

УДК 543.053

ПРОБООТБОР И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ИММИТАТОРЕ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ОКСИТЕРМОГРАФИИ

© 2019 г. Б. К. Зуев¹, П. Д. Поликарпова², В. Г. Филоненко¹, А. С. Коротков¹, А. Е. Сараева¹, *

¹Институт геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского Российской академии наук
119991 Россия, Москва, ул. Косыгина, 19

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет
119991 Россия, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3

*E-mail: saraeva.88@inbox.ru

Поступила в редакцию 22.03.2018 г.

После доработки 17.09.2018 г.

Предложен новый метод отбора органического вещества (на примере гиалуроновой кислоты) с упругой поверхности твердого тела (имитация кожи человека) на поверхность пробоотборника. Определено количество отобранного вещества. Показана возможность применения данного метода в косметологии.

Ключевые слова: метод окситермографии, высокотемпературная печь, датчик кислорода, термоокислительный спектр, органическое вещество, пробоотбор, гиалуроновая кислота

DOI: 10.1134/S0044450219030137

Пробоотбор – первая и важная стадия анализа вещества. Порядок и методы пробоотбора зависят от агрегатного состояния изучаемого вещества и его количества. Например, отбор проб воды должен соответствовать требованиям ГОСТ 17.1.5.04–81. Однако существуют объекты, для которых отсутствуют стандартные методики пробоотбора, например вещества, находящиеся на поверхности раздела фаз твердое тело–газ и жидкость–газ. Известно, что концентрации веществ на поверхности раздела фаз практически всегда существенно отличаются от содержаний в объеме [1]. На поверхности кожи человека выделяются вещества, определение которых важно для диагностики кожи и жизнедеятельности внутренних органов человека [2]. В случаях, когда невозможно прямое определение органического вещества на поверхности раздела фаз тела, необходимы способы и устройства пробоотбора, совместимые с последующими методами анализа. Для разработки подобных методов необходимо исследовать фундаментальные процессы контактной твердофазной микроэкстракции – переноса вещества с поверхности анализируемого вещества на поверхность пробоотборника.

Актуальность таких исследований обусловлена тем, что процессы переноса органического вещества с одной поверхности на другую происходят повсеместно. Это, прежде всего, касание человека различных твердых предметов, рукопожатие, поцелуй и т.д. Кроме этого, в настоящее время широко

применяют косметические средства, наносимые на кожу человека. Появление и внедрение новых активных компонентов требует постоянного исследования их свойств, знания эффективной концентрации на поверхности кожи и их действия на кожу человека. Для этого требуется развитие новых методов обнаружения таких сложных компонентов, как гиалуроновая кислота (ГК), пептиды, а также определение их концентрации и изучение способности проникновения в кожу.

Гиалуроновая кислота – не только часто используемый компонент различных косметических средств. Она содержится в различных тканях нашего организма и межклеточной жидкости, в высоких концентрациях присутствует в синовиальной жидкости, стекловидном теле и коже. В коже находится порядка 50% от общего количества ГК, вырабатываемой организмом человека. В коже ГК сосредоточена в соединительной ткани дермы между волокнами коллагена и эластина, в эпидермисе и на поверхности клеток рогового слоя. Функции гиалуроновой кислоты разнообразны: от регуляции содержания влаги в тканях, включая кожу, до регуляции процессов миграции и роста клеток [3]. Недавние исследования *in vivo* показали, что наружное применение гиалуроновой кислоты уменьшает возрастные проявления кожи [4]. Гиалуроновая кислота, особенно высокомолекулярная, насыщает кожу влагой и препятствует испарению воды с ее поверх-

ности за счет образования пленки на поверхности кожи. Однако низкомолекулярная ГК способна проникать в кожу для защиты и поддержания эпидермальной гидратации и для непрерывного увлажнения рогового слоя, что обеспечивает высокое качество эпидермальной ткани [5].

Наружное проникновение молекул через кожу – один из главных вопросов в косметологии и дерматологии. Один из подходов, с помощью которого можно ответить на вопрос о формировании пленки косметического вещества на поверхности кожи человека, может быть основан на разработке метода контроля состава пленки на поверхности кожи человека.

Известны современные акустические, оптические, механические, электрические методы аппаратного исследования кожи человека и оценки физических свойств кожного покрова [6, 7]. Получаемые с помощью указанных методов данные плохо сопоставимы между собой и не дают полной информации об этом сложном, динамично изменяющемся объекте.

Цель данной работы – экспериментальное исследование процесса переноса (пробоотбора) органического вещества (на примере гиалуроновой кислоты) с упругой поверхности твердого тела (пористый эластомер, кожа человека) на шероховатую поверхность пробоотборника при трибоконтакте пробоотборника с анализируемой поверхностью с последующим определением органического вещества, перешедшего на поверхность пробоотборника. Представляла также интерес оценка возможности применения предлагаемого способа пробоотбора для исследования кинетики процесса формирования пленки органического вещества (гиалуроновой кислоты) на поверхности кожи человека.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Методика определения органического вещества на поверхности упругого тела включала два основных этапа: пробоотбор путем прикосновения шероховатой торцевой поверхности специальной кварцевой трубочки небольшого диаметра к упругой анализируемой поверхности; определение органического вещества, перенесенного на шероховатую поверхность палочки с анализируемой поверхности, методом термоокислительной спектроскопии – окситермографии.

Для обеспечения воспроизводимых условий пробоотбора с контролируемым давлением шероховатой поверхности пробоотборника на упругую поверхность анализируемого вещества создали специальный стенд (рис. 1). Пробоотборник 1 в виде тонкой кварцевой трубочки с запаянной плоской шероховатой поверхностью с одной стороны вставляли в вертикальное направляющее

устройство 4. Нижний плоский шероховатый торец пробоотборника упирался в упругую поверхность, с которой осуществлялся пробоотбор органического вещества 2. На верхний конец пробоотборника ставили грузик определенной массы 5. Фиксировали также продолжительность взаимодействия пробоотборника с упругой поверхностью анализируемого тела. Таким образом, удавалось создавать контролируемые и воспроизводимые условия воздействия пробоотборника при трибоконтакте с поверхностью анализируемого тела. Перед выполнением процедуры переноса органического вещества с поверхности анализируемого тела на поверхность пробоотборника последний отжигали в потоке воздуха при $\sim 800^\circ\text{C}$ для удаления остатков органического вещества с поверхности пробоотборника.

На следующем этапе в пробоотборник (трубочку) вставляли термпару для контроля температуры шероховатой поверхности, на которую в процессе трибоконтакта перешло органическое вещество с поверхности анализируемого тела. Далее пробоотборник вставляли в держатель окситермографа (термоокислительная установка). Методом окситермографии [8, 9] определяли органическое вещество на поверхности пробоотборника.

В качестве реагентов использовали гиалуронат натрия с молекулярной массой 3000 Да марки “Shancong Focuschem Biotech Co” и гиалуроновую кислоту фирмы “DNCSwiss” с концентрацией 1.0 мас. %

Пробы отбирали с микропористого эластомера (искусственной кожи) и с кожи человека. В первом случае кусок кожи помещали в раствор гиалуроновой кислоты заданной концентрации на 10 мин, после чего его извлекали, давали стечь лишней жидкости и путем нажатия пробоотборником на поверхность кожи осуществляли отбор образца. Силу нажатия строго регулировали по массе грузика и времени соприкосновения пробоотборника и кожи. Во втором случае наносили на поверхность кожи человека исследуемый образец равномерным слоем и отбирали пробу путем соприкосновения пробоотборника с кожей через заданные промежутки времени. Образцы анализировали методом окситермографии на экспериментальной установке, принципиальная схема которой представлена на рис. 2. Данная установка отличается от использовавшейся в работе [10] тем, что для термоокисления органического вещества использовали чистый воздух, получаемый от генератора чистого воздуха.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В работе [11] нами исследована возможность определения концентрации гиалуроновой кислоты в водных растворах. Построена градуировоч-

ная кривая, позволяющая рассчитать минимальное количество вещества в пробе, которое можно обнаружить методом окситермографии. Объем 5 мкл водного раствора гиалуроновой кислоты нанесли на торец кварцевой палочки. Удерживание кислоты на пробоотборнике обусловлено его шероховатой поверхностью. Полученное уравнение градуировочной зависимости имеет вид:

$$y = 965.46x + 34.432,$$

где x — концентрация гиалуроновой кислоты, мас. %; y — площадь пика гиалуроновой кислоты, усл. ед. Относительное стандартное отклонение составляло 0.07. Уравнение полученной градуировочной зависимости позволило определить абсолютный предел обнаружения гиалуроновой кислоты, равный 3 мкг вещества в пробе объемом 5 мкл, с применением формулы, представленной в учебнике [12].

Для изучения влияния давления на перенос органического вещества на шероховатую поверхность пробоотборника использовали искусственную кожу. Этот объект обладает упругими свойствами и в некотором приближении является имитатором человеческой кожи. Кожаную пластинку пропитывали водным раствором гиалуроновой кислоты и через 10 мин извлекали из раствора и давали стечь остатку жидкости. Для изучения влияния давления на количество гиалуроновой кислоты, перешедшей на шероховатую поверхность пробоотборника, пропитанный кусочек кожи помещали в специальное устройство для пробоотбора (рис. 1, позиция 2) и осуществляли пробоотбор путем нажатия пробоотборника на поверхность кожи, изменяя массу груза от 40 до 121 г (рис. 1, позиция 5). Далее вынимали пробоотборник, вставляли его в держатель системы перемещения (рис. 2, позиция 3) окситермографа и определяли количество гиалуроновой кислоты, перенесенной на поверхность пробоотборника, по методике [11].

Для получения термоокислительного спектра (окситермограммы) использовали двухступенчатый режим введения пробоотборника в высокотемпературный реактор. На первой ступени при введении торца пробоотборника в зону А отгоняли воду с шероховатой поверхности пробоотборника. На второй ступени при введении поверхности пробоотборника в зону В (высокотемпературная часть реактора) происходило окисление гиалуроновой кислоты, находящейся на поверхности пробоотборника, что приводило к уменьшению содержания кислорода в потоке воздуха. Для обеспечения полноты окисления в высокотемпературной части реактора располагался платиновый катализатор. Содержание кислорода в потоке воздуха непрерывно регистрировалось датчиком кислорода [13, 14]. Типичный термо-

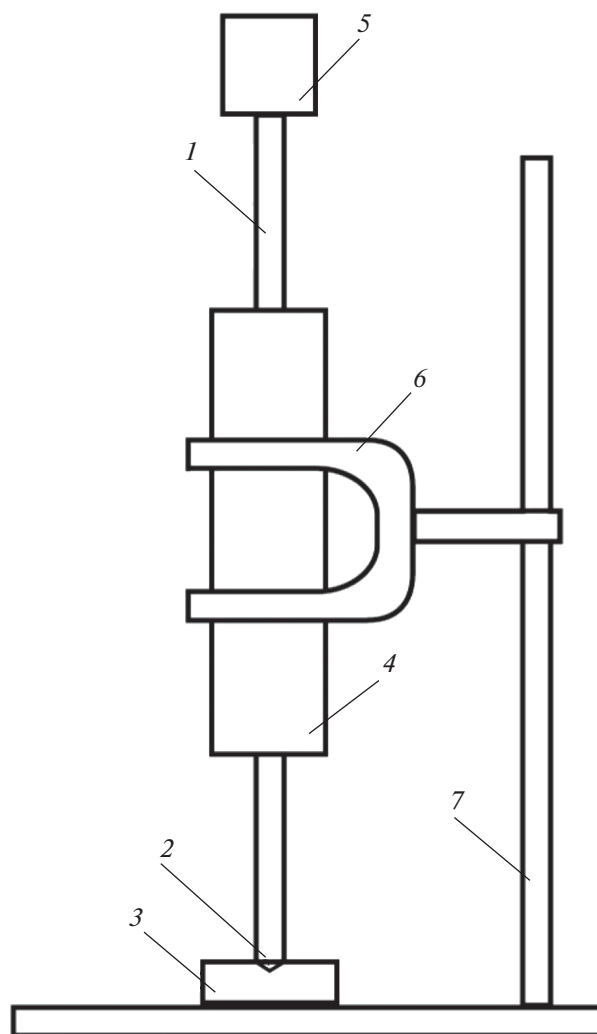


Рис. 1. Схема специального стенда для отбора вещества с упругой поверхности твердого тела. 1 — пробоотборник в виде кварцевой трубочки с торцевой шероховатой поверхностью на торце; 2 — место контакта шероховатой поверхности пробоотборника с упругой поверхностью анализируемого тела; 3 — упругое твердое тело; 4 — вертикальное направляющее устройство; 5 — грузик, создающий контролируемое давление на поверхность анализируемого тела; 6 — держатель направляющего устройства; 7 — штатив.

окислительный спектр (окситермограмма) представлен на рис. 3.

Аналитическим сигналом являлась площадь отрицательного пика (площадь пика гиалуроновой кислоты $S_{гк}$, мВ мин), характеризующая количество кислорода, пошедшего на окисление гиалуроновой кислоты на поверхности пробоотборника. Используя уравнение градуировочной зависимости, определена масса гиалуроновой кислоты, отобранная с поверхности искусственной кожи.

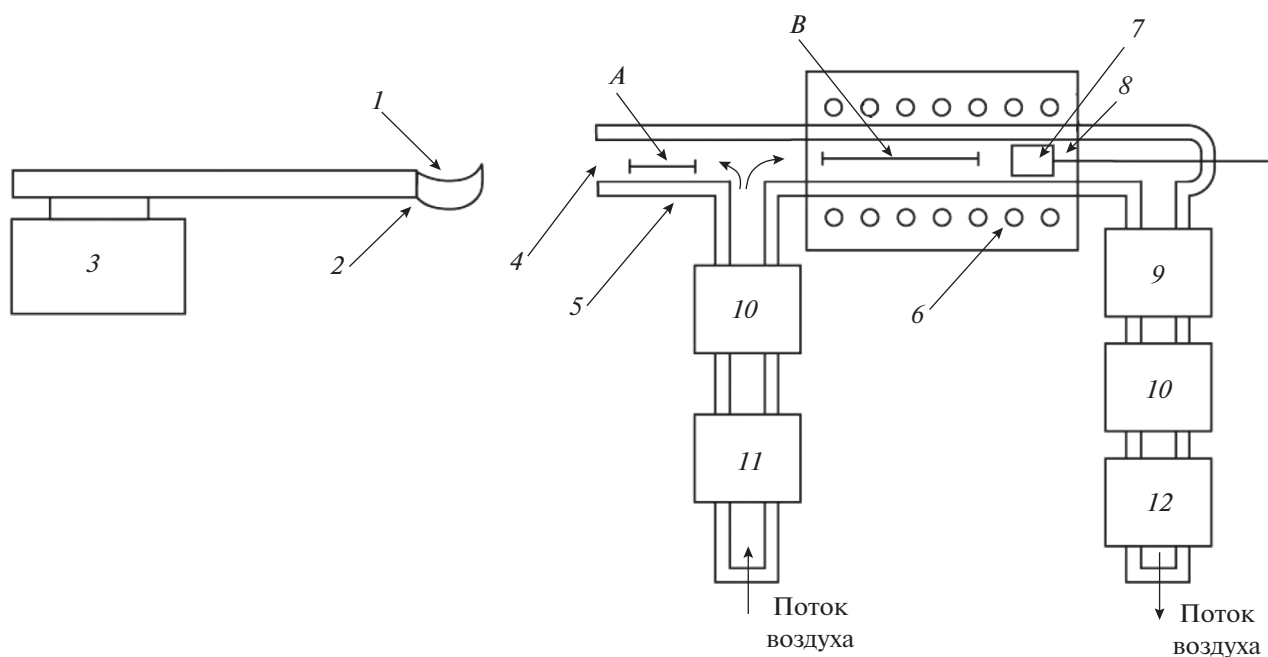


Рис. 2. Принципиальная схема оксистермографа, с помощью которого определяется органическое вещество, перенесенное на торцевую шероховатую поверхность пробоотборника. А – зона отгонки (газодинамический шлюз – создание потока чистого воздуха, не позволяющего атмосферному воздуху поступать в реактор), В – высокотемпературная зона, в которой происходит окисление органических веществ. 1 – пробоотборник в виде кварцевой палочки с торцевой шероховатой поверхностью; 2 – термопара, касающаяся внутренней торцевой поверхности пробоотборника; 3 – механизм перемещения пробоотборника при введении пробоотборника в реактор по программе “Профиль движения пробоотборника”; 4 – входное отверстие высокотемпературного реактора; 5 – реактор – кварцевая трубка с отрезком; 6 – высокотемпературная печь для нагрева реактора; 7 – катализатор; 8 – термопара для контроля температуры в реакторе; 9 – датчик кислорода в потоке воздуха; 10 – ротаметр; 11 – газовый компрессор; 12 – побудитель газового потока.

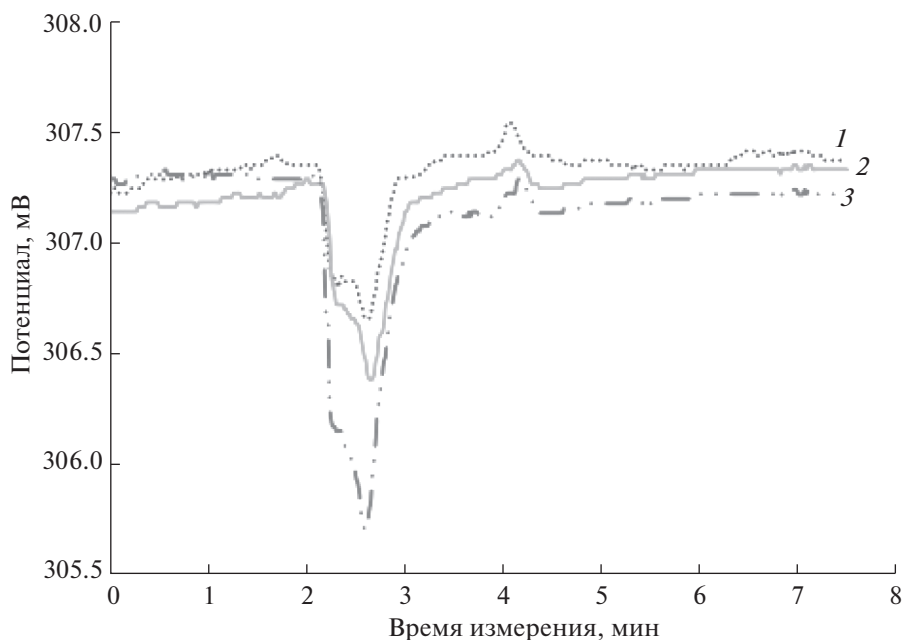


Рис. 3. Оксистермограммы гиалуроновой кислоты при ее отборе с поверхности искусственной кожи. Концентрация гиалуроновой кислоты, мас. %: 1 – 1.0, 2 – 1.5, 3 – 2.0.

Полученные данные о влиянии давления нажатия пробоотборника на поверхность кожи на количество гиалуроновой кислоты, перенесенной на поверхность пробоотборника, представлены в табл. 1. Давление рассчитывали по формуле:

$$p = \frac{F}{S} = \frac{mg}{S},$$

где F – сила нажатия, Н/м²; m – суммарная масса грузика и палочки, г; S – площадь касания (площадь торца палочки), м². Как видно из таблицы, количество вещества, перенесенное на поверхность пробоотборника с поверхности искусственной кожи, не сильно зависит от давления пробоотборника на поверхность кожи. Так, при изменении давления в 6 раз количество гиалуроновой кислоты, перешедшей на поверхность палочки, изменяется в 1.17 раз. Экспериментально установлено, что существует интервал величин давления от 2×10^{-6} до 4.5×10^{-6} Н/м², в котором практически не меняется количество вещества, перенесенного на пробоотборник. Пробоотбор в диапазоне давлений, в котором не меняются условия переноса вещества на поверхность пробоотборника, позволяет свести к минимуму погрешности, обусловленные нажатием пробоотборника на анализируемую поверхность.

Найденные условия пробоотбора использовали для изучения процесса формирования пленки на поверхности кожи человека. Раствор гиалуроновой кислоты (1%-ный, по массе) наносили в виде полоски на кожу человека на внешнюю

Таблица 1. Влияние силы нажатия пробоотборника на поверхность искусственной кожи на количество гиалуроновой кислоты, переходящей на пробоотборник

Масса нажатия, г	$p \times 10^6$, Н/м ²	$c_{ГК}$, мас. %	$S_{ГК}$, мВ мин
Сильное нажатие (рукой до упора)	Сильное нажатие (рукой до упора)	1.5	1346 ± 10
121	6.1	1.5	1049 ± 4
101	5.1	1.5	1049 ± 4
92	4.6	1.5	993 ± 4
72	3.6	1.5	993 ± 4
60	3.0	1.5	995 ± 8
40	2.0	1.5	995 ± 8
Только палочка, 20	1.0	1.5	895 ± 3

часть кисти. Предварительно этот участок кожи человека обезжиривали протиранием спиртовой салфеткой. Через определенные промежутки времени с разных участков поверхности кожи человека отбирали пробы на поверхность пробоотборника. На рис. 4 представлена кинетическая зависимость формирования “пленки” при нанесении 1%-ного (по массе) водного раствора гиалуроновой кислоты на поверхность кожи человека. Как видно,

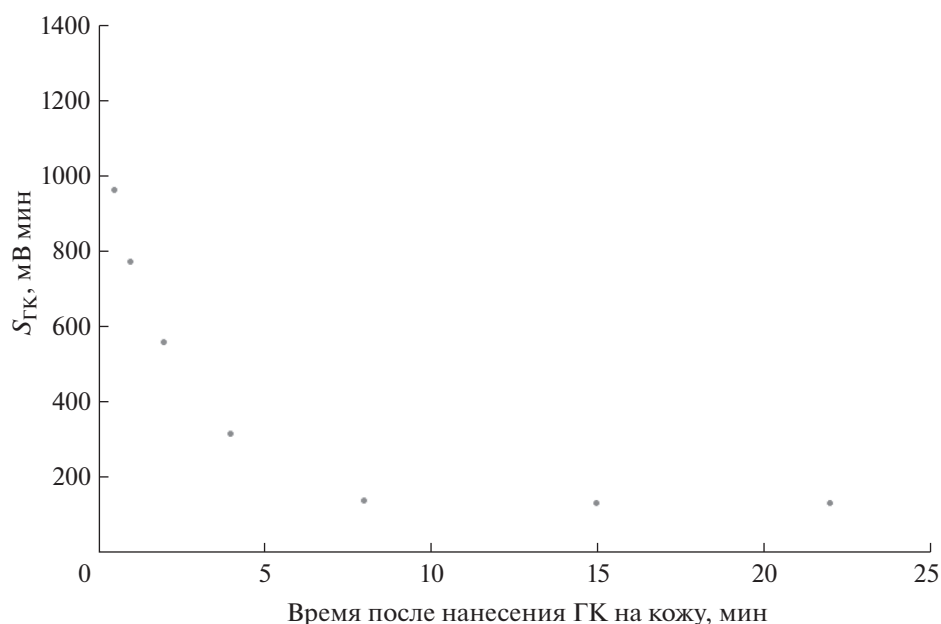


Рис. 4. Кинетика формирования пленки на поверхности кожи человека при нанесении 1%-ного (по массе) водного раствора гиалуроновой кислоты. По оси y – аналитический сигнал (площадь пика), по оси x – время пробоотбора после нанесения раствора гиалуроновой кислоты на поверхность кожи человека.

формирование “пленки” на поверхности кожи человека происходит примерно через 7 мин.

* * *

Таким образом, впервые показано, что предлагаемый способ пробоотбора с последующим определением вещества, перенесенного на поверхность пробоотборника, методом окситермографии может быть использован для изучения процессов формирования пленок косметических веществ, наносимых на кожу человека.

Работа поддерживается грантом РФФИ № 17-0300854.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zuev B.K., Chudinova V.V., Kovalenko V.V., Yagov V.V. The conditions of formation of the sea surface microlayer and techniques for studying organic matter in it // *Geochem. Int.* 2001. V. 39. № 7. P. 702.
2. Соколовский Е.В. Кожные и венерические болезни: учебное пособие для студентов медицинских ВУЗов. СПб: Фолиант, 2008. С. 520.
3. Kawada C., Yoshida T., Yoshida H. Ingested hyaluronan moisturizes dry skin // *Nutrition J.* 2014. V. 13. № 1. P. 70.
4. Бакина Е.В. Современные методы омоложения в эстетической косметологии // *Международный научно-исследовательский журнал.* 2016. № 4. Часть 5. С. 74.
5. Pavicic T., Gauglitz G.G. Efficacy of cream-based novel formulations of hyaluronic acid of different molecular weights in anti-wrinkle treatment // *J. Drugs Dermatol.* 2011. V. 10. № 9. P. 990.
6. Тимофеев Г.А. Методы аппаратного исследования кожи человека // *Косметика и медицина.* 2005. № 4. С. 28.
7. Сомкин П.Б. Обзор аппаратных методов исследования кожного покрова человека и его механических свойств / Сб. науч. тр. СевКавГТУ. Сер. Естественнонаучная. Ставрополь: СевКавГТУ, 2007. Вып. 3. С. 214.
8. Зуев Б.К. Патент на изобретение № 2411509 РФ // Б. И. 2011. № 4.
9. Зуев Б.К., Коротков А.А., Филоненко В.Г., Машковцев А.Н., Зволинский В.П. Экспрессное определение химического потребления кислорода в воде с использованием высокотемпературных твердо-электролитных ячеек // *Журн. аналит. химии.* 2004. Т. 59. № 2. С. 185.
10. Роговая И.В., Зуев Б.К., Титова Т.В., Моржухина С.В., Сараева А.В., Филоненко В.Г. Оптимизация условий определения органического вещества в воде “безреагентным” методом окситермографии и его применение для анализа природной воды // *Журн. аналит. химии.* 2016. Т. 71. № 10. С. 1069.
11. Зуев Б.К., Филоненко В.Г., Нестерович Д.С., Поликарпова П.Д. Определение гиалуроновой кислоты в водных растворах с использованием воздуха в качестве окислителя // *Журн. аналит. химии.* 2018. Т. 73. № 10. С. 763.
12. Золотов Ю.А. Основы аналитической химии в двух книгах. М.: Академия, 2014. С. 57.
13. <https://www.ngkntk.co.uk/index.php/technical-centre/lambda-sensors/how-does-the-lambda-sensor-work/> (16.03.2018)
14. http://www.waltech.com/open-source-designs/wbo2_report/ (16.03.2018)