ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΛΛΥΝΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΜΕ ΕΝΣΩΜΑΤΩΜΕΝΑ ΠΕΠΤΙΔΙΑ ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ HILIC

Μαρία Γιαννάκου[1], Βαρβαρέσου Αθανασία[2], Σπύρος Παπαγεωργίου[2], Ειρήνη Παντερή[1]
[1] Εργαστήριο Φαρμακευτικής Ανάλυσης, Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιούπολη, Ζωγράφου, Αθήνα, email: irenepanderi@gmail.com
[2] Τμήμα Αισθητικής & Κοσμητολογίας, ΤΕΙ Αθήνας, Αιγάλεω

Περίληψη

Η ενσωμάτωση δραστικών ουσιών σε καλλυντικά προϊόντα παρουσιάζει αυξανόμενο ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια και έχει οδηγήσει στη δημιουργία μιας νέας γενιάς καλλυντικών προϊόντων που χαρακτηρίζονται με τον όρο φαρμακοκαλλυντικά (cosmeceuticals). Η αυξανόμενη τάση της χρήση των πεπτιδίων σε καλλυντικά προϊόντα καθιστά αναγκαία την ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδων ποσοτικού προσδιορισμού τους καθώς και μεθόδων για τον έλεγχο της σταθερότητάς τους. Για τη χρωματογραφία των πεπτιδίων χρησιμοποιείται συνήθως χρωματογραφία αντίστροφης φάσης βαθμιδωτής έκλουσης. Σε αρκετές μελέτες χρωματογραφίας πεπτιδίων έχει παρατηρηθεί ότι η κατακράτηση των πεπτιδίων ελαττώνεται με αύξηση του ποσοστού του οργανικού τροποποιητή στην κινητή φάση μέχρι ένα ελάχιστο πέρα από το οποίο η κατακράτηση αυξάνεται με αύξηση του ποσοστού του οργανικού τροποποιητή στην κινητή φάση. Στην εργασία αναπτύσσεται και επικυρώνεται μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού ολιγοπεπτιδίων σε καλλυντικά προϊόντα με την τεχνική της υγροχρωματογραφίας υδρόφιλης αλληλεπίδρασης (HILIC). Η χρωματογραφία HILIC αποτελεί μία σχετικά νέα τεχνική ανάλυσης και διαχωρισμού πολικών ουσιών οι οποίες εμφανίζουν μικρή ή και ελάχιστη κατακράτηση στις ευρύτερα διαδεδομένες στήλες αντιστρόφου φάσεως.

Λέξεις-Κλειδιά: *Ολιγοπεπτίδια; Φαρμακοκαλλυντικά; HILIC; Έλεγχος ποιότητας; Επικύρωση*

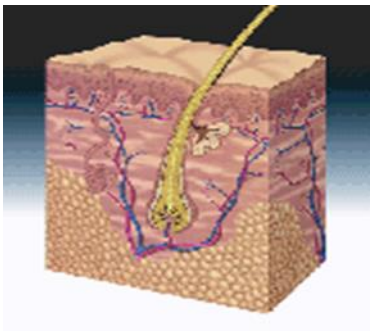
Abstract

Nowadays there is increasing interest in the use of bioactive ingredients in cosmetics. The term “cosmeceuticals” refers to the combination of cosmetics and pharmaceuticals. Peptides hold future promise for a wide range of therapeutic and cosmeceutical applications, as the majority of all natural processes within the body are signaled by the interaction of specific amino acid sequences, either as peptides or as fragments of proteins. Among the issues that apply to any cosmeceutical ingredient is the quality control of these products and has to be addressed under a more systematic investigation. There is a real need to set up analytical methods in order to quantitate these active compounds in cosmetics. Reversed phase chromatography combined with gradient elution, is normally used for peptide analysis. HILIC chromatography is a relatively new and promising technique for analysis and separation of polar substances which show little or minimal retention in the widely used reverse phase columns. In this work we developed and validated a hydrophilic interaction liquid chromatographic assay for the quantification of peptides in a cosmetic product.

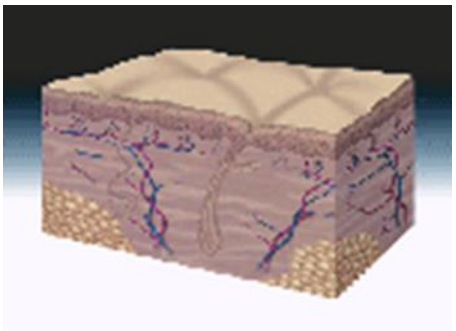
Keywords: *Peptides, Cosmeceuticals, HILIC, Quality Control, Validation*

1. Εισαγωγή

Η αύξηση του μέσου όρου ηλικίας των ανθρώπων, το αυξανόμενο ενδιαφέρον όσον αφορά την εξωτερική εμφάνιση και τη διεύρυνση των γνώσεων σχετικά με τους κινδύνους που απορρέουν από την έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία οδηγούν όλο και περισσότερους ανθρώπους στην αναζήτηση θεραπειών για την πρόληψη και την αντιστροφή αυτών των διαταραχών (σχήμα 1). Με σκοπό τον περιορισμό των αλλοιώσεων που συνοδεύουν τη γήρανση του δέρματος έχουν αναπτυχθεί διάφορα κοσμητολογικά προϊόντα, εξωτερικής χρήσης.



Κανονικό δέρμα



Γηρασμένο δέρμα

Σχήμα 1: Ανατομία κανονικού και γηρασμένου δέρματος

Τα φαρμακοκαλλυντικά, είναι καλλυντικά προϊόντα που παρουσιάζουν βιολογική δράση, πέρα από την ευεργετική δράση τοπικής εμβέλειας που εξυπηρετούν τα αμιγώς καλλυντικά προϊόντα, λόγω της προσθήκης βιοενεργών συστατικών. Για να υπάρχει κλινικό όφελος, πρέπει το δραστικό συστατικό ενός καλλυντικού προϊόντος να έχει στοχευμένη δράση. Η χρήση των φαρμακοκαλλυντικών επεκτείνεται με γρήγορο ρυθμό λόγω της μεγάλης ανταπόκρισης από τους καταναλωτές. Τα πιο πρόσφατα επιτεύγματα στο χώρο της κοσμητολογίας αφορούν φαρμακοκαλλυντικά προϊόντα που φέρουν ως δραστικά συστατικά πεπτίδια. Μέχρι το 2009, πάνω από 25 διαφορετικά πεπτίδια εντοπίζονταν σε ένα ευρύ φάσμα προϊόντων που κυκλοφορούσαν στην Αμερική για τη φροντίδα του δέρματος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να αυξάνεται η χρήση βιοενεργών πεπτιδίων που εξυπηρετούν αυτό το σκοπό αυτό. Ο ρόλος των πεπτιδίων ποικίλει και εμπλέκονται σε πολλές φυσιολογικές διαδικασίες όπως στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, στη μετανάστευση κυττάρων, στη σύνθεση πρωτεϊνών και εξωκυτταρικών ουσιών, στη διαδικασία της φλεγμονής και της αγγειογένεσης. Η αυξημένη ποικιλία στη δράση τους εντείνεται με τη σύνθεση διαρκώς νέων μορίων. Τα πεπτίδια που χρησιμοποιούνται κυρίως στα καλλυντικά προϊόντα αποτελούνται από φυσικά L-αμινοξέα, τα οποία μπορούν εύκολα να διασπαστούν και να αποδώσουν τα μεμονωμένα φυσικά αμινοξέα από τα οποία αποτελούνται. Αν και η σύνθεση των πεπτιδίων είναι γενικά απλή και όλο και επεκτείνεται, τιμή τους εξαρτάται από τον αριθμό και τον τύπο των αμινοξέων που απαιτούνται.

Στην παρούσα εργασία παρασκευάστηκε κρέμα η οποία εμπλουτίστηκε με μείγμα πεπτιδίων τα οποία μιμούνται τη δράση των αυξητικών παραγόντων. Οι αυξητικοί παράγοντες αποτελούν μια σύνθετη οικογένεια πολυπεπτιδικών και πρωτεϊνικών σηματοδοτικών παραγόντων που παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση διαφόρων φυσιολογικών λειτουργιών. Αποτελούν ρυθμιστές της κυτταρικής διαίρεσης και διαφοροποίησης, της χημειόταξης, της προσκόλλησης, της ενεργοποίησης και της επιβίωσης των κυττάρων. Ασκούν τη δράση τους μέσω της πρόσδεσής τους σε

κατάλληλους υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων. Η χρήση των αυξητικών παραγόντων σε κοσμητολογικά προϊόντα κατά της γήρανσης στηρίζεται στην ιδιότητά τους να προάγουν τον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων και των ινοβλαστών του δέρματος και να διεγείρουν την παραγωγή εξωκυτταρικών συστατικών της θεμέλιας ουσίας, όπως το κολλαγόνο και το υαλουρονικό οξύ. Το ολιγοπεπτίδια που μελετήθηκαν περιλαμβάνονται σε κοσμητολογικά προϊόντα αντιγήρανσης και σε προϊόντα για την επούλωση πληγών και τη βελτίωση ουλών.
Η μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού των ολιγοπεπτιδίων σε καλλυντικά προϊόντα που αναπτύχθηκε στηρίζεται στην τεχνική της υγροχρωματογραφίας υδρόφιλης αλληλεπίδρασης (HILIC). Η HILIC ως αναλυτικό εργαλείο προσφέρει πολλές δυνατότητες στα χέρια των αναλυτών καθώς είναι εφικτό να αναλυθούν και να διαχωριστούν πολικά συστατικά χρησιμοποιώντας υδρόφιλες στατικές φάσεις, ενώ η κινητή φάση αποτελεί μίγμα νερού και οργανικού διαλύτη με το οργανικό κλάσμα να βρίσκεται σε υψηλότερο ποσοστό. Παρά το γεγονός ότι η υγροχρωματογραφία αντίστροφης φάσης (RP-HPLC) είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη τεχνική διαχωρισμού, ωστόσο η ανάλυση πολικών και υδρόφιλων ενώσεων είναι δύσκολη και απαιτεί συχνά τη χρήση ειδικών στηλών (κατιονανταλλακτικές ή ανιονανταλλακτικές ρητίνες) ή την προσθήκη αντιδραστηρίων σχηματισμού ζευγών ιόντων. Ουσιαστικά η χρωματογραφία HILIC συμπληρώνει το κενό μεταξύ των κυριότερων χρωματογραφικών μεθόδων, αλλά ταυτόχρονα συμπίπτει μερικώς με κάθε μία από αυτές.

2. Μεθοδολογία

Στο στάδιο αυτό μελετήθηκε ο χρωματογραφικός διαχωρισμός των πεπτιδίων σε στήλη ZIC®p-HILIC ώστε με μία μέθοδο ανάλυσης να είναι εφικτός ο ποσοτικός προσδιορισμός καλλυντικών κρεμών που περιέχουν είτε ένα πεπτίδιο είτε μίγματα αυτών. Οι αρχικές μελέτες πραγματοποιήθηκαν με την τεχνική της HPLC-UV όπου καθορίστηκαν οι παράγοντες που συμβάλλουν στο χρωματογραφικό διαχωρισμό των μελετούμενων πεπτιδίων. Στη συνέχεια το πρωτόκολλο της HPLC χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη μεθόδου με τη συνδυαστική τεχνική LC-ESI/MS. Βελτιστοποιήθηκαν οι συνθήκες ανίχνευσης των πεπτιδίων με καθορισμό των βέλτιστων συνθηκών στο φασματόμετρο μαζών.

2.1 Οργανολογία

Σύστημα HPLC

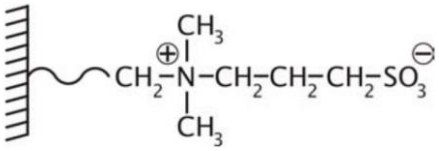
Το σύστημα υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από αντλία ισοκρατικής έκλουσης της εταιρίας Spectra Physics, μοντέλο SP 8810 και σύστημα εισαγωγής δείγματος της Rheodyne, μοντέλο 7125, με βρόχο εισαγωγής δείγματος όγκου 20 μL. Η χρωματογραφική στήλη που χρησιμοποιήθηκε είναι η στήλη ZIC®p-HILIC με διαστάσεις 150 x 2.1 και διάμετρο σωματιδίων 5μm της εταιρίας Merck SeQuantTM. Η ταχύτητας ροής της κινητής φάσης ρυθμίστηκε στα 0,25 mL min^{-1}.

Φασματόμετρο μαζών

Το φασματόμετρο μαζών που χρησιμοποιήθηκε ως ανιχνευτής των αναλυτών ήταν της εταιρίας Finnigan (Thermo Quest) μοντέλο AQA (Manchester, UK). Ο ιοντισμός των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με την τεχνική ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό για την παραγωγή θετικών ιόντων ESI(+). Η επεξεργασία των φασμάτων και των χρωματογραφημάτων μαζών έγινε με το λογιστικό πρόγραμμα Xcalibur της εταιρείας IBM (IBM data system). Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των αναλυτών χρησιμοποιήθηκε η τεχνική παρακολούθησης προεπιλεγμένου ιόντος (Selected Ion Monitoring, SIM).

2.2 Βελτιστοποίηση συστήματος HPLC

Το πληρωτικό υλικό των στηλών ZIC®-pHILIC είναι πηκτή πυριτίας επικαλυμμένη με στρώμα από ομάδες σουλφοαλκυλοβεταΐνης. Η λειτουργική ομάδα του πληρωτικού υλικού είναι αμφολύτης με το κατιοντικό κέντρο του τεταρτοταγούς αμμωνίου σε αναλογία 1:1 με την αρνητικά φορτισμένη σουλφονική ομάδα (σχήμα 1). Πρακτικά, η ταυτόχρονη παρουσία δύο αντίθετα φορτισμένων ομάδων προσδίδει μηδενικό συνολικό φορτίο στη στήλη.



Σχήμα 1: Λειτουργική ομάδα σουλφοαλκυλοβεταΐνης στη στήλη ZIC-p-HILIC

Οι σουλφοαλκυλοβεταϊνικοί αμφολύτες διατηρούν την ιδιότητα τους να συγκρατούν ισχυρά το νερό, δημιουργώντας το επιθυμητό για τη HILIC υδατικό στρώμα. Το συγκεκριμένο υλικό διατίθεται εμπορικά από τη Merck SeQuant^{TM} και είναι ανθεκτικό σε εύρος τιμών pH 3 έως 8 για τη στήλη ZIC®-HILIC. Στη στήλη ZIC®-pHILIC που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία η πηκτή πυριτίας έχει αντικατασταθεί από πορώδη σωματίδια πολυμερούς με αποτέλεσμα να είναι ανθεκτική σε εύρος τιμών pH είναι 2 έως 10. Οι στατικές φάσεις αυτού του τύπου είναι σχεδιασμένες για διαχωρισμό όξινων, βασικών αλλά και ουδέτερων μορίων.

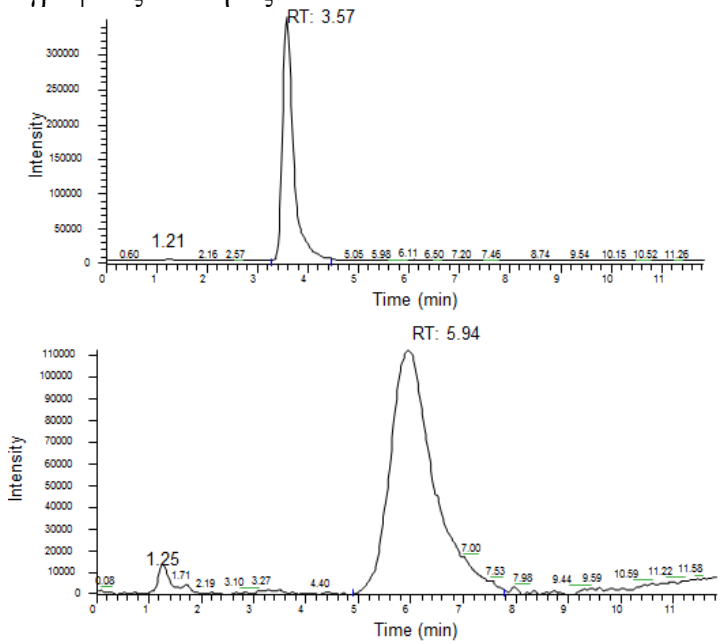
Για την ανάπτυξη της χρωματογραφικής μεθόδου μελετήθηκε η χρωματογραφική συμπεριφορά των αναλυτών σε συνθήκες χρωματογραφίας HILIC. Διάφοροι πολικοί, ευδιάλυτοι στο νερό οργανικοί διαλύτες είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν στη HILIC, ωστόσο το ακετονιτρίλιο αποτελεί μέχρι σήμερα την πρώτη επιλογή καθώς διαλύει τους περισσότερους αναλύτες και προσφέρει ικανοποιητική συγκράτηση. Στη χρωματογραφία HILIC για τους περισσότερους αναλύτες συγκεντρώσεις ρυθμιστικού διαλύματος σε εύρος 5 έως 20mM είναι επαρκείς με ανώτατο όριο τα 200 έως 300mM ανάλογα με την διαλυτότητα των αλάτων στην κινητή φάση. Η συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος πρέπει να επιλέγεται με προσοχή, ώστε να μην παρεμποδίζει τη διαδικασία της ανίχνευσης. Η κινητή φάση που τελικά χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από μίγμα ακετονιτριλίου με υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα μυρμηκικού αμμωνίου σε αναλογία 75:25, v/v η οποία διοχετεύεται στη στήλη με ταχύτητα ροής 0.25 ml min^{-1}.

2.3 Βελτιστοποίηση συνθηκών λειτουργίας φασματομέτρου μαζών

Ο ιοντισμός των αναλυτών πραγματοποιήθηκε με την τεχνική ιοντισμού μέσω ηλεκτροδιάχυσης. Το φασματόμετρο μαζών, Finnigan-AQA, που χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη αποτελείται από γραμμικό τετραπολικό αναλυτή. Για τον ακριβέστερο ποσοτικό προσδιορισμό των αναλυτών, οι παράμετροι του φασματομέτρου μαζών βελτιστοποιήθηκαν, ώστε να λαμβάνεται η μέγιστη δυνατή αφθονία των πρωτονιομένων μοριακών ιόντων των αναλυτών $[M+H]^+$ και των διμερών ιόντων $[M+2H]^{2+}$. Κατά τη διαδικασία της βελτιστοποίησης μελετήθηκαν οι πιθανοί τρόποι διάσπασης των αναλυτών στη συγκεκριμένη πηγή ιοντισμού.

Για τις μελέτες αυτές εισήχθησαν με απευθείας έκχυση (infusion) στο φασματόμετρο μαζών πρότυπα διαλύματα συγκέντρωσης 20,0 μg mL^{-1} για κάθε έναν από τους αναλύτες. Ως διαλύτης αραίωσης των αναλυτών χρησιμοποιήθηκε η κινητή φάση ενώ η εισαγωγή τους στο φασματόμετρο μαζών έγινε με ροή περίπου 50 μL min^{-1}. Οι παράμετροι που μελετήθηκαν ήταν η θερμοκρασία της πηγής, η τάση του τριχοειδούς και η τάση της πηγής. Η θερμοκρασία της πηγής ρυθμίστηκε στη μικρότερη δυνατή τιμή, 280ºC, που αντιστοιχεί σε ταχύτητα ροής της κινητής φάσης 0,25 mL min^{-1} έτσι, ώστε να αποφευχθεί

πιθανή θερμοδιάσπαση των αναλυόμενων ουσιών. Βρέθηκε ότι η τάση του τριχοειδούς δεν επηρεάζει σημαντικά τη συμπεριφορά των αναλυτών στο φασματόμετρο μαζών και έτσι ρυθμίστηκε στην τιμή 3,7 kV.
Στο σχήμα 2 παρουσιάζεται τυπικό χρωματογράφημα μαζών που προκύπτει από ανάλυση πρότυπων διαλυμάτων των ολιγοπεπτιδίων σε συγκέντρωση 2,4 μg/mL σύμφωνα με τις βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες.



Σχήμα 2. Τυπικό χρωματογράφημα ολιγοπεπτιδίων σε στατική φάση HILIC

2.4 Πορεία κατεργασίας καλλυντικής κρέμας

Η κατεργασία της καλλυντικής κρέμας που ακολουθήθηκε είχε ως στόχο την απαλλαγή από τα έκδοχα της κρέμας. Αρχικά πραγματοποιείται διάλυση των υδατοδιαλυτών συστατικών της κρέμας σε διάλυμα 0,01 N υδροχλωρικού οξέος και ακολουθεί υγρό-υγρό εκχύλιση με μη-πολικό διαλύτη με σκοπό την απαλλαγή από τα λιποδιαλυτά έκδοχα της κρέμας.

2.5 Επικύρωση της μεθόδου

Η αναπτυχθείσα μεθοδολογία αξιολογήθηκε ως προς τα κύρια χαρακτηριστικά ποιότητας, γραμμικότητα, ορθότητα, πιστότητα, όριο ανίχνευσης, όριο ποσοτικοποίησης και ανάκτηση. Η επικύρωση της μεθόδου πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας εμβολιασμένα δείγματα της βάσης της καλλυντικής κρέμας. Τέλος, η μέθοδος εφαρμόσθηκε στην ανάλυση καλλυντικής κρέμας η οποία κυκλοφορεί στο εμπόριο.

3. Συμπεράσματα

Η υγροχρωματογραφία HILIC, είναι το είδος χρωματογραφίας που ενδείκνυται για τέτοιου είδους αναλύσεις με υδρόφιλους αναλύτες, καθώς έτσι λύνονται τα προβλήματα της χρωματογραφίας RP όπως η μικρή συγκράτησή τους ή η χρήση παραγωγοποιήσης για να αυξηθεί η συγκράτηση τους. Η HILIC λόγω της φύσης των κινητών φάσεων, μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην τεχνική LC-MS, αυξάνοντας την ακρίβεια και την εκλεκτικότητα των αναλύσεων. Αυτό είναι ιδιαίτερα χρήσιμο σε περιπτώσεις ανάλυσης δραστικών συστατικών σε καλλυντικά προϊόντα, τα οποία βρίσκονται σε πολύ μικρές ποσότητες σε

ένα ιδιαίτερα σύνθετο μητρικό υλικό. Η μέθοδος που προτείνεται περιλαμβάνει μια σχετικά απλή και ταχεία προκατεργασία δείγματος, που σε συνδυασμό με το μικρό χρόνο ανάλυσης (~10 λεπτά) την καθιστούν κατάλληλη για εφαρμογή σε αναλύσεις ρουτίνας.

4. Βιβλιογραφία

1. Olejnik A., Nowak I., Eitner K., Schroeder G., " Determination of Hexapeptide ALA-ASP-LEU-LYS-PRO-THR by MALDI MS", International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 19, p.p.217–224, 2013, Poland
2. Zhang L., J. Falla T., "Cosmeceuticals and peptides", Clinics in Dermatology, 27, p.p. 485–494, 2009, USA
3. M. P. Lupo, A. L. Cole,"Cosmeceutical peptides",Dermatologic Therapy, 20, p.p. 343–349, 2007, USA
4. Varvaresou A., Papageorgiou S., Protopapa E., Katsarou A., "Efficacy and Tolerance Study of an Oligopeptide with Potential Anti-Aging Activity", Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications, 1, p.p 133-140, 2010 Greece
5. Papagianni P., Varvaresou A., Papageorgiou S., Panderi I., "Development and validation of an ion-pair RP-HPLC method for the determination of oligopeptide-20 in cosmeceuticals", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 56, p.p. 645– 649, 2011, Greece
6. Jiang W., Fischer G., Girmay Y., Irgum K., "Zwitterionic stationary phase with covalently bonded phosphorylcholine type polymer grafts and its applicability to separation of peptides in the hydrophilic interaction liquid chromatography mode" ,Journal of Chromatography A, 1127, p.p. 82–91, 2006, Sweden
7. Yoshida T., "Peptide separation by Hydrophilic-Interaction Chromatography: a review", J. Biochem. Biophys. Methods, 60, p.p 265–280, 2004, Japan
8. Buszewski B., Noga S., "Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)- a powerful separation technique", Anal Bioanal Chem, 402, p.p. 231-347, 2012, Poland
9. Yang Y., Boysen R.I., Hearn M.T.W., "Hydrophilic interaction chromatography coupled to electrospray mass spectrometry for the separation of peptides and protein digests", Journal of Chromatography A, 1216, p.p.5518-5524, 2009, Australia
10. Boersema P.J., Mohammed S., Heck A.J.R.,"Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) in proteomics", Anal Bioanal Chem, 391, p.p.151-159, 2008, The Netherlands
11. Chirita R., Chaimbault P., Archambault J., Robert I., Elfakir C., " Development of a LC–MS/MS method to monitor palmitoyl peptides content in anti-wrinkle cosmetics", Anal Chim Acta, 641, p.p.95-100, 2009, France