

# Ocena możliwości zastosowania magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) w jakościowej analizie wybranych konserwantów obecnych w kosmetykach

## The evaluation of the possibility of using nuclear magnetic resonance (NMR) in qualitative analysis of selected preservatives present in cosmetics

Izabela Głaszczka<sup>1</sup>, Katarzyna Paradowska<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Koło Naukowe „Free Radicals” przy Zakładzie Chemii Fizycznej, Wydział Farmaceutyczny, WUM, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa

<sup>2</sup> Zakład Chemii Organicznej i Fizycznej, Wydział Farmaceutyczny, WUM, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa, adres e-mail: katarzyna.paradowska@wum.edu.pl

---

**Słowa kluczowe:** <sup>1</sup>H NMR, konserwanty, parabeny

**Key words:** <sup>1</sup>H NMR, preservatives, parabens

---

### Streszczenie

Substancje konserwujące są nieodłącznym składnikiem większości produktów kosmetycznych obecnych na rynku. Ich obecność zapewnia trwałość produktu oraz odpowiednie właściwości i bezpieczeństwo stosowania. Stężenie konserwantów jest ściśle określone i regulowane normami prawnymi. Celem niniejszej pracy była jakościowa analiza wybranych związków o właściwościach konserwujących: parabenów, 2-fenoksyetanolu i alkoholu benzyłowego w próbkach kosmetycznych z wykorzystaniem metody <sup>1</sup>H NMR, czyli protonowego magnetycznego rezonansu jądrowego i ocena przydatności tej metody w wymienionym celu. Analizie poddano dziewięć produktów kosmetycznych, do których należały toniki, płyny micelarne i szampony do włosów. Badania wykazały, że widma <sup>1</sup>H NMR są doskonałym narzędziem do stwierdzenia obecności substancji konserwujących w produktach kosmetycznych. Umożliwiają szybką weryfikację kosmetyków pod względem zawartości badanych substancji.

### Summary

Preservatives are an inherent component of most cosmetic products on the market. Their presence ensures the durability of the product as well as appropriate properties and safety of use. The concentration of preservatives is strictly defined



and regulated by legal standards. The aim of this study was a qualitative analysis of selected preservatives: parabens, 2-phenoxyethanol and benzyl alcohol in cosmetic samples using the  $^1\text{H}$  NMR method, i.e. nuclear magnetic resonance, and evaluation of the suitability of this method for the above-mentioned purpose. Nine cosmetic products were analyzed, including toners, micellar waters and hair shampoos. Research has shown that  $^1\text{H}$  NMR spectra are an excellent tool for identifying the presence of preservatives in cosmetic products. They enable quick verification of cosmetics in terms of the content of preservatives.

## Wstęp

Ważnym i nieodłącznym elementem naszej codzienności we wszystkich grupach wiekowych są różnego rodzaju kosmetyki. Głównym ich zadaniem jest zapewnienie higieny, poprawa kondycji skóry w różnych etapach życia oraz przeciwdziałanie następstwom starzenia. Kosmetyki obecne na rynku kosmetycznym posiadają różne daty ważności – w przypadku niektórych są one stosunkowo długie. Biorąc pod uwagę fakt, iż produkty takie, szczególnie jeśli zawierają w swoim składzie wodę, są bardzo narażone na działanie drobnoustrojów, zastosowanie w ich produkcji konserwantów jest nieuniknione i wskazane.

Obecnie na rynku kosmetycznym wśród konsumentów dominuje zainteresowanie produktami naturalnymi, ekologicznymi czy roślinnymi, również co do konserwantów. Z tego względu wielu producentów na etykietach swoich kosmetyków umieszcza informacje o braku tych związków w składzie. Z uwagi na fakt, że produkty takie muszą być zabezpieczone przed szkodliwym działaniem, powinny być należycie chronione. W związku z tym za hasłem „bez konserwantów” kryje się stosowanie substancji, które nie widnieją na liście substancji konserwujących używanych w kosmetykach. Często związki te, poza działaniem przedłużającym trwałość, mają dodatkowe właściwości, jak np. działanie przeciwdrobnoustrojowe.

Zła sława konserwantów, szczególnie z grupy parabenów nie ma ugruntowanych podstaw, a mimo to na rynku kosmetycznym odchodzi się od tego rodzaju substancji jako składników kosmetyku. Nie ma jednak możliwości zaprzestania korzystania ze środków konserwujących. Znajdują się one nie tylko w kosmetykach, ale też w produktach żywnościowych czy leczniczych. Ich obecność stanowi integralną część produktu, który ma zachować swoje właściwości chemiczne i fizyczne przez długi czas oraz ma być bezpieczny do stosowania przez konsumentów.

Stężenie konserwantów jest ściśle uregulowane normami prawnymi i nie może zostać przekroczone. Wpływ tych związków na zdrowie człowieka w dalszym ciągu stanowi temat wielu badań naukowych różnych produktów, w tym również produktów kosmetycznych.



Definicja kosmetyku określona jest w sposób jednoznaczny w artykule 2 Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1223/2009 z 30 listopada 2009 r. dotyczącym produktów kosmetycznych [1]. W zależności od przeznaczenia wyróżniamy kosmetyki do skóry, włosów, paznokci i twarzy. Inny podział dotyczy grupy docelowej – znane są preparaty dla kobiet, mężczyzn, dzieci, nastolatków i dla osób starszych. Kolejny czynnik klasyfikacji to funkcje przez nie pełnione, tj. produkty czyszczące, pielęgnujące, ochronne, zapachowe oraz kosmetyki zmieniające wygląd.

Obserwujemy duże zainteresowanie kosmetykami pielęgnacyjno-ochronnymi. Pomagają one zachować dobry stan skóry zdrowej, chronić przed niekorzystnym działaniem czynników zewnętrznych, a także przywracać jej prawidłową strukturę [2]. Część z nich może wykazywać charakter leczniczy.

Obok klasycznych kosmetyków wyróżniamy produkty należące do kategorii, takich jak: dermokosmetyki czy kosmetyki naturalne. Dermokosmetyki to produkty, które mogą wykazywać działanie przeciwzapalne, przeciwobrzękowe czy być stosowane jako środki gojące oraz zmniejszające widoczność blizn [3]. Dermokosmetyki w znacznym stopniu mogą wspomóc proces leczenia, lecz nie zastępują produktów leczniczych. Stosowane są w schorzeniach, takich jak: trądzik, łupież czy atopowe zapalenie skóry. Kosmetyki naturalne to takie, w których dodatek substancji syntetycznych nie przekracza 5%. Jako konserwanty stosowane są w nich: alkohol benzylowy, kwas salicylowy, sorbowy czy benzoesowy, tj. związki syntetyczne, ale identyczne z naturalnymi. Z kolei za zapach w kosmetykach naturalnych odpowiadać mogą olejki eteryczne występujące naturalnie [4]. W fitokosmetykach za aktywność odpowiadają substancje zawarte w ekstraktach i wyciągach z roślin, olejkach zemulgowanych lub czystych oraz eterycznych [5].

Efekt terapeutyczny i odżywczy środków kosmetycznych i leczniczych związany jest z procesem przenikania substancji aktywnej przez skórę. Proces ten może zachodzić z różną intensywnością. Wyróżniamy trzy etapy przenikania: powierzchniowy (adsorpcja), śródskórny (penetracja) i głęboki (resorpcja). W przypadku środków leczniczych korzystne jest, aby substancja przenikała do układu krążenia. Wskazane jest, aby szybkość tego przenikania była jak największa. Z kolei w przypadku preparatów kosmetycznych jest odwrotnie. Korzystną cechą jest, aby substancja aktywna przenikała wolno lub wcale, zatem charakterystyczne jest przenikanie trzema etapami.

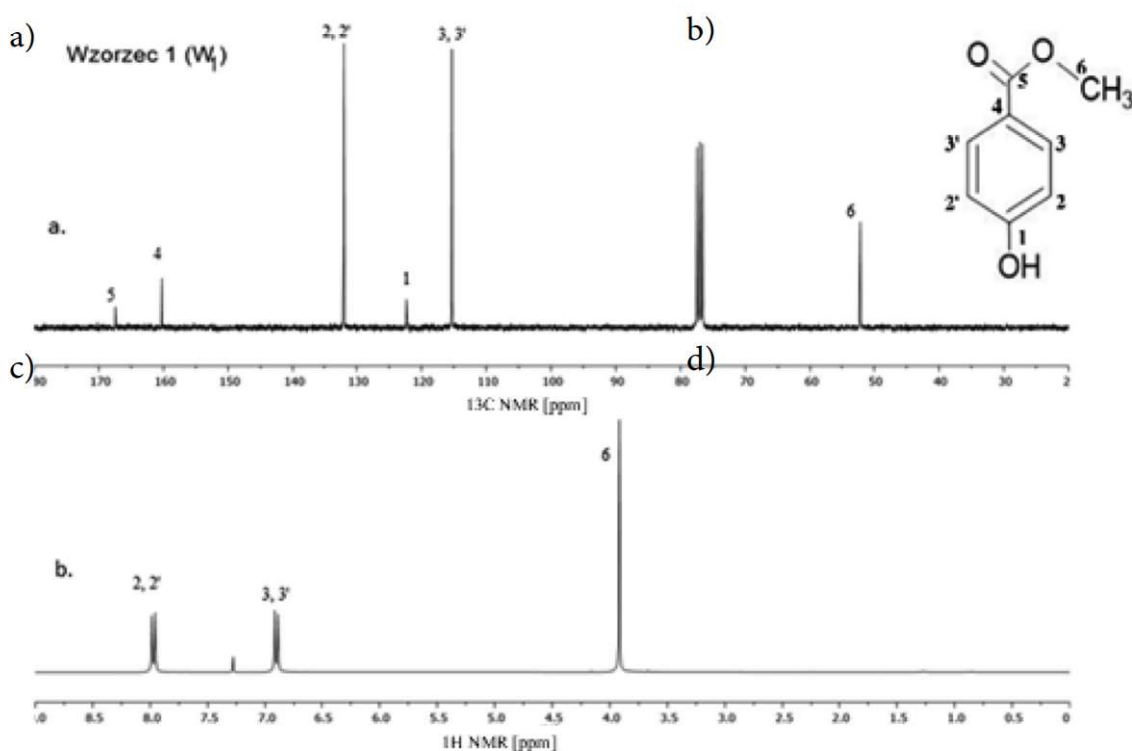
Produkty kosmetyczne, szczególnie te zawierające choćby niewielką ilość wody i substancje organiczne, narażone są na działanie mikroorganizmów, takich jak: bakterie, pleśnie czy grzyby. Ich wpływ może niekorzystnie oddziaływać na kosmetyk, poprzez modyfikację wyglądu, zapachu, konsystencji i właściwości. Ponadto obecność produktów przemiany materii drobnoustrojów może powodować podrażnienia skóry konsumentów [2]. W celu ich ochrony, zapobieganiu przed tym zjawiskiem i w celu przedłużenia trwałości, dodawane są do kosmetyków substan-



cje konserwujące. Do grupy tej należy wiele związków, m.in. parabeny, alkohole, fenole, aldehydy, pochodne kwasów organicznych i substancje nieorganiczne [6].

Konserwanty, aby mogły zostać użyte w produktach kosmetycznych, muszą spełniać szereg wymagań – być bezpieczne w zastosowaniu, nietoksyczne i wykazywać dobrą tolerancję. Efekt terapeutyczny powinien być odczuwalny w jak najniższych stężeniach, by zminimalizować działania niepożądane, a także wykazywać aktywność w szerokim spektrum [7]. Substancje te muszą być także stabilne i dobrze rozpuszczalne w wodzie [2], a ich działanie w organizmie człowieka powinno być wielokierunkowe. Jedną z najpopularniejszych grup konserwantów są parabeny. Jako środki konserwujące stosować je zaczęto w latach trzydziestych XX wieku. Chemicznie to estry z resztą kwasu p-hydroksybenzoesowego, różniące się podstawnikiem (rodzajem grupy alkilowej) w pozycji *para*.

W ich budowie wyróżniamy różne grupy alkilowe: metylową, etylową, propylową czy butylową, których nazwa jest związana z tym podstawnikiem. Są to zatem kolejno: metyloparaben, etyloparaben, propyloparaben i butyloparaben (Rysunek 1).



**Rysunek 1.** Wzory strukturalne najbardziej popularnych parabenów: a. metyloparabenu, b. etyloparabenu, c. propyloparabenu, d. butyloparabenu.

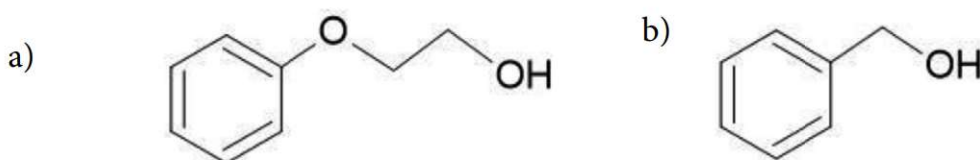
**Figure 1.** Structural formulas of the most popular parabens: a. methylparaben, b. ethylparaben, c. propylparaben, d. butylparaben.

W związku z tym różnią się one nieznacznie między sobą rozpuszczalnością oraz działaniem przeciwdrobnoustrojowym. Długość łańcucha alkilowego determinuje rozpuszczalność w wodzie – maleje ona wraz ze wzrostem długości łańcucha. Wraz ze zmniejszeniem rozpuszczalności właściwości przeciwdrobnoustrojowe rosną, gdyż ich aktywność zależy od środowiska, w którym się znajdują. Największą trwałość wykazują w pH 4-5. Najlepszą efektywność zapewnia stosowanie mieszanin parabenów, ze względu na ich synergistyczne działanie [8]. Najwięcej parabenów dostarczanych do organizmu ludzkiego pochodzi z produktów kosmetycznych (50 mg), następnie z produktów farmaceutycznych (25 mg), a najmniej parabenów dostarczamy wraz żywnością (1 mg) [8].

Inne przykłady konserwantów stosowanych w kosmetykach to, np. fenoksyetanol (2-fenoksyetanol, monofenylowoeter glikolu etylenowego czy fenoksytol). Wykazuje skuteczność wobec szerokiego spektrum drobnoustrojów (bakterie z grupy Gram-dodatnich i Gram-ujemnych). Ponadto posiada aktywność przeciwko drożdżakom, do których należy m.in. *Candida albicans*. Ma zastosowanie w wielu produktach kosmetycznych, a także w lekach. Dodatkowo może być wykorzystywany jako substancja zapachowa, stosowana w mieszankach. W Europie, maksymalne stężenie fenoksyetanolu w produktach kosmetycznych wynosi 1%. Nie zaleca się stosowania go na obszar pieluszkowy u dzieci poniżej 3 roku życia [9]. Fenoksyetanol może mieć zastosowanie jako preparat na rany i oparzenia w stężeniu 2–2,2%. Dodatkowo, w wyższym stężeniu (od 3 do 9%) może występować w środkach odstraszających owady [10].

Do konserwantów zaliczany jest także alkohol benzylowy. To aromatyczny alkohol, znany również pod nazwami benzenometanol, fenylometanol, fenylkarbinol czy alkohol fenylometylowy. W kosmetykach pełni rolę konserwantu, rozpuszczalnika oraz substancji odpowiedzialnej za zapach. Zmniejsza także lepkość kosmetyku. Podobnie jak fenoksyetanol, maksymalne stężenie alkoholu benzylowego określone przez Parlament Europejski i Radę to 1% [11]. Bez ograniczeń stosowany jest w preparatach, takich jak: mydła, szampony, farby do włosów, cienie i tusze do rzęs [12].

Budowę wymienionych konserwantów przedstawiają wzory strukturalne na Rysunku 2.



**Rysunek 2.** Wzory strukturalne konserwantów: a. 2-fenoksyetanolu, b. alkoholu benzylowego.  
**Figure 2.** Structural formulas of preservatives: a. 2-phenoxyethanol, b. benzyl alcohol.

W związku z wieloma obostrzeniami, co do zawartości tych związków w produktach, ważna jest ciągła weryfikacja ich zawartości w materiale różnego pochodzenia i sprawdzanie deklaracji producentów. W artykule przedstawiona została



jakościowa analiza związków z grupy konserwantów, tj. parabenów, 2-fenoksyetanolu i alkoholu benzylowego. Wymienione konserwanty to najczęściej stosowane substancje konserwujące występujące w kosmetykach. Do badań jakościowych serii wybranych kosmetyków została wykorzystana jedna z metod spektroskopowych, magnetyczny rezonans jądrowy –  $^1\text{H}$  NMR.

## Materiał i metody

Analizie poddano dziewięć kosmetyków, wśród których były: 4 toniki, 3 płyny micelarne oraz 2 szampony do włosów. Zgodnie ze składem, powinny one zawierać konserwanty z grupy parabenów, fenoksyetanol i/lub alkohol benzylowy. W celach badawczych, do porównania, jeden z produktów nie zawiera żadnych z wyżej wymienionych związków (dane według producenta). Skład kosmetyków wraz z wyszczególnionymi konserwantami obecnymi w składzie przedstawia Tabela 1.

**Tabela 1.** Skład deklarowanych produktów kosmetycznych.

**Table 1.** Composition of the declared cosmetic products.

L.p	Nazwa	Konserwanty	L.p	Nazwa	Konserwanty
1.	Odświeżający tonik do twarzy	<ul style="list-style-type: none"> <li>• metyloparaben</li> <li>• alkohol benzylowy</li> </ul>	6.	Płyn micelarny	• brak
2.	Tonik normalizujący do twarzy	<ul style="list-style-type: none"> <li>• metyloparaben</li> <li>• alkohol benzylowy</li> </ul>	7.	Szampon przyspieszający porost włosów	• alkohol benzylowy
3.	Wzmacniający szampon do włosów długich, skłonnych do zniszczeń i przetłuszczania się u nasady	<ul style="list-style-type: none"> <li>• alkohol benzylowy</li> </ul>	8.	Tonik	<ul style="list-style-type: none"> <li>• metyloparaben</li> <li>• etyloparaben</li> <li>• propyloparaben</li> <li>• butyloparaben</li> <li>• fenoksyetanol</li> </ul>
4.	Płyn micelarny	<ul style="list-style-type: none"> <li>• fenoksyetanol</li> <li>• alkohol benzylowy</li> </ul>	9.	Oliwkowy tonik z witaminą C	• fenoksyetanol
5.	Płyn micelarny	<ul style="list-style-type: none"> <li>• fenoksyetanol</li> </ul>			

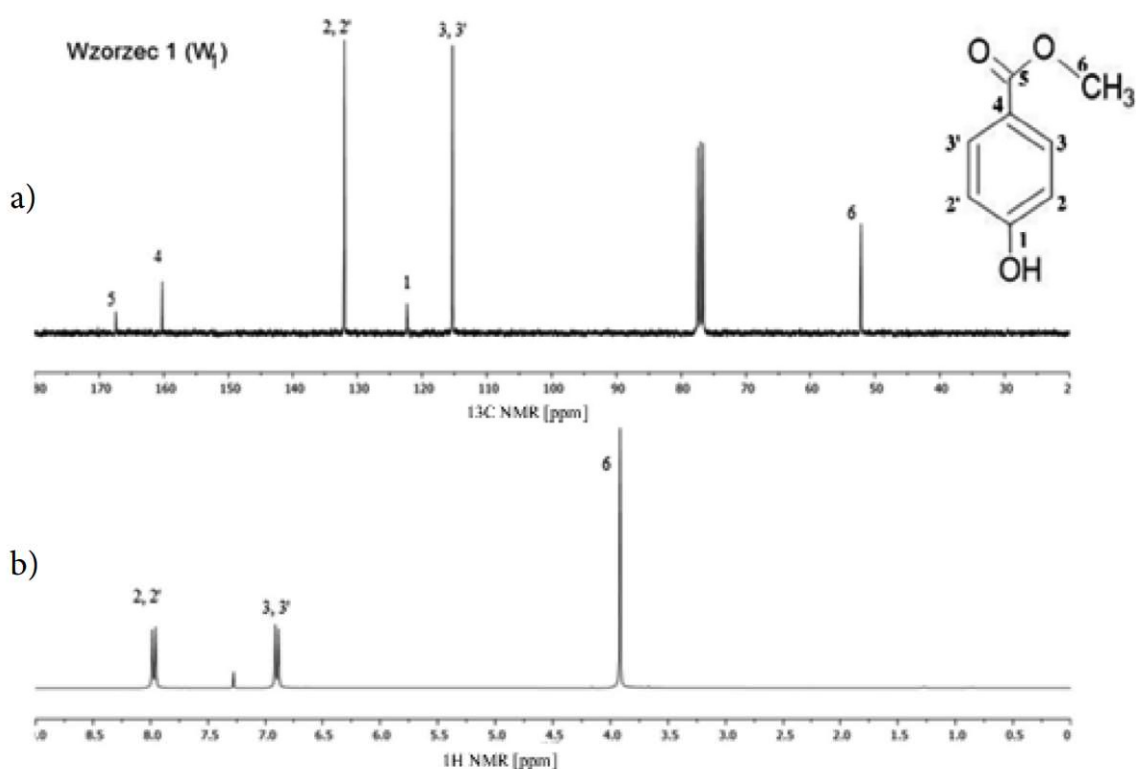
Przeprowadzenie jakościowej analizy wymagało, aby w analizowanych próbkach znacznie zredukować ilość wody, dlatego wszystkie kosmetyki zostały poddane procesowi liofilizacji. Po 25 g każdego z kosmetyków zostało zamrożone i utrzymywane w temperaturze  $-24^{\circ}\text{C}$  przez kilka dni. Następnie dokonano liofilizacji w wykorzystaniem aparatu Martin Christ Alpha 1–2 LDplus DONSERV. Próbkę liofilizowano w temperaturze  $-25^{\circ}\text{C}$  przy próżni 0,63 mBar. Czas liofilizacji wynosił 7 dni. Zakupiono też w Sigma-Aldrich odpowiednie wzorce:

## Ocena możliwości zastosowania magnetycznego rezonansu

- p-hydroksybenzoesan metylu ReagentPlus®, Sigma-Aldrich – W<sub>1</sub>
- bezwodny alkohol benzylowy, 99,8%, Sigma-Aldrich – W<sub>2</sub>
- 2-fenoksyetanol, ≥99%, Sigma-Aldrich – W<sub>3</sub>.

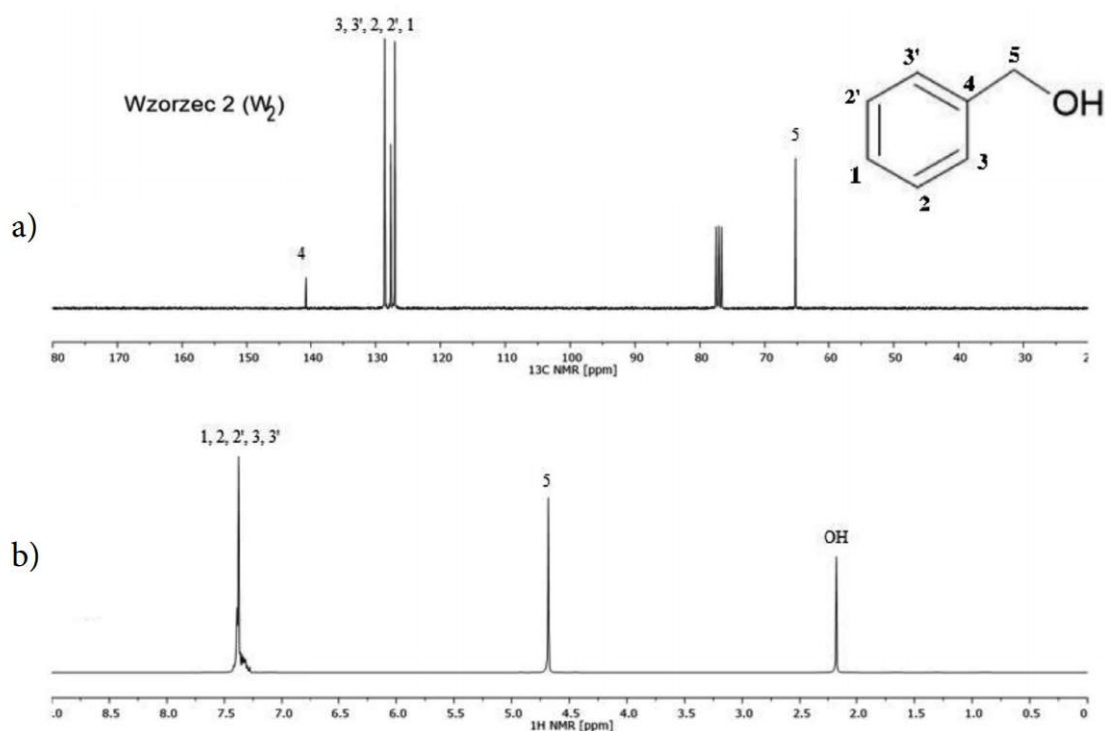
Dla wybranych wzorców konserwantów (metyloparabenu – W<sub>1</sub>, alkoholu benzylowego – W<sub>2</sub>, 2-fenoksyetanolu – W<sub>3</sub>) wykonano widma <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR, po uprzednim rozpuszczeniu w deuterowanym chloroformie (CDCl<sub>3</sub>) i dokonano pełnego przypisania sygnałów. Widma <sup>1</sup>H NMR i <sup>13</sup>C NMR wzorców, wraz z numeracją atomów węgla we wzorze strukturalnym substancji, przedstawiają trzy kolejne Rysunki: 3, 4 i 5, odpowiednio dla metyloparabenu, alkoholu benzylowego, 2-fenoksyetanolu. Z kolei dla roztworów próbek badanych (P<sub>1</sub> – P<sub>9</sub>) wykonano widma <sup>1</sup>H NMR w D<sub>2</sub>O.

Wszystkie widma zostały zarejestrowane na spektrometrze Varian VNMRs 300 Oxford. Uzyskane widma opracowano za pomocą programu Mestrenova 6.0.2. Posłużyły one do analizy jakościowej konserwantów obecnych w kosmetykach.

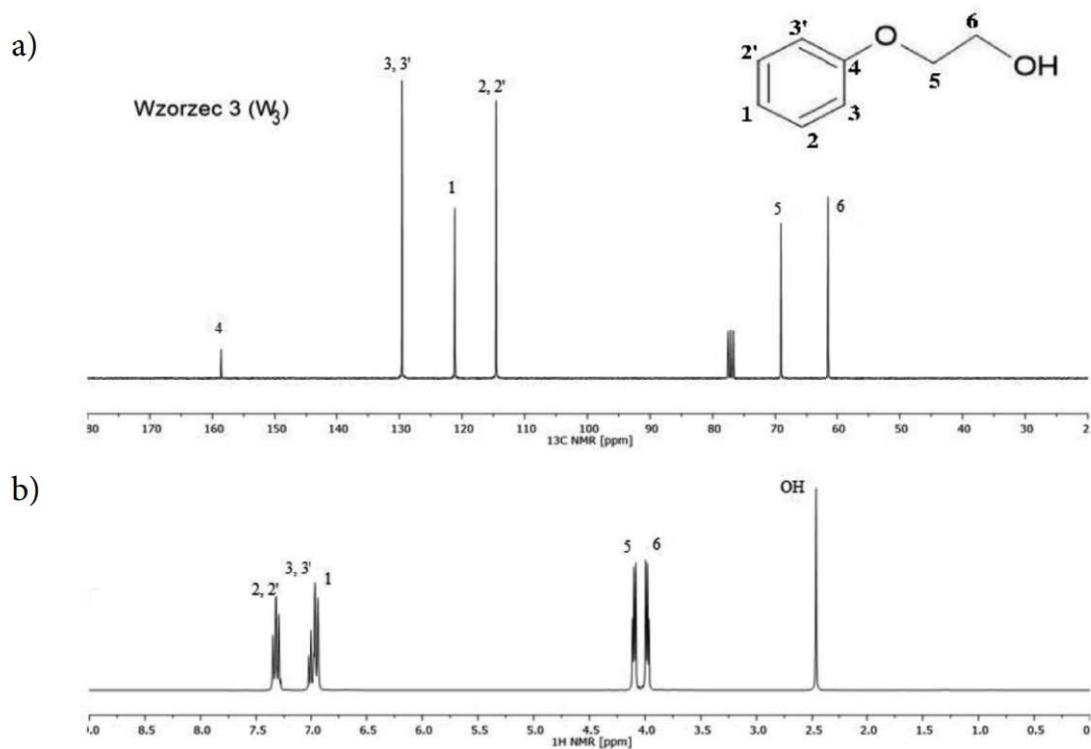


**Rysunek 3.** Widma NMR metyloparabenu (W<sub>1</sub>): a. widmo węglowe, b. widmo protonowe.

**Figure 3.** NMR spectra of methylparaben (W<sub>1</sub>): a. carbon spectrum, b. proton spectrum.



**Rysunek 4.** Widma NMR alkoholu benzyłowego ( $W_2$ ): a. widmo węglowe, b. widmo protonowe.  
**Figure 4.** NMR spectra of benzyl alcohol ( $W_2$ ): a. carbon spectrum, b. proton spectrum.



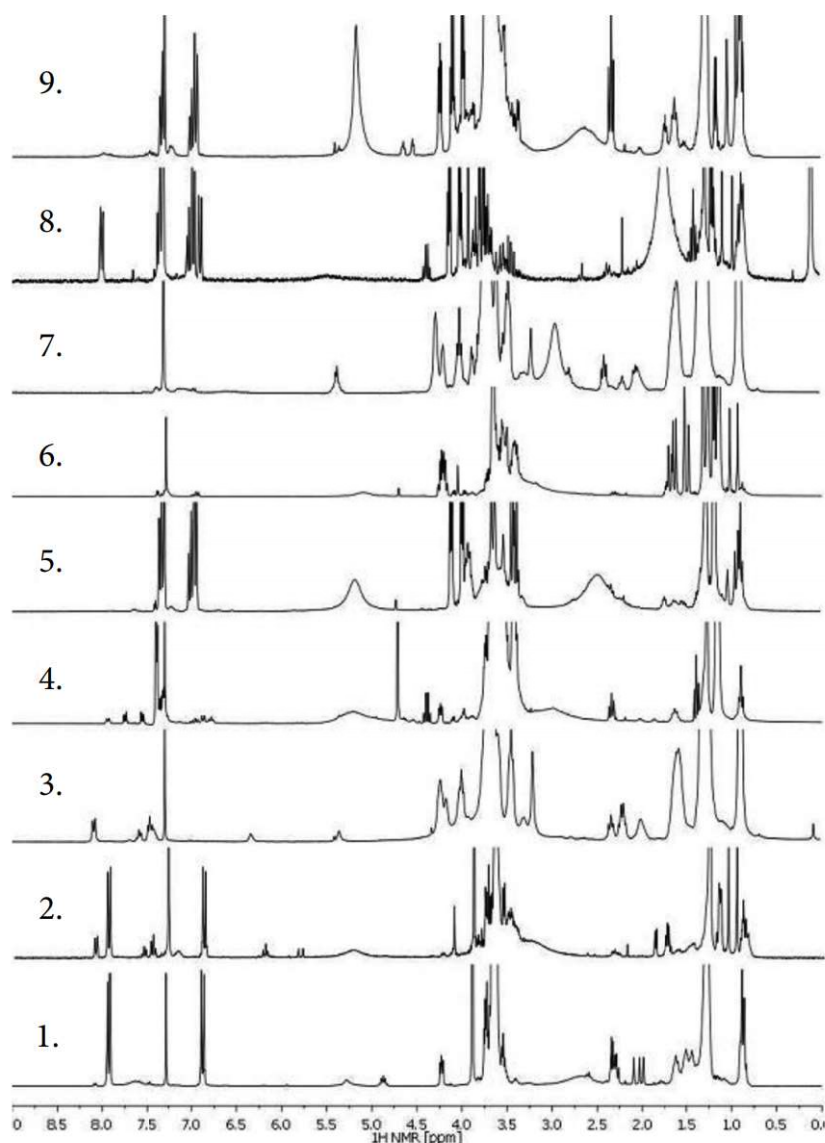
**Rysunek 5.** Widma NMR fenoksyetanolu ( $W_3$ ): a. widmo węglowe, b. widmo protonowe.  
**Figure 5.** NMR spectra of 2-phenoxyethanol ( $W_3$ ): a. carbon spectrum, b. proton spectrum.



## Wyniki i dyskusja

Magnetyczny rezonans jądrowy (NMR) to uznana metoda farmakopealna stosowana zarówno do jakościowej, jak i ilościowej analizy pojedynczych substancji oraz mieszanin. Pozwala na dokładną identyfikację substancji w próbkach, stąd też próba zastosowania widm  $^1\text{H}$  NMR w aspekcie oznaczeń konserwantów w produktach kosmetycznych do szybkiej ich identyfikacji. Wykorzystana została do wykrycia i/lub potwierdzenia obecności wybranych konserwantów w badanych dziewięciu kosmetykach.

Dla wszystkich analizowanych produktów kosmetycznych (2 szamponów, 3 płynów micelarnych i 4 toników) zarejestrowane zostały widma  $^1\text{H}$  NMR, które przedstawione są na Rysunku 6.



**Rysunek 6.** Widma  $^1\text{H}$  NMR wszystkich analizowanych próbek w  $\text{D}_2\text{O}$ . Numery 1- 9 są numerami porządkowymi analizowanych produktów.

**Figure 6.**  $^1\text{H}$  NMR spectra in  $\text{D}_2\text{O}$  of all analyzed samples no 1-9.

Przystępując do analizy widm  $^1\text{H}$  NMR w  $\text{D}_2\text{O}$  dla dziewięciu kosmetyków, od razu widać, iż względem siebie są one dość zróżnicowane. W widmie każdego produktu można wyróżnić trzy obszary, w których sygnały są stosunkowo dobrze rozdzielone i w większości nieposzerzone. Dwa obszary określane są mianem obszaru alifatycznego, czyli obszar w zakresie 0- 2,5 ppm i obszar 3,0- 5,5 ppm. Obszar aromatyczny natomiast znajduje się w zakresie wyższych wartości przesunięcia chemicznego – 6,5 ppm do 9,00 ppm. Powyżej 9,0 ppm nie zarejestrowano żadnych sygnałów. Zagęszczenie sygnałów w przypadku każdej próbki obserwujemy w obszarze alifatycznym widma (0-5ppm), mniejszą ilość sygnałów widać w obszarze aromatycznym (6 ppm-12 ppm). Taki układ jest korzystny dla analizy konserwantów, gdyż właśnie w tym (aromatycznym) zakresie występują sygnały pochodzące od konserwantów identyfikowanych w badanych kosmetykach.

W przypadku toników, woda może stanowić nawet 80-90% składu. Rejestracja widm dokonana była dla próbek zliofilizowanych, czyli po usunięciu wody, aby nie obserwować szerokiego sygnału „zasłaniającego” inne sygnały. Ponieważ pierwotnie widma były rejestrowane w  $\text{CDCl}_3$ , a dopiero po jego odparowaniu ponownie rozpuszczone, tym razem w  $\text{D}_2\text{O}$ , w wielu widmach widać „resztkowy” sygnał od  $\text{CDCl}_3$  przy  $\delta=7,26$  ppm, ale w żaden sposób nie wpływa to na identyfikację konserwantów w próbkach kosmetyków.

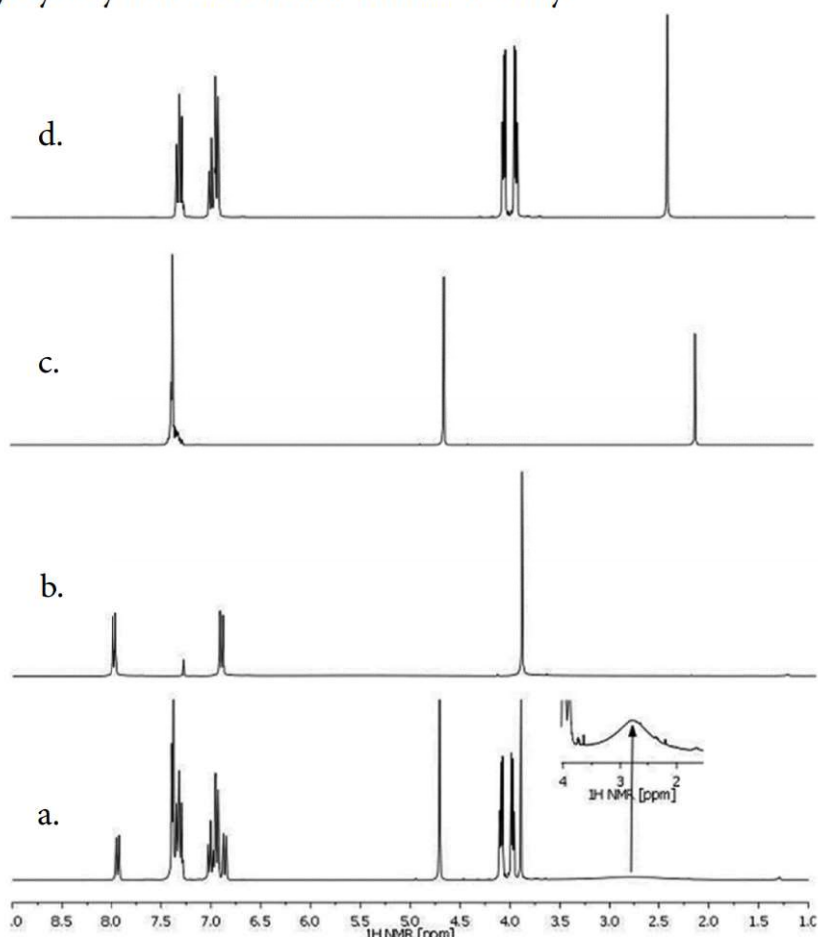
W widmach dla próbek 2, 3 i 4, w zakresie od 6,00 ppm do 9,00ppm, oprócz sygnałów charakterystycznych dla analizowanych konserwantów, obserwujemy sygnały protonów pochodzących najprawdopodobniej od substancji aktywnych obecnych w dodatkach roślinnych (ekstraktach roślinnych) do kosmetyków, np. polifenolowych związków. Dodatki roślinne przy istniejącym trendzie „powrotu do natury” są w ostatnim czasie bardzo popularne. W zasadzie każdy kosmetyk zawiera albo ekstrakt roślinny, albo mieszaninę kilku związków, rzadziej jedną aktywną substancję w swoim składzie. Sygnał przy wartości przesunięcia chemicznego  $\delta=8,10$  ppm to wartość dedykowana układowi typu  $-\text{CH}=\text{CH}-$  typowego połączenia m.in. dla pierścieni aromatycznych.

W obszarze alifatycznym, gdzie obserwujemy zarówno większą ilość sygnałów pojedynczych, jak i multipletów, możemy zidentyfikować obecność kwasu cytrynowego, czyli bardzo częstego konserwantu kosmetyków i żywności. Kwas cytrynowy o wzorze sumarycznym  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$  posiada aż trzy grupy karboksylowe ( $-\text{COOH}$ ). Jest on wymieniony w składzie sześciu z dziewięciu analizowanych kosmetyków, a przeprowadzona analiza widm  $^1\text{H}$  NMR potwierdza jego obecność w sposób jednoznaczny. Mimo braku obecności kwasu w próbce nr 9, został zidentyfikowany w widmie  $^1\text{H}$  NMR. Jest to charakterystyczny sygnał (multiplet typu AB), występujący przy wartości przesunięcia chemicznego  $\delta=2,35$  ppm.



Dużą ilość sygnałów obserwujemy w zakresie alifatycznym, a dokładnie w obszarze 3-4,5 ppm, który jest specyficzny dla protonów występujących w pochodnych cukrowych, czyli polisacharydach. Potwierdza to, że częstym dodatkiem do kosmetyków są polisacharydy wytwarzane przez fermentujące rośliny, takie jak *Biosaccharide gum*.

W pracy zastosowano widma  $^1\text{H}$  NMR w celu szybkiej i prostej weryfikacji obecności wybranych związków o charakterze konserwującym we wskazanych kosmetykach. Wybrano trzy z nich:  $W_1$  – metyloparaben (najczęściej stosowany w przemyśle kosmetycznym),  $W_2$  – alkohol benzyłowy i  $W_3$  – 2-fenoksyetanol. Ze względu na synergizm działania, często w kosmetykach mamy mieszaninę tych związków. Aby identyfikacja była łatwiejsza i aby wyeliminować możliwość nakładania się sygnałów na siebie, gdy występują w mieszaninie, wykonano widmo mieszaniny trzech oznaczanych wzorców. Rysunek 7 prezentuje zestawienie widm  $^1\text{H}$  NMR pojedynczych wzorców oraz ich mieszaniny.



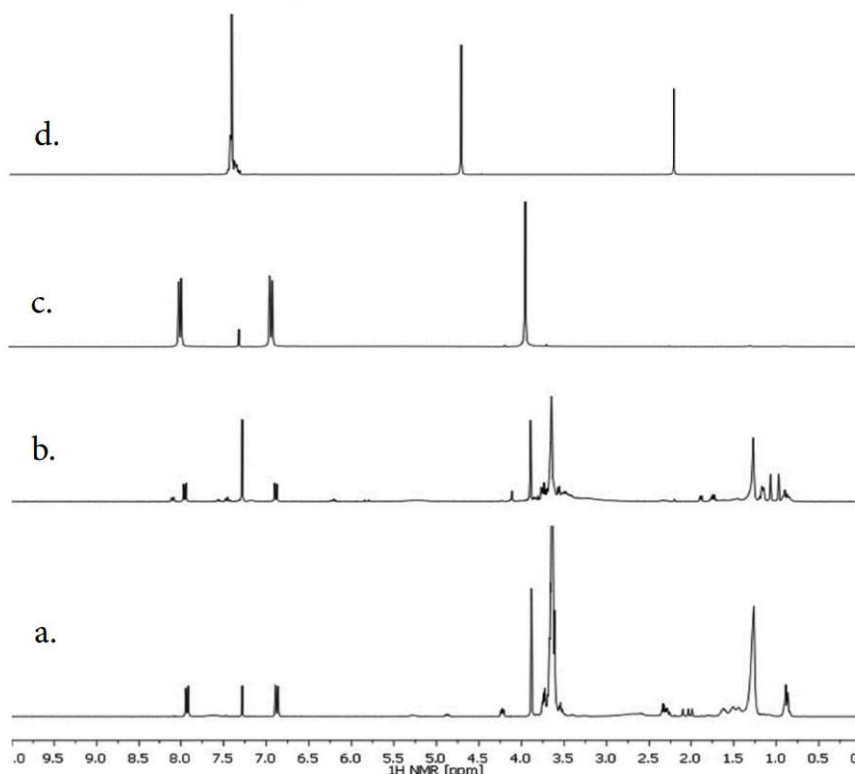
**Rysunek 7.** Widma  $^1\text{H}$  NMR: a. mieszaniny trzech wzorców oraz pojedynczych wzorców, b. metyloparaben, c. alkohol benzyłowy i d. 2-fenoksyetanol.

**Figure 7.**  $^1\text{H}$  NMR spectra: a. of the mixture of three standards and single standards, b. methylparaben, c. benzyl alcohol, d. 2-phenoxyethanol.

Mimo zmieszania trzech związków o zbliżonej budowie, sygnały są nadal dobrze odseparowane i bez większego problemu poprzez porównanie z wzorcem można dokonać identyfikacji pojedynczych substancji.

Pełna analiza z wykorzystaniem techniki  $^1\text{H}$  NMR wymagała sporządzenia odpowiednich zestawów widm  $^1\text{H}$  NMR wybranych próbek z wzorcami odpowiednich konserwantów, obecnymi według spisu w produkcie.

Rysunek 8 przedstawia widmo  $^1\text{H}$  NMR dwóch kosmetyków (1 i 2). Według opisu na opakowaniu, w preparatach powinny występować dwa konserwanty: metyloparaben ( $W_1$ ) i alkohol benzylový ( $W_2$ ). Analizując widma  $^1\text{H}$  NMR, w przypadku obu tych próbek i porównując je z widmami  $^1\text{H}$  NMR wzorców  $W_1$  i  $W_2$ , można stwierdzić, iż metyloparaben jest obecny w obydwu tych kosmetykach, o czym świadczą charakterystyczne dublety o wartościach przesunięcia chemicznego  $\delta$  7,96 ppm i  $\delta$  6,92 ppm. Natomiast nie można w sposób jednoznaczny wyeliminować ani potwierdzić obecności alkoholu benzylového. W tym przypadku sygnał pochodzący od resztkowych ilości  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta = 7,26$  ppm) pokrywa się z sygnałem od aromatycznych protonów alkoholu. W widmie dla próbki nr 2 sygnał ten ma wyższą intensywność, co może jednak wskazywać na obecność tej substancji, zaś dla próbki nr 1 nie obserwujemy takiej zależności.



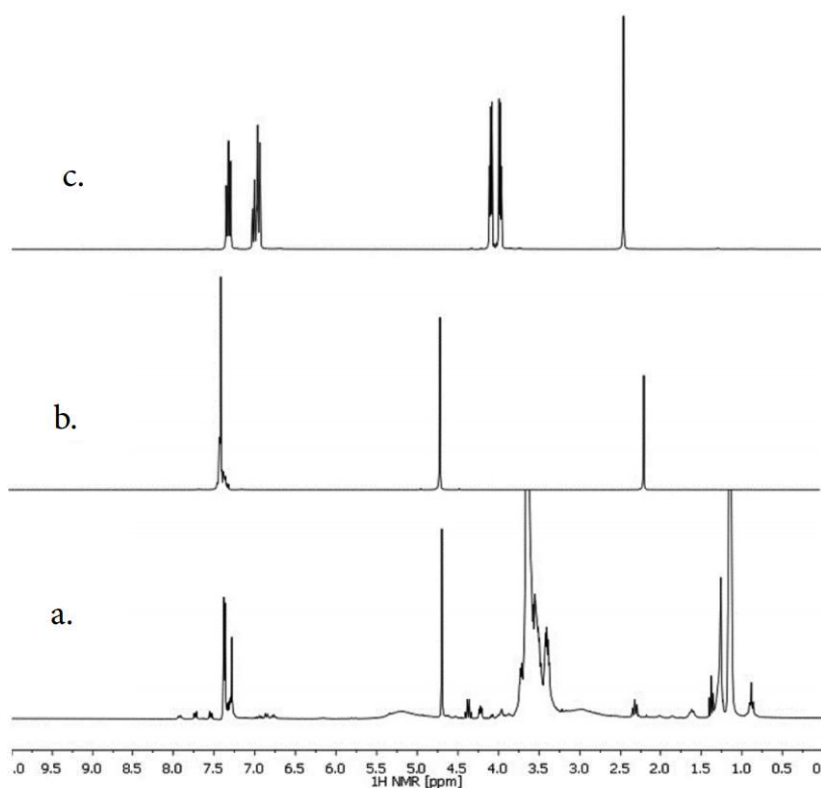
**Rysunek 8.** Widma  $^1\text{H}$  NMR: a. próbka nr 1, b. próbka nr 2, c. metyloparaben ( $W_1$ ), d. alkohol benzylový ( $W_2$ ).

**Figure 8.**  $^1\text{H}$  NMR spectra: a. sample No. 1, b. sample No. 2, c. methylparaben ( $W_1$ ), d. benzyl alcohol ( $W_2$ ).



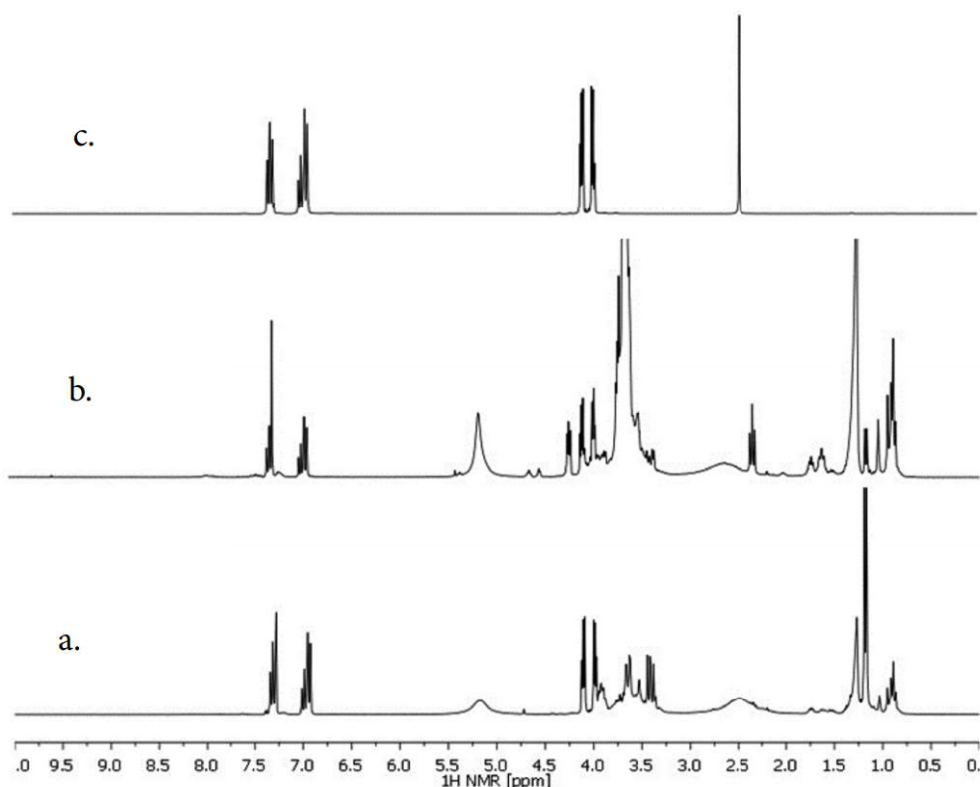
W widmie nie ma również innych sygnałów, np. od protonów z grupy  $-\text{CH}_2-$ , świadczących o obecności alkoholu benzyłowego w znaczącej ilości.

Rysunek 9 prezentuje widmo protonowe próbki nr 4 i wzorców konserwantów wykazanych w jej składzie, czyli alkoholu benzyłowego ( $W_2$ ) i fenoksyetanolu ( $W_3$ ). Wynik analizy potwierdza obecność alkoholu, gdyż obserwujemy charakterystyczne dla niego sygnały, np. przy 7,4 ppm od protonów aromatycznych czy 4,7 ppm od protonów alifatycznych z grupy  $-\text{CH}_2-$ . W widmie  $^1\text{H}$  NMR próbki nr 4 widoczne są sygnały charakterystyczne dla 2-fenoksyetanolu. Sygnały te odznaczają się niską intensywnością, co może wskazywać na mniejszą ilość 2-fenoksyetanolu w stosunku do alkoholu benzyłowego.



**Rysunek 9.** Widma  $^1\text{H}$  NMR: a. próbka nr 4, b. alkohol benzyłowy ( $W_2$ ), c. fenoksyetanol ( $W_3$ ).  
**Figure 9.**  $^1\text{H}$  NMR spectra: a. sample No. 4, b. benzyl alcohol ( $W_2$ ), c. 2-phenoxyethanol ( $W_3$ ).

W próbkach kosmetyków nr 5 i nr 9 jedynym konserwantem wyszczególnionym w składzie jest 2-fenoksyetanol ( $W_3$ ). Na Rysunku 10 przedstawiono widma tych próbek oraz odpowiedniego wzorca ( $W_3$ ). W przypadku obydwu próbek możemy zaobserwować sygnały pochodzące od protonów aromatycznych w zakresie 7–7,3 ppm. Ponadto, przy 4 ppm widoczne są w tych widmach charakterystyczne triplety odpowiadające protonom alifatycznym ( $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ). W związku z tym, zarówno w kosmetyku nr 5, jak i w kosmetyku nr 9 można potwierdzić obecność 2-fenoksyetanolu ( $W_3$ ).

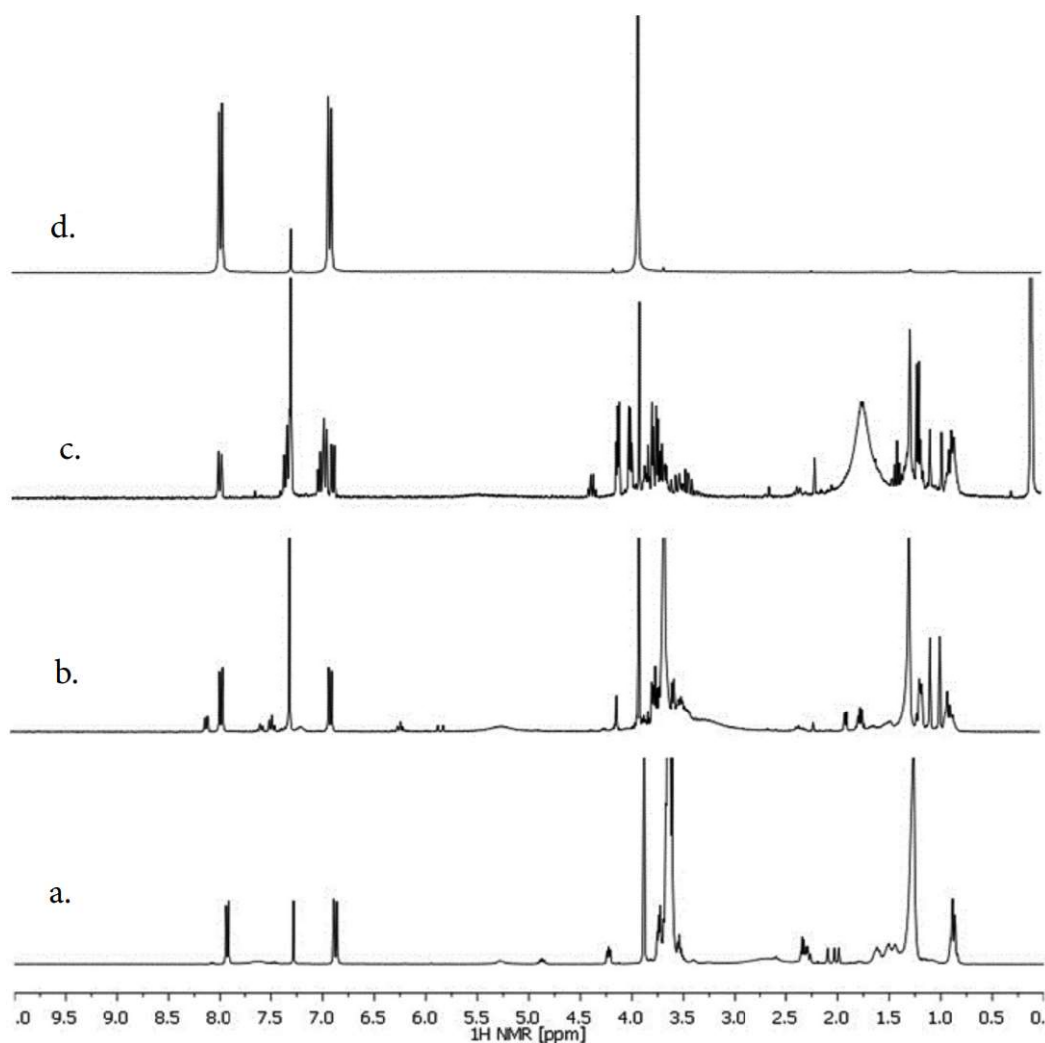


**Rysunek 10.** Widma  $^1\text{H}$  NMR: a. próbka nr 5, b. próbka nr 9, c. fenoksyetanol ( $W_3$ ).

**Figure 10.**  $^1\text{H}$  NMR spectra: a. sample No. 5, b. sample No. 9, c. phenoxyethanol ( $W_3$ ).

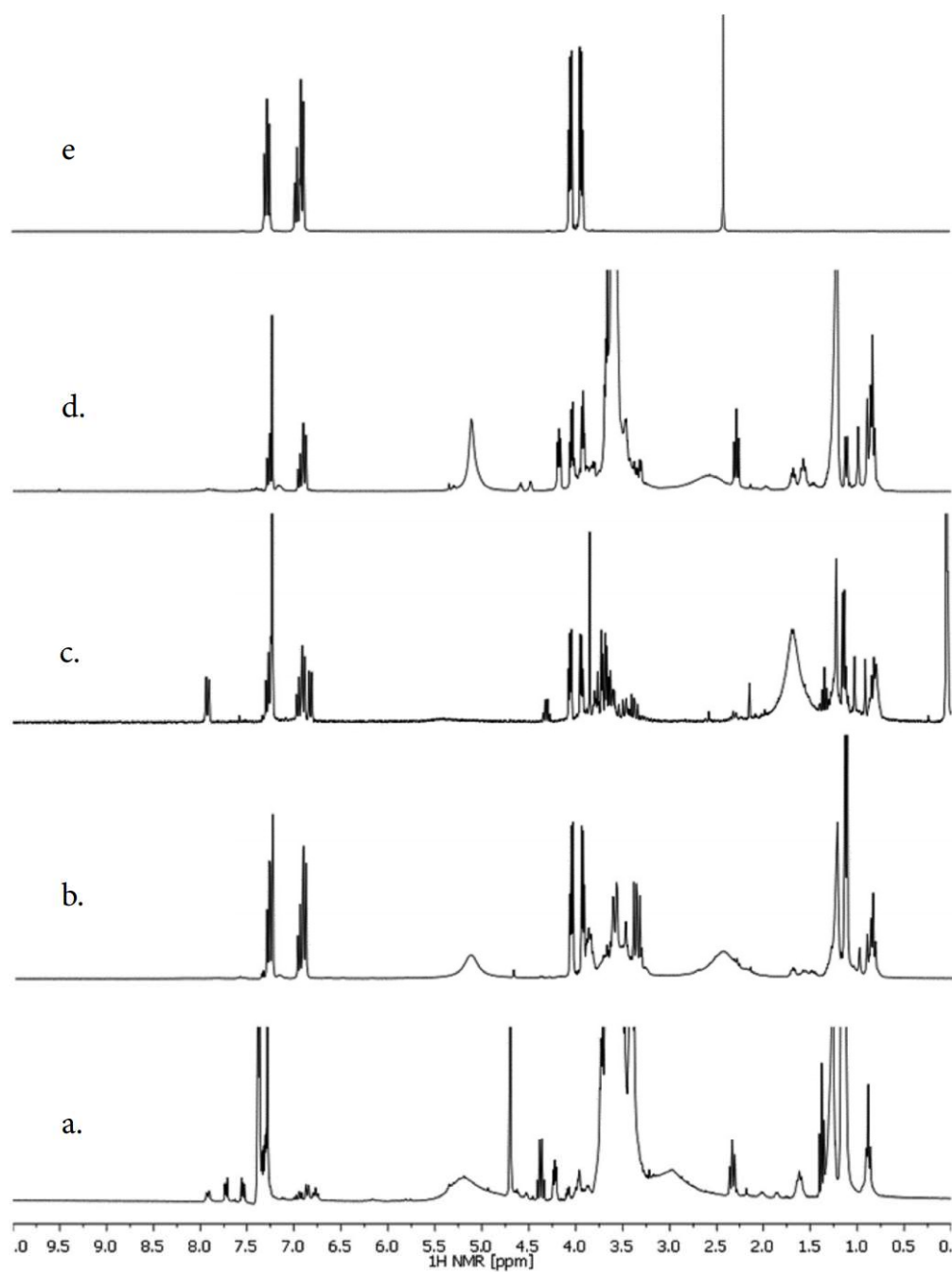
Widma kosmetyków nr 1, 2 i 8, w których składzie deklarowana jest obecność metyloparabenu wraz z porównawczym widmem tego wzorca ( $W_1$ ), zestawione zostały na Rysunku 11. Obserwowane są charakterystyczne dublety o wartości przesunięcia chemicznego 7,96 ppm i 6,92 ppm pochodzące od protonów aromatycznych w metyloparabenie. Dodatkowo, potwierdzeniem obecności tego konserwantu jest sygnał przy 3,90 ppm, który pochodzi od alifatycznych protonów z grupy  $-\text{CH}_3$ . W związku z tym w kosmetykach nr 1, 2 i 8 można potwierdzić obecność pochodnej metylowej parabenów.





**Rysunek 11.** Widma  $^1\text{H}$  NMR: a. próbka nr 1, b. próbka nr 2, c. próbka nr 8, d. metyloparaben ( $\text{W}_1$ ).  
**Figure 11.**  $^1\text{H}$  NMR spectra: a. sample No. 1, b. sample No. 2, c. sample No. 8, d. methylparaben ( $\text{W}_1$ ).

Próbki kosmetyków, które w swoim składzie zawierają 2-fenoksyetanol to próbki nr: 4, 5, 8 i 9. Zostały one przedstawione na Rysunku nr 12 wraz z widmem wzorca, czyli 2-fenoksyetanolu. Obecność tego konserwantu można potwierdzić w trzech kosmetykach z czterech analizowanych, a mianowicie dla próbek nr 5, 8 i 9.



**Rysunek 12.** Widma  $^1\text{H}$  NMR: a. próbka nr 4, b. próbka nr 5, c. próbka nr 8, d. próbka nr 9, e. fenoksyetanol (W3).

**Figure 12.**  $^1\text{H}$  NMR spectra: a. sample No. 4, b. sample No. 5, c. sample No. 8, d. sample No. 9, e. phenoxyethanol (W3).



Ponieważ nie wszystkie z kosmetyków wybranych do badania zawierały konserwanty, a ich ilość różni się pomiędzy poszczególnymi produktami, interesujące było sprawdzenie, czy istnieje prosta zależność pomiędzy datą ważności tych kosmetyków, a ilością konserwantów w składzie (ilość konserwantów vs data przydatności/ważności). Okazuje się, że nie istnieje relacja pomiędzy datą ważności a ilością substancji konserwujących. Nie w każdej analizowanej próbce ilość różnych konserwantów wpływa na termin ważności. Niemniej jednak w próbce nr 6, w której według producenta nie ma konserwantów, termin przydatności produktu był znacznie skrócony. Natomiast w próbce nr 8 (zawierającej fenoksyetanol i aż 4 rodzaje różnych parabenów) termin ważności jest najdłuższy ze wszystkich badanych kosmetyków, mimo że stężenia poszczególnych konserwantów w tej próbce są niewielkie (Rysunek 13).



**Rysunek 13.** Zależność pomiędzy terminem ważności a liczbą konserwantów w próbkach.

**Figure 13.** The relationship between the expiration date and the number of preservatives in the samples.

## Podsumowanie

Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego  $^1\text{H}$  NMR to doskonała metoda do szybkiej identyfikacji substancji konserwujących w płynnych produktach kosmetycznych. Przeprowadzona analiza z wykorzystaniem  $^1\text{H}$  NMR dziewięciu wybranych kosmetyków pozwala zadedykować ten typ widm do szybkiej weryfikacji produktów kosmetycznych pod kątem konserwantów (np. *benchtop*). Zestawienie widm  $^1\text{H}$  NMR analizowanych próbek z widmami wzorców stanowi odpowiednie podłoże do oznaczenia lub wykluczenia obecności danego związku (konserwantu) w próbce. Dodatkowo wskazuje ewentualne zanieczyszczenia i obecność innych substancji niż konserwanty.  $^1\text{H}$  NMR jest też możliwe w zastosowaniu ilościowym.

Oznaczanie składu i weryfikacja składu podanego przez producenta wszelkich produktów w tym też produktów kosmetycznych jest niezwykle istotna i potrzebna. Wskazuje na to fakt, że analiza tylko dziewięciu kosmetyków pozwoliła wyodrębnić te produkty, których skład faktyczny jest różny od deklarowanego przez producenta. Niektóre związki wymienione w składzie nie występują w produkcie lub znajdują się w nieoznaczalnym stężeniu, a inne, mimo, że nie są deklarowane, mogą zostać wykryte.

Wiadomo też, że na datę ważności (przydatności) ma wpływ nie tylko ilość różnych konserwantów w kosmetykach, ale także ich stężenie w próbkach oraz obecność innych składników aktywnych, np. związków polifenolowych czy witamin.

### Literatura

- [1] Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1223/2009 z dnia 30 listopada 2009 r. dotyczące produktów kosmetycznych.
- [2] Malinka W., Zarys Chemii Kosmetycznej, Volumed, Wrocław 1999.
- [3] Lamer-Zarawska E., Chwała C., Gwardys A., Rośliny w kosmetyce i kosmetologii przeciwstarzeniowej, Wydawnictwo Lekarskie PZWL 2015.
- [4] Pawlik A., Niewęgłowska-Wilk M., Kalicińska J., Śpiewak R., Kosmetyki „naturalne”, „biologiczne” i „ekologiczne”. Gwarancja bezpieczeństwa czy marketing? *Kosmetologia Estetyczna*, 2017, 2, s. 125-127.
- [5] *Kosmetologia i farmakologia skóry*, red. Martini M.-C., Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2008.
- [6] Bojarowicz H., Wojciechowska M., Gocki J., Substancje konserwujące stosowane w kosmetykach oraz ich działania niepożądane, *Problemy Higieny i Epidemiologii*, 2008, 89(1), s. 30-33.
- [7] Marwicka J., Niemyska K., Wieczorek M., Parabeny jako substancje konserwujące stosowane w preparatach kosmetycznych oraz ich wpływ na apoptozę fibroblastów skóry człowieka, *Kosmetologia Estetyczna*, 2017, 6, s. 561-568.
- [8] Bojarowicz H., Wnuk M., Buciński A., Efektywność i bezpieczeństwo stosowania parabenów, *Problemy Higieny i Epidemiologii*, 2012, 93(4), s. 647-653.
- [9] Dréno B., Zuberbier T., Gelmetti C., Gontijo G., Marinovich M. Safety review of phenoxyethanol when used as a preservative in cosmetics, *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 2019, 33, s. 15-24.
- [10] Kosmetyki – bioaktywne składniki: praca zbiorowa, red. Schroeder G., *Cursiva*, [Kostrzyn] 2012.
- [11] Dziennik Urzędowy Uni Europejskiej dot. produktów kosmetycznych, 22.12.2009; I 342/59
- [12] Nair B., Final report on the safety assessment of Benzyl Alcohol, Benzoic Acid and Sodium Benzoate, *International Journal of Toxicology*, 2001, 20, s. 23-50.

Do cytowania:

Głazczka I., Paradowska K., Ocena możliwości zastosowania magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) w jakościowej analizie wybranych konserwantów obecnych w kosmetykach, *Herbalism*, 2022 1(8), s. 27-44.



# **Synergistyczne i antagonistyczne działanie przeciwutleniające w dwuskładnikowych mieszaninach wybranych polifenoli i kwasu L-askorbinowego**

## **Synergistic and antagonistic antioxidant effects in two-component mixtures of selected polyphenols and L-ascorbic acid**

Marta Głowacka, Agnieszka Zielińska\*

Zakład Chemii Organicznej i Fizycznej, Wydział Farmaceutyczny, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa, e-mail: agnieszka.zielinska@wum.edu.pl

---

**Słowa kluczowe:** kwas L-askorbinowy, polifenole, synergizm, antagonizm, właściwości antyoksydacyjne

**Key words:** L-ascorbic acid, polyphenols, synergism, antagonism, antioxidant properties

---

### **Streszczenie**

Witaminy, związki fenolowe i karotenoidy są najczęściej występującymi w owocach i warzywach naturalnymi substancjami antyoksydacyjnymi. Przeciwutleniacze chronią komórki przed oksydacyjnym uszkodzeniem przez reaktywne formy tlenu i inne rodniki. Pomiędzy tymi składnikami mogą zachodzić interakcje zarówno wzmacniające efekt antyoksydacyjny, jaki i go osłabiający. Przykładami tych interakcji są: synergizm, charakteryzujący się tym, że efekty wywoływane przez składniki w mieszaninie są wyższe, a antagonizm, gdy efekty są niższe, niż wynikałoby to z sumy działania poszczególnych składników stosowanych oddzielnie. Jeśli pomiędzy poszczególnymi badanymi substancjami interakcje nie zachodzą, a wartość oczekiwana i obserwowana nie różnią się istotnie od siebie, możemy zaobserwować efekt addytywny. Ze względu na zwiększające się zainteresowanie naturalnymi antyoksydantami, są one szeroko stosowane w suplementach diety oraz kosmetykach. Dzięki wiedzy na temat możliwych interakcji można tworzyć produkty handlowe o lepszych właściwościach przeciwutleniających, jednocześnie optymalizując proces ich powstawania. W publikacji przedstawiono wyniki badań interakcji pomiędzy kwasem askorbinowym a wybranymi kwasami fenolowymi, flawonoidami i kumarynami. Właściwości antyoksydacyjne oznaczono metodami FRAP, ABTS, Folina-Ciocalteu'a oraz DPPH. Na podstawie pomiarów określono działania antagonistyczne, synergistyczne lub addytywne mieszanin w porównaniu do czystych związków.