

## Oznaczenie zawartości metali w handlowych preparatach kolagenowych metodą AAS

Determination of metals content in collagen commercial formulations by AAS method

Katarzyna Sieczyńska\*, Magdalena Lason – Rydel, Dorota Gendaszewska

Instytut Przemysłu Skórzanego

### Abstrakt

W pracy przedstawiono wyniki oznaczenia zawartości wybranych metali w kolagenowych preparatach handlowych metodą atomowej spektrometrii absorpcyjnej (AAS). Pierwiastki wykryte w analizowanych preparatach to: Ca, Fe, Mg, Zn. Najwyższe stężenia wapnia odnotowano dla próbki kolagenu odmiany 3W (K3W (1518,71 mg/kg)). Stężenie tego pierwiastka było o połowę niższe w próbce kolagen 3 (K3-717,95 mg/kg) i kolagen odmiany 2 (K2-677,13 mg/kg). Próbkę kolagenu odmiany 3 (K3-194,98 mg/kg) oraz kolagenu odmiany 5 (K5-178,57 mg/kg) odznaczały się najwyższym stężeniem magnezu. Największą zawartość żelaza oznaczono w próbce kolagenu odmiany 5 (K5-187,35 mg/kg), a najwyższą zawartość cynku oznaczono w kolagenu odmiany 3W (K3W-59,50 mg/kg). Metale określane jako składniki bioaktywne: Ca, Mg, Zn mają duży wpływ na zdrowie i piękno skóry. W przebadanych próbkach preparatów kolagenowych nie wykryto natomiast następujących metali: Ag, Al, Ba, Cd, Cr, Cu, Li, Mn, Ni, Pb.

### Abstract

The paper presents the results of the determination of the content of selected metals in collagen commercial preparations by atomic absorption spectrometry (AAS). The elements detected in the analyzed preparations are: Ca, Fe, Mg, Zn. The highest calcium concentrations were recorded for the 3W collagen sample (K3W (1518.71 mg/kg)), the concentration of the element was half as high in the collagen 3 sample (K3-777.95 mg/kg) and collagen 2 (K2-677.13 mg/kg). Samples of collagen variety 3 (K3-194.98 mg/kg) and collagen strain 5 (K5-178.57 mg/kg) were characterized by the highest concentration of magnesium, the highest content of iron was determined in the sample of collagen 5 (K5 -187.35 mg/kg), and the highest zinc content was determined in collagen of the 3W variant (K3W-59.50 mg/kg). Metals referred to as bioactive components: Ca, Mg, Zn have a big impact on the health and beauty of the skin. The following metals were not detected in the tested collagen preparations: Ag, Al, Ba, Cd, Cr, Cu, Li, Mn, Ni, Pb.

*Słowa kluczowe:* kolagen, metale, atomowa spektrometria absorpcyjna, techniki analityczne;

*Keywords:* collagen, metals, atomic absorption spectroscopy, analytical techniques;

## 1. Wstęp

Handlowe preparaty kolagenowe są szeroko stosowane w przemyśle kosmetycznym i chemii gospodarczej. Na tym jednak nie koniec. Nowoczesne metody prowadzenia produkcji rolno – spożywczej pozwalają również na wykorzystywanie hydrolizatów kolagenowych do opracowania nowych produktów i technologii pelletowania nasion roślin uprawnych min. rzepaku. Opracowane w ten sposób otoczki nasion mają na celu zwiększenie odporności na

\* autor korespondencyjny: Katarzyna Sieczyńska: k.sieczynska@ips.lodz.pl

suszę i szkodniki podczas kiełkowania nasion i pojawiania się sadzonek [1]. Istotne jest, aby preparaty, które są wprowadzane do obrotu nie zawierały metali ciężkich, które mogą wnikać w skórę wywołując choroby oraz penetrować ją w warstwie rogowej naskórka i wywoływać alergię [2]. Niestety nie istnieją wytyczne, które nakazywałyby określenie składu kolagenu z wyszczególnionym składem zawartości metali. Ponadto, kolagen jest materiałem biologicznym, który nie podlega ustawodawstwu polskiemu, czy europejskiemu. Na rynku niewielu jest producentów preparatów kolagenowych, a ich skład nie jest dokładnie określony. W opisie preparatów podaje się jedynie informacje dotyczące zastosowanych dodatków. Przykładowo producent badanych w niniejszej pracy preparatów informuje, że produkt zawiera kwas cytrynowy lub kwas borowy. Dodatek kwasu cytrynowego sprawia, że witaminy oraz przeciwutleniacze są bardziej stabilne i łatwiej przyswajalne. Natomiast dodatek kwasu borowego sprawia, że preparat kolagenowy ma właściwości antyseptyczne i z powodzeniem może być zastosowany w środkach piorąco-myjących. Istnieje potrzeba lepszego poznania składu tego rodzaju preparatów, na który może mieć wpływ m.in. sposób wyodrębniania kolagenu z materiału wyjściowego.

Preparaty kolagenu rozpuszczalnego otrzymuje się poprzez ekstrakcję tkanki łącznej młodych zwierząt, najczęściej cieląt lub embrionów bydłowych. Ekstrakcję przeprowadza się najczęściej roztworami wodnymi kwasów organicznych. Proces prowadzi się w niskich temperaturach [3]. Istotny jest proces wstępnej obróbki chemicznej, który ma miejsce już w momencie rozpuszczania kolagenu. Do tego procesu stosuje się różne środki m.in. hydroksyloaminę w obecności związków liotropowych oraz sole metali alkalicznych, jak np.  $\text{CaCl}_2$ . W technologii garbowania chromowego stosuje się sole obojętne, wykazujące niewielkie powinowactwo do kolagenu. Jednakże działanie poszczególnych soli na kolagen jest znacząco różne. Niektóre sole mają zdolność odwodnienia i pęcznienia kolagenu, inne działają w kierunku spęcznienia, peptyzowania, a w konsekwencji do rozpuszczania kolagenu [4]. Wszystkie te procesy, z uwagi na ilość i różnorodność stosowanych związków chemicznych, mogą mieć wpływ na skład chemiczny kolagenu. Dlatego istnieje potrzeba zbadania końcowego produktu pod kątem m.in. zawartości metali ciężkich.

Celem niniejszej pracy było oznaczenie w handlowych preparatach kolagenowych stężeń wybranych metali, w tym metali ciężkich. Do tego celu wykorzystano metodę atomowej spektrometrii absorpcyjnej (AAS).

## 2. Materiały i metody

### 2.1. Preparaty kolagenowe

Analizie poddano 5 preparatów kolagenowych, które wykorzystywane są w preparatach kosmetycznych i środkach czystości. Pozyskane preparaty do badań to wodne dyspersje białka skóry cielęcej, które zawierają czysty i niezhydrolizowany kolagen natywny o masie cząsteczkowej około 340000 Da i o konformacji potrójnej helisy. Przebadane preparaty w niniejszej pracy występują na rynku handlowym. Producent nie wymienia składu kolagenu. W Tabeli 1 przedstawiono charakterystykę preparatów kolagenowych z uwzględnieniem odmian kolagenu.

**Tabela 1.** Charakterystyka preparatów kolagenowych [5, 6]

Numer próbki	Odmiana kolagenu	Występowanie kolagenu	Zastosowanie kolagenu	Działanie kolagenu
K2	2	Chrząstki stawowe, ciało szkliste	Przeznaczone są do pielęgnacji skóry wieku dojrzałego, skóry zmęczonej lub przesuszonej nadmiernym działaniem czynników atmosferycznych i wody.	Preparaty kolagenowe działają regenerująco i wygładzająco, przywracając skórze świeżość i właściwe nawilżenie.
K4	4	Błona podstawna (mikrowłókna międzykankowe), skóra, naczynia, jelito, macica		Odmiana 4 z dodatkiem elastyny dodatkowo przywraca skórze sprężystość i miękkość.
K3, K3W	3	Tkanka tworząca się z fibroblastów; zanim zostanie wytworzony kolagen typu I, w trakcie zabliźniania ran, tworzy włókna tkanki łącznej właściwej siateczkowej, błony podstawowe, naczynia włosowate	Znajdują zastosowanie w preparatach kosmetycznych i środkach myjąco – piorących.	Działają, antyseptycznie, regenerująco i wygładzająco, przywracając skórze sprężystość i miękkość oraz właściwe nawilżenie, a dzięki silnym własnościom błonotwórczym tworzą na powierzchni skóry rodzaj warstwy ochronnej, zabezpieczając skórę rąk przed wnikaniem szkodliwych substancji chemicznych zawartych w środkach myjąco – piorących i jednocześnie chroniąc ją przed utratą wody transepidermalnej.
K5	5	Sródmiaższowa – występuje na granicy tkanki tworzącej blizny i tkanek na krawędzi blizn – występuje zawsze, jako dopełnienie kolagenu typu I, kości, skóra, rogówka, łożysko, komórki Schwanna		

Przyjęto następujące oznaczenia próbek:

- K2 (odmiana 2 kolagenu, zawierająca w swym składzie śladowe ilości kwasu cytrynowego),

- K3W (odmiana 3 kolagenu - surowiec z tkanki wieprzowej),
- K3 (odmiana 3 kolagenu, zawierająca w swym składzie śladowe ilości kwasu borowego),
- K4 (odmiana 4 kolagenu, zawierająca elastynę),
- K5 (odmiana 5 kolagenu, zawierająca w swym składzie śladowe ilości kwasu borowego oraz elastynę).

W zależności od właściwości strukturalnych i funkcji, jakie pełni kolagen wyróżnia się:

- kolagen fibrylarny, do którego zaliczamy odmianę 2, 3, 5;
- kolagen błony podstawnej, do którego zaliczamy odmianę 4. Przygotowane preparaty charakteryzowały się kwaśnym pH - od 3,7 do 3,8.

## **2.2. Przygotowanie próbek do badań**

Do czasu analizy pobrany materiał do badań przechowywano w warunkach monitorowanych. Próbki preparatów kolagenowych wylano na szalki Petriego i suszono przez kilka dni w temperaturze pokojowej do uzyskania suchej masy, z której pobrano próbki o wadze ok. 0,1 g i umieszczono w naczyniu teflonowym. Następnie dodano 6 cm<sup>3</sup> HNO<sub>3</sub> (65%) i dokonano ich mineralizacji przy użyciu mineralizatora mikrofalowego Magnum II (Ertec). Proces mineralizacji wykonano w trzech cyklach, trwających łącznie 20 minut w temperaturze do 300°C i pod ciśnieniem maksymalnym dochodzącym do 45 barów, przy maksymalnej mocy mikrofal (100%). Próbkę zmineralizowano do klarownego roztworu, co świadczy o pełnej mineralizacji. W kolejnym etapie przemyto ścianki naczynia wodą demineralizowaną i ilościowo przeniesiono roztwór do kolby miarowej o objętości 25 ml. Na koniec wszystkie próby przesączono przez filtr typu 388 (miękki).

## **2.3. Odczynniki chemiczne**

W badaniach użyto wzorców analizowanych pierwiastków o początkowym stężeniu 1000 mg/l. Krzywe wzorcowe sporządzono poprzez rozcieńczenia roztworu podstawowego. W czasie badań możliwe jest wystąpienie zakłóceń podczas pomiarów analizowanych roztworów poprzez obecność substancji chemicznych towarzyszących. Zakłócenia dzielą się na grupy:

- zakłócenia wynikające z nakładania się linii emisyjnych i absorpcyjnych analizowanych pierwiastków;
- zakłócenia wynikające z fizycznych właściwości roztworów i mające wpływ na wydajność nebulizacji;
- zakłócenia chemiczne zachodzące w atomizerze.

W celu eliminacji matrycowych efektów interferencyjnych wykorzystano następujące bufory spektralne:

- 10% azotan (V) lantanu (III) przy analizie Pb, Cd;
- 0,4% chlorek lantanu przy analizie Cr;
- 0,1% chlorek potasu przy analizie Al, Ba, Ca.

## 2.4. Metody badawcze

Oznaczenia metali przeprowadzono przy użyciu techniki płomieniowej atomowej spektrometrii absorpcyjnej (AAS) na aparacie jednowiązkowym Unicam 939.

**Tabela 2.** Charakterystyka parametrów zastosowanych w technice AAS

<b>Metal</b>	<b>Długość fali [nm]</b>	<b>Rodzaj płomienia</b>
Ag	328,1	acetylen-powietrze-utleniający
Al	309,3	acetylen-podtlenek azotu-redukujący
Ba	553,6	acetylen-podtlenek azotu-redukujący
Ca	422,7	acetylen-podtlenek azotu-redukujący
Cd	228,8	acetylen-powietrze-utleniający
Cr	357,9	acetylen-podtlenek azotu-redukujący
Cu	324,8	acetylen-powietrze-utleniający
Fe	248,3	acetylen-powietrze-utleniający
Li	670,8	acetylen-powietrze-utleniający
Mg	285,2	acetylen-powietrze-utleniający
Mn	279,5	acetylen-powietrze-utleniający
Ni	232,0	acetylen-powietrze-utleniający
Pb	217,0	acetylen-powietrze-utleniający
Zn	213,9	acetylen-powietrze-utleniający

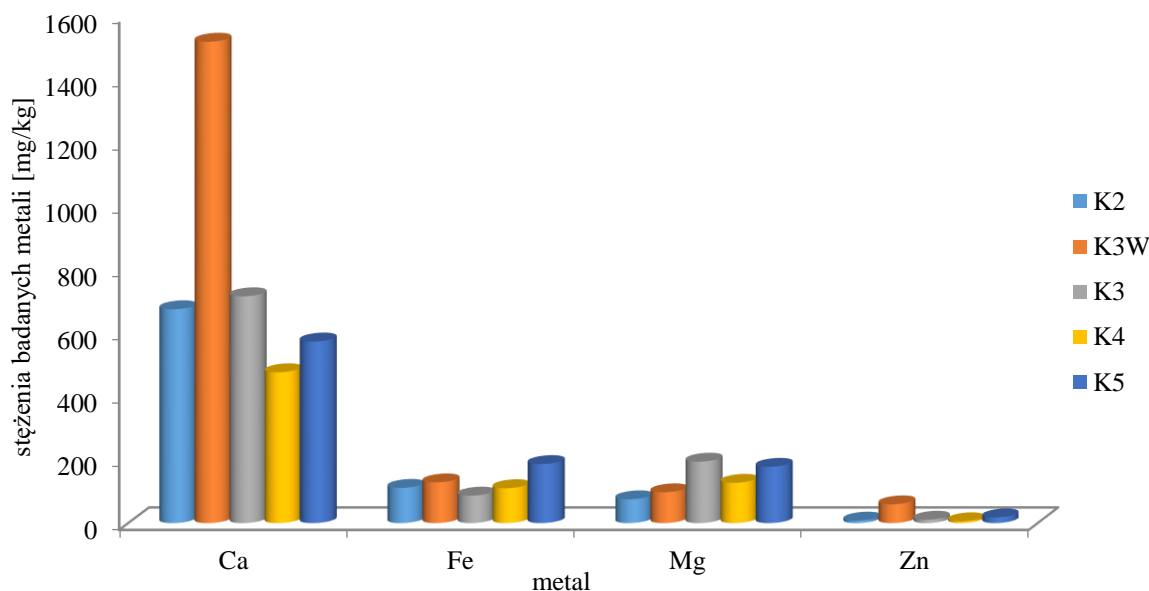
Zastosowano atomizację płomieniową, stosując korekcję tła (lampa deuterowa) tylko dla wybranych metali (dla wszystkich oprócz Ba, Ca, Li). Pomiary wykonano z użyciem lamp z katodą wnątkową (Hallow Cathode Lamp-HCL). Rodzaj płomienia, skład mieszaniny gazów i długość fali ulegały zmianie w zależności od oznaczanego pierwiastka (Tabela 2). Do pomiarów wykorzystano spektrometr absorpcji atomowej z palnikiem o długości 50 mm (Rys. 1). Przed przystąpieniem do prac metoda badawcza została zoptymalizowana przez Autora pod względem planowanych oznaczeń. Wyznaczono granice oznaczalności metody (Tabela 3).



Rys. 1. Spektrometr absorpcji atomowej Unicam 939.

### 3. Omówienie i dyskusja wyników

Głównym celem pracy było oznaczenie stężenia wybranych metali w kolagenowych preparatach handlowych w przeliczeniu na suchą masę badanych preparatów. Metale ciężkie w śladowych ilościach znajdują zastosowanie w przemyśle kosmetycznym i farmaceutycznym. Mogą być np. składnikami barwników. Dla organizmu ludzkiego największe zagrożenie stwarzają przede wszystkim: rtęć, ołów, kadm, arsen. Do wyznaczenia stężeń pierwiastków wykorzystano sporządzone krzywe wzorcowe i na ich podstawie odczytano wartości stężeń metali w analizowanych preparatach (Rys. 2, Tabela 3).



Rys. 2. Porównanie stężeń wykrytych metali w badanych kolagenowych preparatach handlowych.

**Tabela 3.** Wyniki pomiaru stężeń metali w analizowanych preparatach kolagenowych (na zielono zaznaczono stężenia wykrytych metali)

<b>Metal [mg/kg]</b>	<b>Granica oznaczalności badanych metali [mg/kg]</b>	<b>K2</b>	<b>K3W</b>	<b>K3</b>	<b>K4</b>	<b>K5</b>
Ag	0,34	<0,34	<0,34	<0,34	<0,34	<0,34
Al	3,40	<3,40	<3,40	<3,40	<3,40	<3,40
Ba	0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10
Ca	1,50	677,13	1518,71	717,95	478,62	575,67
Cd	0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10
Cr	0,50	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50
Cu	0,41	<0,41	<0,41	<0,41	<0,41	<0,41
Fe	0,60	111,75	129,15	87,23	110,80	187,35
Li	0,21	<0,21	<0,21	<0,21	<0,21	<0,21
Mg	0,03	75,50	97,71	194,98	127,79	178,57
Mn	0,29	<0,29	<0,29	<0,29	<0,29	<0,29
Ni	0,63	<0,63	<0,63	<0,63	<0,63	<0,63
Pb	0,20	<0,20	<0,20	<0,20	<0,20	<0,20
Zn	0,05	7,87	59,50	10,75	5,74	17,90

Pierwiastki wykryte w preparatach to: Ca, Fe, Mg, Zn (Rys. 2). Są to tak zwane składniki bioaktywne, które mają duży wpływ na zdrowie i piękno skóry [7, 8].

Najwyższe stężenia wapnia odnotowano dla próbki K3W (1518,71 mg/kg), o połowę niższe dla K3 (717,95 mg/kg) i K2 (677,13 mg/kg). Jego pojawienie się spowodowane jest wykorzystaniem CaCl<sub>2</sub> w procesach garbowania skóry [4].

Kolejnym pierwiastkiem występującym w wykrywalnym stężeniu w preparatach jest magnez. Próbkę K3 (194,98 mg/kg) oraz w K5 (178,57 mg/kg) posiadają najwyższe poziomy stężeń magnezu spośród badanych próbek. Preparaty o dużej zawartości magnezu i wapnia mają istotne znaczenie dla osób uprawiających sport oraz aktywnie żyjących. W przypadku niektórych kolagenowych preparatów przeznaczonych do spożycia pierwiastki te są dodatkowo wprowadzane w odpowiednich ilościach i proporcjach. Kolagen zawierający w swoim składzie magnez i wapń wpływa na układ lokomotoryczny. Jest stosowany w leczeniu i łagodzeniu chorób kości i stawów [9]. Literatura dotycząca omawianych pierwiastków skupia się jedynie na dziennych ilościach potrzebnych organizmowi do prawidłowego funkcjonowania. Nie znajduje się wytycznych dotyczących zalecanych ilości makroelementów stosowanych w kosmetyce, czy środkach czystości. Według danych literaturowych dobowe spożycie wapnia w grupie wiekowej 19 – 50 nie powinno być mniejsze niż 1000 mg. W przypadku magnezu

dzienne zapotrzebowanie kształtuje się między 400 – 420 mg dla mężczyzn oraz 310 – 320 mg dla kobiet.

Niekorzystnie na przyswajalność wapnia może wpływać inny pierwiastek – magnez. Powinno zwrócić się uwagę na to, aby oba te pierwiastki dostarczać w odpowiedniej proporcji - stosunek wapnia do magnezu powinien wynosić 2:1 [10].

Największą zawartość żelaza odnotowano dla próbki K5 (187,35 mg/kg), a największą zawartość cynku odnotowano dla próbki K3W (59,50 mg/kg). Oba te składniki działają korzystnie na stan włosów, przeciwdziałają ich wypadaniu oraz wzmacniają paznokcie. Co ważne, po przeprowadzonych badaniach stwierdzono, że przebadane próbki handlowych preparatów kolagenowych pozbawione są metali takich jak: Ag, Al, Ba, Cd, Cr, Cu, Li, Mn, Ni, Pb. Niektóre z tych metali oraz ich związków znajduje się w wykazie substancji zakazanych w produktach kosmetycznych [11]. Stwierdza się, że w analizowanych próbkach nie występują zanieczyszczenia w postaci metali ciężkich, których wpływ na organizm jest toksyczny.

#### **4. Podsumowanie**

Podsumowując, odmiany 3 i 5 zawierają najwyższe stężenie składników bioaktywnych (Ca, Fe, Mg, Zn) w porównaniu z odmianą 2, a zwłaszcza 4. Nie bez powodu producenci naturalnych białek polecają szczególnie odmiany kolagenu 3 i 5 jako substancje biologicznie czynne do produkcji środków myjąco - piorących zawierających w swoim składzie detergentowe substancje powierzchniowo - czynne niszczące naturalną warstwę ochronną skóry i powodujące jej wysuszenie i pękanie. Na podstawie przeprowadzonej analizy można również jednoznacznie stwierdzić, że próbki badanych preparatów kolagenowych wykorzystywanych w preparatach kosmetycznych i środkach czystości są wolne od niebezpiecznych pierwiastków chemicznych. Badane preparaty mają bezpośredni kontakt ze skórą ludzką, stąd istotne jest, aby nie zawierały substancji niebezpiecznych, w tym metali, zakazanych w produktach kosmetykach. Niektóre metale ciężkie mogą powodować alergię, uczulenia i szereg chorób m. in. nowotworów. Zasadnym jest zatem określenie zawartości wybranych metali w preparatach kolagenowych i kontynuowanie badań różnych rodzajów preparatów kolagenowych, w szczególności preparatów przeznaczonych do spożycia. Ma to szczególne znaczenie biorąc pod uwagę fakt, iż wszystkie rodzaje przebadanych preparatów kolagenu stanowią doskonały surowiec do wykorzystania w produkcji nowoczesnych kapsułek do otoczkowania nasion rzepaku.



## Źródło finansowania

Artykuł finansowany z projektu „Wykorzystanie hydrolizatów kolagenowych do przygotowania otoczek nasion rzepaku zwiększających odporność na suszę” – COLL-RAPE.

## Literatura

- [1] Grzesiak E., Ławińska K., Gendaszewska D., Lason – Rydel M.: *Nowy sposób wykorzystania hydrolizatów kolagenu*, Cz. I , Przegląd Włókienniczy - Włókno, Odzież, Skóra, **8**, 2018, str. 28 – 31.
- [2] Jabłońska-Trypuć A., Klewszczewska E.: *Pozytywne i negatywne efekty działania metali w wybranych formach kosmetycznych*, Farmaceutyczny Przegląd Naukowy, **5**, 2008, str. 43 – 45.
- [3] Łączkowska M., Gendaszewska D., Grzesiak E., Lason-Rydel M.: *Przegląd metod ekstrakcji kolagenu z odpadów skórzanych*, Technologia i Jakość Wyrobów, **61**, 2016, str. 74 – 79.
- [4] Lasek W.: *Kolagen-chemia i wykorzystanie*, WNT, Warszawa 1978.
- [5] Czubak K.A., Żbikowska H.M.: *Struktura, funkcja i znaczenie biomedyczne kolagenów*, Annales Academiae Medicae Silesiensis, **68 (4)**, 2014, str. 245–254.
- [6] Banaś M., Piechura K.: *Typy i struktura białka kolagenowego*, Zeszyty Naukowe Politechniki Łódzkiej, Chemia Spożywcza i Biotechnologia, **73**, 1058, 2009, str.93–103.
- [7] Puzanowska-Tarasiewicz H., Kuźnicka L., Tarasiewicz M.: *Funkcje biologiczne wybranych pierwiastków. III. Cynk – składnik i aktywator enzymów*, Polski Merkuriusz Lekarski, **27 (161)**, 2009, str. 419–422.
- [8] Klimowicz A., Zielonka J., Turek M., Nowak A.: *Substancje pochodzenia naturalnego stosowane w terapii cellulitu*, Postępy Fitoterapii, **2 (16)**, 2015, str. 96–101.
- [9] Świdorski F., Czerwonka M., Waszkiewicz-Robak B.: *Hydrolizat kolagenu-nowoczesne suplementy diety*, Przemysł Spożywczy, **64 (4)**, 2009, str. 42–44.
- [10] Miernik M.: *Magnez, wapń, żelazo – jak mądrze je suplementować?*, Świat Przemysłu Farmaceutycznego, **2**, 2016, str. 94–98.
- [11] Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady WE nr 1223/2009 z dnia 30. XI. 2009 r. dotyczące produktów kosmetycznych, załącznik II, Dz.U. L342/59.