Parabeny są obecnie jednymi z częściej stosowanych konserwantów w produktach kosmetycznych i leczniczych. Pod względem chemicznym są to estry kwasu p-hydroksybenzoesowego. Swoją popularność zawdzięczają dużemu spektrum działania przeciwko drobnoustrojom, możliwości zastosowania w szerokim zakresie pH, jak również niskim kosztom produkcji. Pomimo kontrowersji związanych z bezpieczeństwem stosowania parabeny uznawane są za nietoksyczne i o słabym działaniu alergizującym. Celem pracy była ocena przenikania parabenu M (p-hydroksybenzoesanu metylu) przez sztuczne błony o charakterze hydrofilowym i lipofilowym.

Materiały i metody: Oceniano przenikanie parabenu M do płynu akceptorowego o pH 5,4 zbliżonego do pH powierzchni skóry ludzkiej oraz o pH 7,4 odpowiadającym jej głębszym warstwom. Badanie wykonano przy użyciu komory dyfuzyjnej Franza. Próbki płynu z komory akceptorowej pobierano po 0,5, 1, 2 oraz 4 godz. Oznaczeń stężeń parabenu M dokonywano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

Wyniki: Stwierdzono, iż paraben M wykazywał zdolność przenikania przez sztuczne błony. W wyższym stopniu związek ten przenikał do płynu akceptorowego z dodatkiem 0,5% kremu niż z żelu. Wykazano wyższy stopień penetracji do płynu akceptorowego o pH = 7,4 w porównaniu z pH = 5,4.

Wnioski: Charakter membrany, zarówno hydrofilowy, jak i lipofilowy, nie miały wpływu na przenikanie parabenu M. Wpływ na przenikanie miało jednak podłoże, wykazano bowiem większe przenikanie z kremu niż z żelu. Niższa penetracja do płynu akceptorowego o pH 5,4 może wskazywać na efektywność działania bariery naskórkowej.

Słowa kluczowe: parabeny; przenikanie; konserwant; podłoże kosmetyku.

* W artykule wykorzystano m.in. wyniki zamieszczone w pracy magisterskiej Doroty Piwowarczyk pt. „Parabeny jako przykład konserwantów stosowanych w kosmetologii" wykonanej w Katedrze i Zakładzie Chemii Kosmetycznej i Farmaceutycznej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie i obronionej na Wydziale Nauk o Zdrowiu PUM. Promotor: dr inż. n. rol. Anna Nowak. Oryginał zawiera: 58 stron, 38 rycin, 4 tabele, 60 pozycji piśmiennictwa.

CC BY NC ND

WSTĘP

Skóra chroni organizm przed szkodliwym działaniem czynników zewnętrznych oraz utratą wody, zapewniając jednocześnie utrzymanie właściwych funkcji organizmu [1, 2]. Zdolność penetracji składników preparatów aplikowanych na skórę uzależniona jest głównie od takich czynników jak stan oraz wiek skóry, właściwości podłoża stosowanego preparatu, właściwości fizykochemiczne składników czynnych, a także sposób oddziaływania pomiędzy substancją aktywną i podłożem oraz obecność substancji pomocniczych [3]. Szczególną rolę w absorpcji danego składnika przez skórę odgrywają jego cechy fizykochemiczne, a także rodzaj i skład zawierającego je podłoża. Do właściwości fizykochemicznych, które powinno się wziąć pod uwagę przy ocenie penetracji substancji przez skórę, należą m.in.: budowa i wielkość cząsteczki, jej masa molowa, a także charakter hydrofilowy czy lipofilowy danego związku. Bardzo ważną rolę w tym procesie odgrywa również warstwa rogowa (*stratum corneum*), będąca specyficzną barierą ograniczającą i regulującą przenikanie poszczególnych substancji czynnych. Zawiera ona m.in. cement międzykomórkowy zbudowany z ceramidów, cholesterolu i jego estrów oraz kwasów tłuszczowych, które wpływają na jej charakter lipofilowy [4, 5, 6, 7, 8]. W celu oszacowania jej skuteczności jako bariery opracowano szereg modeli doświadczalnych, które mają przypominać sposób działania tej warstwy. Do metod tych można zaliczyć m.in. wykorzystywanie membran silikonowych [9, 10], membran stosowanych w metodzie PAMPA (*the paralel artificial membrane permability assay*) [11, 12, 13, 14], membran PVPA (*Phospholipid vesicle-based permestion assay*) przypominających swoimi właściwościami *stratum corneum* [15, 16, 17] oraz różnego rodzaju membran zawierających głównie substancje lipidowe, które z uwagi na ich zawartość mają imitować barierę skórną. Takie błony wykorzystywali m.in. Loftsson i wsp., używając zarówno błony o charakterze lipofilowym, jak i hydrofilowym. Obejmowały one membrany celofanowe, jak również błony zawierające warstwę lipofilową w postaci n-oktanolu rozpuszczonego w kolodium [18]. Funkcję bariery skóry można zmodyfikować m.in. poprzez odpowiedni dobór podłoża, które w zależności od swojego składu może wpłynąć nie tylko na działanie składników aktywnych, lecz także na właściwości warstwy *stratum corneum*, i tym samym mieć udział w przenikaniu wspomnianych substancji [19].

Istotne znaczenie dla produkcji kosmetyków ma ich czystość mikrobiologiczna, którą w przypadku preparatów aplikowanych zewnętrznie osiąga się najczęściej poprzez dodanie środków konserwujących. Obecnie jedną z najpowszechniej stosowanych grup konserwantów są estry kwasu p-hydroksybenzoesowego, zwane również parabenami, nipaginami czy aseptynami. Nie mają one zapachu ani barwy, dzięki czemu nie powodują zmiany tych cech w produktach, co również ma wpływ na ich stosowanie [19, 20, 21, 22].

Celem niniejszej pracy była ocena przenikania in vitro p-hydroksybenzoesanu metylu, znanego także jako paraben M lub nipagina M, przez sztuczne błony o charakterze hydrofilowym i hydrofobowym, zbadanie wpływu pH akceptora na stopień przenikania badanego parabenu, a także określenie wpływu formy preparatu na penetrację tego związku.

MATERIAŁY I METODY

Materiały

Alkohol cetylowy cz.d.a. pochodził z Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Niemcy); wodorofosforan disodu cz.d.a., diwodorofosforan potasu cz.d.a. oraz oktanol – z Merck (Niemcy). Guma ksantanowa, wosk pszczeli biały oraz kwas ortofosforowy 85% cz.d.a. pochodziły z Loba Chemie (Indie); acetylonitryl z J.T. Baker (Holandia); kolodium i p-hydroksybenzoesan metylu z Caelo Caesar & Lorenz GmbH (Niemcy); cholesterol z Coel (Kraków); kwas stearynowy cz.d.a. oraz gliceryna cz.d.a. z Chempur (Piekary Śląskie). Biobazę (Glyceryl Stearate, Cetearyl Alcohol, Sodium Stearoyl Lactylate) zakupiono w firmie Mazidła (Poznań), natomiast bibułę filtracyjną jakościową średnią w PPH (Gliwice).

Przenikanie in vitro

Eksperyment przeprowadzono w komorze dyfuzyjnej Franza (SES GmbH Analyse Systeme, Niemcy) zawierającej komorę donorową o pojemności 2 mL i komorę akceptorową o pojemności 8 mL. Powierzchnia, przez którą przenikały składniki czynne, wynosiła 1 cm^2. Jako płyny akceptorowe wykorzystano 0,1 M bufory fosforanowe o dwóch różnych pH 5,4 i 7,4. W komorze akceptorowej utrzymywano stałą temperaturę 37°C ±0,5°C za pomocą termostatu VEB MLW Prüfgeräte-Werk typ 3280. Płyn akceptorowy był mieszany za pomocą mieszadła magnetycznego.

Badania prowadzono przez 4 godz. W określonych odstępach czasu (po 30, 60, 120 i 240 min) pobierano całą zawartość komory akceptorowej, następnie napełniano ja świeżą porcją buforu o tym samym pH.

W badaniu wykorzystano sztuczne błony wykonywane w laboratorium. W celu otrzymywania błony o charakterze hydrofilowym na krążki bibuły o średnicy 2,5 cm nanoszono stałą objętość kolodium, natomiast aby otrzymać błony o właściwościach lipofilowych – kolodium, w którym rozpuszczono alkohol cetylowy i cholesterol, gdzie ich stężenie wynosiło po 0,12%. Roztwory były nanoszone na suche krążki bibuły, jednostronnie, w stałej ilości 200 µL, po czym pozostawione zostały do wyschnięcia przez 24 godz.

W komorze donorowej umieszczano dwie postacie preparatów sporządzonych w laboratorium, których skład zamieszono w tabeli 1. Wszystkie preparaty umieszczono w ilości 2 g.

Analiza HPLC

Oznaczeń stężeń p-hydroksybenzoesanu metylu w analizowanych próbkach dokonano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z detektorem spektofotometrycznym, korzystając z aparatu firmy Knauer, Niemcy. Badane składniki rozdzielono na kolumnie o wymiarach 125 × 4 mm, zawierającej Hyperisil ODS o średnicy ziarna 5 µm. Szybkość przepływu fazy ruchomej, w której skład wchodziły acetonitryl,

TABELA 1. Skład podłoży wykorzystanych w badaniu

Żel	g	Emulsja	g
– guma ksantanowa	2,0	– biobaza	6,0
– p-hydroksybenzoesan metylu	0,5	– oliwa z oliwek	20,0
– woda destylowana	do 100,0	– wosk biały	7,0
		– gliceryna	2,0
		– p-hydroksybenzoesan metylu	0,5
		– woda destylowana	do 100,0

85% kwas fosforowy i woda (207:1:486 v/v), wynosiła 1 mL/min. Na kolumnę nastrzykiwano po 20 µL analizowanych próbek. Oznaczenia wykonywano przy długości fali 280 nm. Dane były przetwarzane przy użyciu programu EuroChrome dla HPLC (Knauer, Niemcy).

Współczynnik podziału oktanol/woda

W celu oznaczenia lipofilności p-hydroksybenzoesanu metylu zbadano wartości współczynnika podziału oktanol/woda (log $K_{o/w}$) przy dwóch różnych pH 5,4 i 7,4 (takich samych jak pH płynu akceptorowego, wykorzystywanego w badaniu przenikania). Oktanol mieszano z odpowiednim buforem w proporcji 1:1, zawierającym paraben w różnych stężeniach. Następnie wytrząsano mieszaninę na wytrząsarce rotacyjnej SK-0330-PRO (Chemland, Stargard) przez 4 godz. Współczynnik podziału oktanol/woda, będący miarą lipofilności badanego związku, obliczono jako logarytm ilorazu stężenia parabenu M w oktanolu do jego stężenia w fazie buforowej o określonym pH. Wynik podano jako średnią z analizowanych próbek o różnych stężeniach (n = 3).

Analiza statystyczna

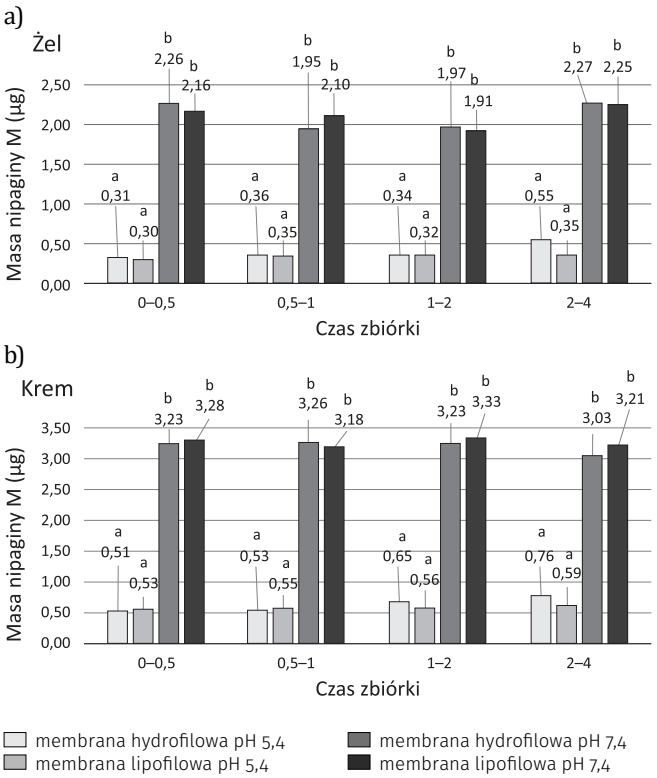
Wyniki badań opracowano statystycznie na podstawie jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA. W celu określenia istotności różnic między średnimi zastosowano przedziały ufności Tukeya, przy poziomie istotności α = 0,05 ($NIR_{0,05}$). Obliczeń dokonano za pomocą programu Statistica 12 (StatSoft). Wszystkie badania były przeprowadzone w trzech powtórzeniach (n = 3).

WYNIKI

W tabeli 2 zamieszczono wartości współczynnika podziału oktanol/woda oznaczonego dla dwóch buforów, odpowiednio o pH 5,4 i 7,4. Na wartość ocenianego współczynnika nie miał wpływu odczyn roztworu wodnego, współczynnik wynosił bowiem 0,800 zarówno przy pH 5,4, jak i pH 7,4 (tab. 2).

Na rycinie 1 przedstawiono porównanie ilości p-hydroksybenzoesanu metylu, które przeniknęły przez różne typy membran, z żelu i kremu jako podłoża, przy dwóch wartościach pH płynu akceptorowego (pH 5,4 i pH 7,4). Zarówno w przypadku żelu, jak i kremu kluczowe znaczenie dla stopnia przenikania parabenu M miało pH płynu akceptorowego. Po zastosowaniu żelu masa nipaginy we wszystkich analizowanych przedziałach czasowych była istotnie wyższa (blisko 6-krotnie) przy pH 7,4 w porównaniu z masą z analogicznie pobieranych próbek z płynu akceptorowego o pH 5,4. Nie wykazano natomiast istotnych różnic pomiędzy ilością parabenu M przechodzącego przez oba typy błon do płynu o tym samym pH, gdyż przy pH 7,4 masa przenikającego parabenu była porównywalna zarówno przy błonach hydrofilowych, jak i lipofilowych we wszystkich przedziałach czasowych (ryc. 1a).

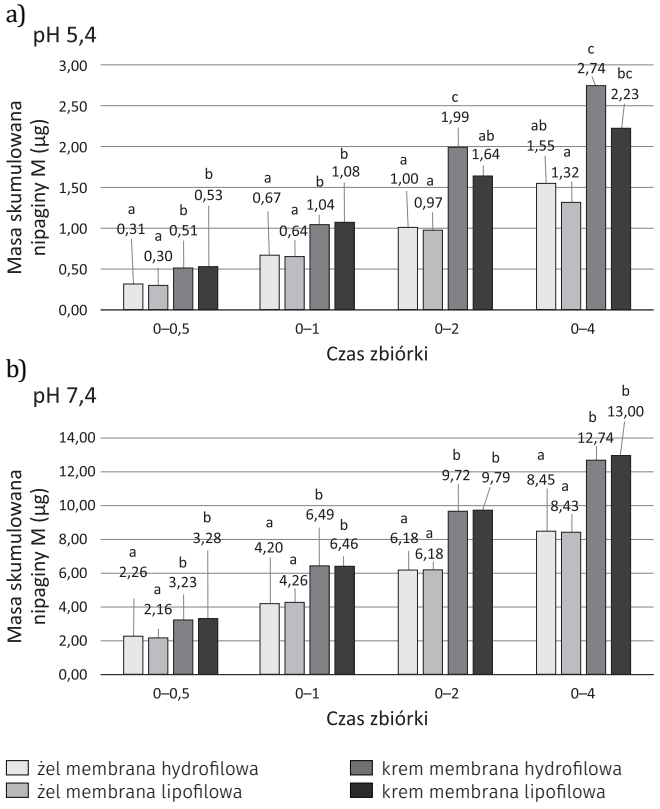
Podobną tendencję zaobserwowano po zastosowaniu kremu, jednak w przypadku tego podłoża masa p-hydroksybenzoesanu metylu w próbkach pobieranych przy pH 7,4 była prawie 5-krotnie wyższa od masy tego związku w próbkach płynu akceptorowego o pH 5,4. W przypadku kremu we wszystkich przedziałach czasowych masa nipaginy M w płynie akceptorowym o pH 7,4 była podobna, wynosiła 3,03–3,33 µg i była statystycznie istotne wyższa niż masa tego związku w próbkach z płynu akceptorowego o pH 5,4, w których zawartość



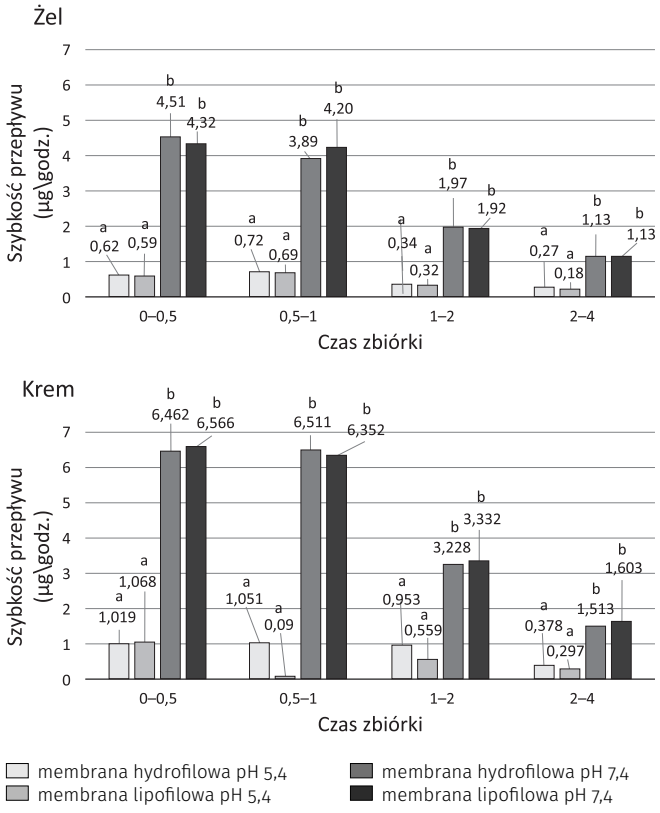
RYCINA 1. Porównanie ilości nipaginy M przenikającej z żelu (a) oraz z kremu (b) do płynu akceptorowego o różnym pH przez błony o charakterze hydrofilowym i lipofilowym (poziom istotności α = 0,05; n = 3; różne litery oznaczają istotne różnice)

TABELA 2. Współczynnik podziału oktanol/woda (log $K_{o/w}$) dla p-hydroksybenzoesanu metylu

Substancja	Masa cząsteczkowa	pH roztworu	log $K_{o/w}$
Nipagina M	152,15	5,4	0,800
		7,4	0,800



RYCINA 2. Porównanie ilości skumulowanej nipaginy M przenikającej do płynu akceptorowego o różnym pH 5,4 (a) oraz 7,4 (b) z dwóch postaci preparatu przez błony o charakterze hydrofilowym i lipofilowym (poziom istotności α = 0,05; n = 3; różne litery oznaczają istotne różnice)



RYCINA 3. Porównanie szybkości przenikania nipaginy M z dwóch różnych podłoży do płynu akceptorowego o różnym pH przez błony o charakterze hydrofilowym i lipofilowym (poziom istotności α = 0,05; n = 3; różne litery oznaczają istotne różnice)

wynosiła tylko 0,51–0,76 µg. Również w przypadku kremu nie wykazano istotnych różnic w masie związku przenikającego przez oba typy membran do płynu akceptorowego o pH 5,4 i 7,4 we wszystkich badanych przedziałach czasowych (ryc. 1b).

Na rycinie 2 przedstawiono porównanie skumulowanej masy p-hydroksybenzoesanu metylu, jaka przeniknęła podczas całego okresu zbiórki trwającej 4 godz. Wyniki przedstawiono osobno dla dwóch różnych pH płynu akceptorowego. Przy pH 5,4 najwięcej w stopniu statystycznie istotnym nipaginy przeniknęło z kremu przez błonę hydrofilową; średnia masa składnika w płynie akceptorowym wynosiła 2,74 µg. Podobna sytuacja wystąpiła w przypadku kremu i błony lipofilowej, gdzie masa całkowita nipaginy M była nieznacznie niższa w porównaniu z poprzednim wariantem i wynosiła 2,23 µg (ryc. 2a). W przypadku płynu akceptorowego o pH 7,4 zaobserwowano, że istotnie najwięcej p-hydroksybenzoesanu metylu w okresie 4 godz. przeniknęło z kremu zarówno przez błonę hydrofilową (12,74 µg), jak i błonę lipofilową (13,00 µg) – rycina 2b.

Na rycinie 3 przedstawiono szybkość przenikania parabenu M (zdefiniowaną jako ilość związku penetrującego w jednostce czasu – µg/godz.) z kremu i żelu przez oba typy błon do płynu akceptorowego o pH 5,4 i pH 7,4. Analizując poszczególne postaci preparatu, z których przenikała nipagina M, stwierdzono, że z żelu najszybciej dyfundowała w pierwszych dwóch przedziałach czasowych, tj. 0–0,5 oraz 0,5–1 godz., w których szybkość przenikania była średnio 2-krotnie wyższa niż pomiędzy 1 i 2 oraz 2 i 4 godz. Podobną sytuację zaobserwowano w przypadku kremu, gdzie badana substancja najszybciej przenikała do płynu akceptorowego w pierwszych dwóch przedziałach czasowych, tj. 0–0,5 oraz 0,5–1 godz. We wszystkich badanych wariantach w okresie 2–4 godz. szybkość przenikania parabenu M była najmniejsza (ryc. 3).

DYSKUSJA

Przenikanie substancji czynnych przez błony zarówno sztuczne, jak i naturalne uzależnione jest od wielu czynników, m.in. charakteru membrany, nośnika, a także lipofilności danej substancji czynnej [23, 24]. Zawartość różnych związków czynnych w kosmetykach, w tym parabenów, jest związana z mniejszą lub większą penetracją w głąb skóry, jak również ich kumulacją w tej tkance. W badaniach własnych podjęto próbę oceny przenikania popularnego parabenu M, znajdującego się w kosmetykach, przez błony o charakterze lipofilowym i hydrofilowym z wykorzystaniem dwóch typów podłoży – kremu i żelu. W tym celu zastosowano dwa typy membran sporządzonych na bibule filtracyjnej, na którą naniesiono jedynie kolodium jako błonę o charakterze hydrofilowym oraz kolodium z rozpuszczonym w nim alkoholem cetylowym i cholesterolem, które miały stanowić błonę o charakterze lipofilowym. Warstwa rogowa naskórka jest swoistą membraną złożoną m.in. z międzykomórkowych lipidów, w skład których wchodzą m.in. alkohole czy kwasy tłuszczowe i cholesterol [25]. Sztuczne membrany o charakterze lipofilowym stosowali również Sinkó i wsp.,

którzy wykorzystywali membrany typu PAMPA z warstwą złożoną z kwasu stearynowego, ceramidów oraz oleju silikonowego [14]. Di Cango i wsp. zastosowali sztuczne błony Permeapad™, w których warstwę lipidową stanowiła fosfatydylocholina [26]. Błony o charakterze hydrofilowym i lipofilowym stosowali Loftsson i wsp., wykorzystując błony celofanowe mające warstwę kolodium [18].

W badaniu własnym wykazano, iż p-hydroksybenzoesan metylu przenikał przez sztuczne błony zarówno hydrofilowe, jak i lipofilowe, jednak rodzaj membrany przeważnie nie miał istotnego wpływu na przenikanie badanej substancji. Może to świadczyć o zdolności penetracji parabenów zarówno przez zewnętrzne (o charakterze lipofilowym), jak i głębiej położone warstwy skóry (o charakterze hydrofilowym). Caon i wsp. podjęli próbę oceny przenikania różnego typu parabenów przez skórę ucha świni przy wykorzystaniu komory Franza. Wykazali oni, iż konserwanty te słabiej dyfundują przez warstwę rogową naskórka [24]. Ważną rolę w przenikaniu substancji czynnej odgrywa jej lipofilność oraz masa cząsteczkowa [23, 24]. Pedersen i wsp. jako naturalną membranę zastosowali skórę z ucha królika. Ich wyniki sugerują, iż na stopień przenikania parabenów kluczowy wpływ ma ich lipofilność, natomiast skład nośnika, z którego penetruje nipagina, odgrywa drugorzędną rolę [19]. Lipofilność substancji wyraża logarytm współczynnika podziału pomiędzy *n*-oktanolem i wodą lub wodnym buforem ($\log K_{o/w}$). Paraben zastosowany w badaniu własnym jest substancją typowo lipofilową, o czym świadczy $\log K_{o/w}$ wynoszący 0,800 zarówno dla pH 5,4, jak i pH 7,4 płynu akceptorowego. Podobną wartość uzyskali Seki i wsp., którzy w przypadku p-hydroksybenzoesanu metylu wyznaczyli $\log K_{o/w}$ na poziomie 0,914 [27]. Inni badacze otrzymali wyższą wartość tego współczynnika, świadczącą o lipofilowym charakterze parabenu: Nishida i wsp. – 1,66, natomiast Pedersen i wsp. oraz El Hussein i wsp. – 1,93 [19, 23, 28]. Cząsteczki typowo lipofilowe łatwiej penetrują przez warstwę rogową dzięki powinowactwu do cementu międzykomórkowego, dlatego też takie substancje lepiej przenikają przez membrany o charakterze lipofilowym [10, 18].

Penetracja substancji hydrofilowych może być uwarunkowana stopniem nawilżenia naskórka, gdyż przy wyższym nawilżeniu cząsteczki będą penetrować lepiej. W badaniu własnym nie wykazano jednak znaczącej różnicy w przenikaniu parabenu M przez błony hydrofilowe czy lipofilowe (ryc. 1). Pedersen i wsp. badali różne rodzaje parabenów przenikających z trzech rodzajów emulsji w komorze Franza, z wykorzystaniem skóry pochodzącej z królika. Autorzy podają, iż nipagina M przenikała w największej ilości w porównaniu z pozostałymi parabenami (nipagina P, nipagina E); również jej stężenie w skórze było najwyższe. Autorzy sugerują, że tak silne przenikanie p-hydroksybenzoesanu metylu jest spowodowane m.in. jego wysoką lipofilnością w porównaniu z innymi parabenami występującymi w kosmetykach [19].

Znaczącą rolę w przenikaniu substancji czynnej odgrywa podłoże preparatu, przy czym istnieje zależność pomiędzy nośnikiem a typem membrany użytej w doświadczeniu [10]. W badaniach własnych zastosowano dwa rodzaje preparatów – żel i krem, co miało istotny wpływ na penetrację badanego parabenu. Większa ilość p-hydroksybenzoesanu metylu dyfundowała z kremu, zarówno przy pH 5,4, jak i 7,4 (przy obydwu rodzajach błon), w przypadku którego masa parabenu była nawet 3-krotnie większa niż z żelu (ryc. 1). Lepsza penetracja nipaginy z kremu w doświadczeniu własnym wyrażona została również w masie całkowitej, ponieważ podczas trwającego 4 godz. badania całkowita masa nipaginy M, przenikająca zarówno przez błony hydrofilowe, jak i lipofilowe, była istotnie wyższa w przypadku tego podłoża (ryc. 2).

Cross i Roberts badali przenikanie parabenu M zawartego w maści oraz rozpuszczonego w acetonie i etanolu. Autorzy podają, iż lepsze przenikanie parabenu M było obserwowane z roztworu acetonowego i etanolowego niż z maści, co sugeruje iż działanie okluzyjne zastosowanego preparatu może obniżyć przenikanie badanej substancji [29]. Arct i wsp. podają, iż substancje hydrofilowe i emulgatory mogą obniżyć penetrację substancji czynnych przez skórę. Autorzy badali w warunkach in vivo wpływ zawartych w kosmetykach substancji nawilżających na wnikanie w skórę niektórych substancji i zaobserwowali, że dodatek glikolu propylenowego do podłoża znacznie obniżał penetrację kwercetyny przez bariery skórne [30].

W badaniu własnym w celu przybliżenia warunków panujących w skórze człowieka zastosowano dwa typy buforów (pH 5,4 oraz 7,4). Płyn o pH 5,4 odpowiadał wartości pH na powierzchni warstwy rogowej, natomiast pH 7,4 odpowiadał głębszym warstwom skóry. Wykazano, iż kluczowe znaczenie dla przenikania parabenu miało pH płynu akceptorowego; zaobserwowano bowiem wysoce istotne różnice w masie całkowitej p-hydroksybenzoesanu metylu przenikającego do płynu akceptorowego o pH 7,4 w porównaniu z płynem o niższym pH (ryc. 1). Biorąc pod uwagę taką różnicę w przenikalności parabenu przy podanych wartościach pH, można przypuszczać, iż nipagina M będzie słabiej przenikać przez zewnętrzne warstwy naskórka, natomiast w głębiej położonych tkankach penetracja tego związku będzie przebiegała intensywniej. To może oznaczać, iż pH powierzchni skóry może stanowić skuteczny element bariery naskórkowej.

Szybkość przenikania substancji czynnej poprzez membrany może być zróżnicowana, co może być powiązane z typem nośnika, w jakim znajduje się badana substancja. Stahl i wsp. badali przenikanie ibuprofenu uwalnianego z trzech nośników: emulsji, roztworu, żelu przez membrany pochodzące ze skóry z wymion krowy. Stwierdzili oni, że przenikanie substancji czynnej przez membrany jest najwyższe w pierwszych godzinach doświadczenia [31]. Potwierdzają to wyniki badań własnych, gdyż szybkość przenikania parabenu M wykazywała tendencję spadkową, przy czym pomiędzy pierwszym a drugim odstępem czasowym różnice te były nieistotne (ryc. 3).

WNIOSKI

Na zdolność penetracji parabenu M w głąb skóry znaczący wpływ ma forma preparatu, z którego jest on uwalniany,

a także pH płynu akceptorowego. Mniejsze znaczenie wydaje się mieć hydrofilowość membrany, przez którą przenikała badana substancja. Wyniki przeprowadzonych badań pomagają określić czynniki, które będą wpływały na intensywność dyfuzji parabenów w głąb skóry, a tym samym mogą ułatwić przeprowadzenie dalszych badań mających na celu zwiększenie bezpieczeństwa stosowania tych związków w recepturach nie tylko kosmetycznych.

PIŚMIENNICTWO

1. Lane ME. Skin penetration enhancers. Int J Pharm 2013;447(1-2):12-21. doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.02.040.
2. Hadgraft J. Skin deep. J Eur Pharm Biopharm 2004;58(2):291-9. doi: 10.1016/j.ejpb.2004.03.002.
3. Trommer H, Neubert RH. Overcoming the stratum corneum: The modulation of skin penetration. Skin Pharmacol Physiol 2006;19(2):106-21. doi: 10.1159/000091978.
4. Lam PL, Gambari R. Advanced progress of microencapsulation technologies: in vivo and in vitro models for studying oral and transdermal drug deliveries. J Control Release 2014;178:25-45.
5. Bolzinger MA, Briancon S, Pelletier J, Chevalier Y. Penetration of drug through skin, a complex rate-controlling membrane. Curr Opin Colloid Interface Sci 2012;17:156-65.
6. Baroni A, Buommino E, De Gregorio V, Ruocco E, Ruocco V, Wolf R. Structure and function of the epidermis related to carrier properties. Clin Dermatol 2012;30(3):257-62. doi: 10.1016/j.clindermatol.2011.08.007.
7. Prausnitz MR, Langer R. Transdermal drug deliviery. Nat Biotechnol 2008;26(11):1261-68. doi: 10.1038/nbt.1504.
8. Meuwissen ME, Janssen J, Cullander C, Junginger HE, Bouwstra JA. A cross-section device to improve visualization of fluorescent probe penetration into the skin by confocal laser scanning microscopy. Pharm Res 1998;15:352-6.
9. Waters LJ, Dennis L, Bibi A, Mitchell JC. Surfactant and temperature effects on paraben transport through silicone membranes. Colloids Surf B Biointerfaces 2013;108:23-8. doi: 10.1016/j.colsurfb.2013.02.017.
10. Dias M, Hadgraft J, Lane ME. Influence of membrane-solvent-solute interactions on solute permeation in model membranes. Int J Pharm 2007;336(1):108-14. doi: 10.1016/j.ijpharm.2006.11.054.
11. Balázs B, Vizserálek G, Berkó S, Budai-Szűcs B, Keleman A, Sinkó B, et al. Investigation of the efficacy of transdermal penetration enhancers through the use of human skin and a skin mimic artificial membrane. J Pharm Sci 2016;105(3):1134-40. doi: 10.1016/S0022-3549(15)00172-0.
12. Karadzovska D, Riviere JE. Assessing vehicle effect on skin absorption using artificial membrane assays. Eur J Pharm Sci 2013;50(5):569-76. doi: 10.1016/j.ejps.2013.02.020.
13. Tsinman K, Sinko B. A high throughput method to predict skin penetration and screen topical formulations. Cosmet Toiletries 2013;128:192-9.
14. Sinkó B, Garrigues TM, Balogh GT, Nagy ZK, Tsinman O, Avdeef A, et al. Skin-PAMPA: A new method for fast prediction of skin penetration. Eur J Pharm Sci 2012;45(5):698-707. doi: 10.1016/j.ejps.2012.01.011.
15. Palac Z, Engesland A, Flaten GE, Škalko-Basnet N, Filipović-Grčić J, Vanić Ž. Liposomes for (trans)dermal drug delivery: the skin-PVPA as a novel in vitro *stratum corneum* model in formulation development. J Liposome Res 2014;24:313-22.
16. Engesland A, Skar M, Hansen T, Škalko-Basnet N, Flaten GE. New application of phospholipid vesicle-based permeation assay: permeation model mimicking skin barrier. J Pharm Sci 2013;102(5):1588-600. doi: 10.1002/jps.23509.
17. Engesland A, Škalko-Basnet N, Flaten GE. Phospholipid vesicle-based permeation assay and Episkin® in assessment of drug therapies destined for skin administration. J Pharm Sci 2015;104(3):1119-27. doi: 10.1002/jps.24315.
18. Loftsson T, Konrádsdóttir F, Másson M. Development and evaluation of an artificial membrane for determination of drug availability. Int J Pharm 2006;326:60-8. doi: 10.1016/j.ijpharm.2006.07.009.
19. Pedersen S, Marra E, Nicoli S, Santi P. In vitro skin permeation and retention of parabens from cosmetic formulations. Int J Cosmet Sci 2007;29(5):361-7. doi: 10.1111/j.1468-2494.2007.00388.x.
20. Jaworska M, Sikora E, Ogonowski J. Czynniki wpływające na penetrację składników aktywnych przez skórę. Wiad Chem 2011;65:301-20.
21. Gruvberger B, Bruze M, Tammela M. Preservatives in moisturizers on the Swedish market. Acta Derm Venereol 1998:78(1);52-6.
22. Bojarowicz H, Wojciechowska M, Gocki J. Substancje konserwujące stosowane w kosmetykach oraz ich działanie niepożądane. Probl Hig Epidemiol 2008;89:30-3.
23. Nishida K, Kobayashi M, Miyamoto H, Yoshikawa N, Fumoto S, Sasaki H, et al. Relationship between lipophilicity and absorption from the liver surface of paraben derivatives and antipyrine in rats. J Pharm Pharmacol 2011;63(5):736-40. doi: 10.1111/j.2042-7158.2011.01276.x.
24. Caon T, Costa AC, de Oliviera MA, Micke GA, Simoes CM. Evaluation of transdermal permeation of different paraben combinations through a pig ear skin model. Int J Pharm 2010;391(1-2):1-6. doi: 10.1016/j.ijpharm.2010.02.006.
25. Bouwstra JA, Ponec M. The skin barrier in healthy and diseased state. Biochim Biophys Acta 2006;1758(12):2080-95. doi: 10.1016/j.bbamem.2006.06.021.
26. Di Cango M, Bibi HA, Bauer-Brandl A. New biomimetic barrier Parmeapad™ for efficient investigation of passive permeability of drugs. Eur J Pharm Sci 2015;73:29-34. doi: 10.1016/j.ejps.2015.03.019.
27. Seki T, Mochida J, Okamoto M, Hosoya O, Juni K, Morimoto K. Measurement of diffusion coefficients of parabens and steroids in water and 1-octanol. Chem Pharm Bull (Tokyo) 2003;51(6):734-6.
28. El Hussein S, Muret P, Berard M, Makki S, Humbert P. Assessment of principal parabens used in cosmetics after their passage through human epidermis-dermis layers (ex-vivo study). Exp Dermatol 2007;16(10):830-6. doi: 10.1111/j.1600-0625.2007.00625.x.
29. Cross SE, Roberts MS. The effect of occlusion on epidermal penetration of parabens from a commercial allergy test ointment, acetone and ethanol vehicles. J Invest Dermatol 2000;115(5):914-8. doi: 10.1046/j.1523-1747.2000.00151.x.
30. Arct J, Oborska A, Mojski M, Chudzicki M. Proper selection of cosmetic ingredients as a key factor in skin penetration of flavonoids – in vivo studies. Pol J Cosmetol 2016;19:59-63.
31. Stahl J, Wohlert M, Kietzmann M. The effect of formulation vehicles on the in vitro percutaneous permeation of ibuprofen. BMC Pharmacol 2011;11:12. doi: 10.1186/1471-2210-11-12.