ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΔΡΟΦΙΛΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΣΤΟ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟ ΕΝΩΣΕΩΝ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΩΣ ΣΥΝΤΗΡΗΤΙΚΑ ΣΕ ΚΟΣΜΗΤΟΛΟΓΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ

Ελένη Δούλου[1], Ειρήνη Καββάλου[2], Βαρβαρέσου Αθανασία[3], Μαρία Γιαννάκου[1] και Ειρήνη Παντερή[1]

[1]Εργαστήριο Φαρμακευτικής Ανάλυσης, Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

[2]Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ηρακλείου, Τμήμα Δερματολογίας, Σχολή Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο, Κρήτης

[3]Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, Αιγάλεω, Αθήνα

email: irenepanderi@gmail.com

Περίληψη

Τα συντηρητικά είναι ουσίες που υπάρχουν στη φύση ή έχουν σχεδιαστεί εργαστηριακά ώστε να προστατεύουν τα κοσμητολογικά προϊόντα, επομένως και τον καταναλωτή, από τη μόλυνση που μπορεί να προκαλέσει η ανάπτυξη μικροοργανισμών κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης και της συνεχούς χρήσης τους. Τα συντηρητικά έχουν αντιμικροβιακή κυρίως δράση, εμποδίζουν δηλαδή την επιβίωση μικροοργανισμών σε ένα προϊόν και τον πολλαπλασιασμό τους σε βαθμό που θα μπορούσε να απειλήσει την ανθρώπινη υγεία. Είναι απαραίτητα προκειμένου να μην αλλοιωθούν οι ιδιότητες των κοσμητολογικών προϊόντων κατά το διάστημα αποθήκευσής τους, άρα να έχουν και μεγαλύτερη διάρκεια ζωής και να μπορούν να χρησιμοποιηθούν με ασφάλεια από τους καταναλωτές. Χωρίς συντηρητικά, τα περισσότερα καλλυντικά θα έπρεπε νανα διατηρούνται στο ψυγείο προκειμένου η διάρκεια ζωής τους να είναι 1-2 εβδομάδες. Η αυξανόμενη χρήση συντηρητικών σε κοσμητολογικά προϊόντα, καθιστά αναγκαία την ανάπτυξη κατάλληλων μεθόδων για τον έλεγχό τους.

Η εργασία αυτή αποσκοπεί στη μελέτη της χρωματογραφικής συμπεριφοράς ουσιών που χρησιμοποιούνται ως συντηρητικά σε κοσμητολογικά προϊόντα με την τεχνική της υγροχρωματογραφίας υδρόφιλης αλληλεπίδρασης σε συνδιασμό με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (HILIC-PDA). Τα συντηρητικά με τα οποία ασχοληθήκαμε στην παρούσα μελέτη είναι το μανδελικό οξύ, το βενζοϊκό οξύ, το διυδροξυ βενζοϊκό οξύ, το σαλυκιλικό οξύ και ένα παράγωγο της υδαντοΐνης (DMDM hydantoin). Πραγματοποιήθηκαν πειραματικές μελέτες της επίδρασης της σύστασης της κινητής φάσης στη συγκράτηση και τη χρωματογραφική συμπεριφορά των αναλυτών σε αναλυτική στήλη BEH XBridge®-HILIC. Μελετήθηκε η επίδραση του είδους και της συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος, η επίδραση της τιμής του pH της κινητής φάσης και η επίδραση του % ποσοστού νερού στην κινητή φάση. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων μεταβάλλονταν ένας παράγοντας, ενώ οι υπόλοιποι παρέμεναν σταθεροί με σκοπό να διερευνηθεί η χρωματογραφική συμπεριφορά των αναλυτών. Σκοπός μας είναι να αναπτύξουμε μία νέα και διαφορετική τεχνική για το διαχωρισμό των συντηρητικών σε κοσμητολογικά προϊόντα με την τεχνική HILIC, που είναι μία νέα και πολλά υποσχόμενη τεχνική με αρκετά πλεονεκτήματα και μπορεί να προσφέρει ασφαλή και αξιόπιστα αποτελέσματα.

Λέξεις-Κλειδιά: *Κοσμητολογικά προϊόντα, συντηρητικά , HILIC, ανάπτυξη μεθόδου.*

Ελένη Δούλου, Ειρήνη Παντερή, ΕΚΠΑ
Υγροχρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης στο χρωματογραφικό διαχωρισμό ενώσεων που χρησιμοποιούνται ως συντηρητικά σε κοσμητολογικά προϊόντα
7ο Τακτικό Εθνικό Συνέδριο Μετρολογίας
Αθήνα, 11-12 Μαΐου 2018

Abstract
Preservatives are naturally occurring substances or have been designed in vitro to protect cosmetic products, and therefore the consumer, against the contamination that microorganisms can cause during the storage and continuous use. The increasing use of preservatives in cosmetic products makes it necessary to develop appropriate methods for their control. This work aims at studying the chromatographic behavior of substances used as preservatives in cosmetic products by the hydrophilic interaction liquid chromatography technique in combination with a photodiode array detector (HILIC-PDA). The preservatives studied were mandelic acid, benzoic acid, dehydroacetic acid, salicylic acid and a hydantoin derivative (DMDM hydantoin). Experimental studies of the effect of mobile phase composition on the retention and chromatographic behavior of analytes on analytical column BEH XBridge®-HILIC. The aim is to develop a new and different technique for separating preservatives in cosmetic products based on HILIC chromatography which is a promising mode of chromatography to the analysis of compounds with diverse physicochemical properties.

Keywords: *Cosmetic products, preservatives, HILIC, method development*

1.Εισαγωγή

Τα συντηρητικά είναι ουσίες που υπάρχουν στη φύση ή έχουν σχεδιαστεί εργαστηριακά ώστε να προστατεύουν τα κοσμητολογικά προϊόντα, επομένως και τον καταναλωτή, από τη μόλυνση που μπορεί να προκαλέσει η ανάπτυξη μικροοργανισμών κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης και της συνεχούς χρήσης τους. Τα συντηρητικά έχουν αντιμικροβιακή κυρίως δράση, εμποδίζουν δηλαδή την επιβίωση μικροοργανισμών σε ένα προϊόν και τον πολλαπλασιασμό τους σε βαθμό που θα μπορούσε να απειλήσει την ανθρώπινη υγεία. Είναι απαραίτητα προκειμένου να μην αλλοιωθούν οι ιδιότητες των κοσμητολογικών προϊόντων κατά το διάστημα αποθήκευσής τους, άρα να έχουν και μεγαλύτερη διάρκεια ζωής και να μπορούν να χρησιμοποιηθούν με ασφάλεια από τους καταναλωτές. Χωρίς συντηρητικά, τα περισσότερα καλλυντικά θα έπρεπε να διατηρούνται στο ψυγείο προκειμένου η διάρκεια ζωής τους να είναι 1-2 εβδομάδες.
Η εργασία αυτή αποσκοπεί στη μελέτη της χρωματογραφικής συμπεριφοράς ουσιών που χρησιμοποιούνται ως συντηρητικά σε κοσμητολογικά προϊόντα με την τεχνική της υγροχρωματογραφίας υδρόφιλης αλληλεπίδρασης σε συνδιασμό με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (HILIC-PDA). Τα συντηρητικά με τα οποία ασχοληθήκαμε στην παρούσα μελέτη είναι το μανδελικό οξύ, το βενζοϊκό οξύ, το διυδροξυ βενζοϊκό οξύ, το σαλυκιλικό οξύ και ένα παράγωγο της υδαντοΐνης. Ο μηχανισμός χρωματογραφικής συγκράτησης στη HILIC είναι πολύπλοκος και περιλαμβάνει μηχανισμό κατανομής των αναλυτών ανάμεσα στην κινητή φάση και σε μια υδατική στιβάδα ακινητοποιημένη στη στατική φάση, μηχανισμό προσρόφησης στη στατική και την κινητή φάση, μηχανισμό ιοντοανταλλαγής στην περίπτωση στατικών φάσεων που φέρουν ιοντισμένες ομάδες αλλά και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με τη στατική φάση. Η έκταση με την οποία οι επιμέρους μηχανισμοί ελέγχουν τη συνολική συγκράτηση εξαρτάται από τη φύση της στατικής φάσης, τη χημική δομή των αναλυτών καθώς επίσης και τη σύσταση της κινητής φάσης, Panderi (2016).

2.Μεθοδολογία

Πραγματοποιήθηκαν πειραματικές μελέτες της επίδρασης της σύστασης της κινητής φάσης στη συγκράτηση και τη χρωματογραφική συμπεριφορά των αναλυτών σε αναλυτική στήλη BEH XBridge®-HILIC. Μελετήθηκε η επίδραση του είδους και της

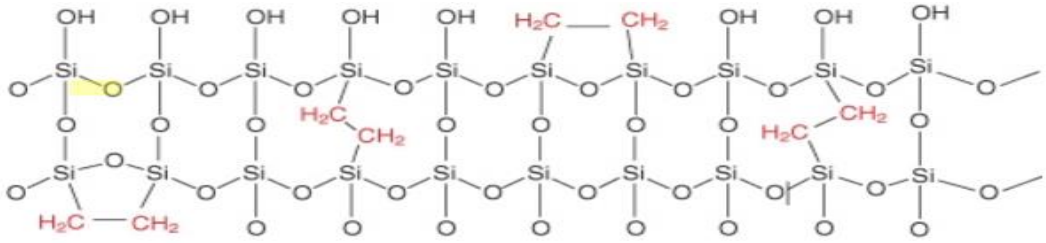
συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος, η επίδραση της τιμής του pH της κινητής φάσης και η επίδραση του % ποσοστού νερού στην κινητή φάση. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων μεταβάλλονταν ένας παράγοντας, ενώ οι υπόλοιποι παρέμεναν σταθεροί με σκοπό να διερευνηθεί η χρωματογραφική συμπεριφορά των αναλυτών. Σκοπός μας είναι να αναπτύξουμε μία νέα και διαφορετική τεχνική για το διαχωρισμό των συντηρητικών σε κοσμητολογικά προϊόντα με την τεχνική HILIC, που είναι μία νέα και πολλά υποσχόμενη τεχνική με αρκετά πλεονεκτήματα και μπορεί να προσφέρει ασφαλή και αξιόπιστα αποτελέσματα.

2.1 Οργανολογία

Το σύστημα υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από αντλία ισοκρατικής έκλουσης Waters 1515, αυτόματο δειγματολήπτη Waters 717 plus και ανιχνευτή σειράς φωτοδιόδων Waters 996 PDA. Η επεξεργασία και η ανάλυση των χρωματογραφικών δεδομένων, πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό πρόγραμμα Empower της εταιρίας Waters. Όλοι οι αναλύτες ανιχνεύονται σε εύρος μηκών κύματος 200-350 nm και τα χρωματογραφήματα εξάγονται στο μέγιστο μήκος κύματος ,$\lambda_{max,}$ του κάθε αναλύτη.

2.2 Βελτιστοποίηση συστήματος

Πραγματοποιήθηκαν πειραματικές μελέτες προκειμένου να βρεθεί η κατάλληλη αναλυτική στήλη που θα διαχώριζε αποτελεσματικά τους αναλύτες και θα προσέφερε αξιόπιστα χρωματογραφικά αποτελέσματα. Οι αναλυτικές στήλες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η αναλυτική στήλη ZIC®-pHILIC και η αναλυτική στήλη HILIC BEH XBridge®. Επιλέχθηκε τελικά ως πιο κατάλληλη η αναλυτική στήλη HILIC BEH διότι μπορούσε να συγκρατήσει πιο αποτελεσματικά τους αναλύτες. Όπως φαίνεται και στο σχήμα 1, το πληρωτικό υλικό αποτελείται από σωματίδια μεγέθους 3,5μm που φέρουν ομάδες bis-triethoxysilyl ethane (BEH-particles). Είναι σημαντική η κατανόηση του κυρίαρχου μηχανισμού που διέπει το χρωματογραφικό διαχωρισμό για την ανάπτυξη μεθόδων με χρωματογραφία HILIC. Σχετικά με τις στήλες BEH HILIC ο χρωματογραφικός μηχανισμός συγκράτησης είναι μεικτός και περιλαμβάνει φαινόμενα προσρόφησης, κατανομής και δευτερεύουσες ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις.



Σχήμα 1: Πληρωτικό υλικό της στήλης HILIC BEH.

Οι κινητές φάσεις στη HILIC μπορούν να περιέχουν 40-97% ακετονιτρίλιο σε νερό, ή και κάποιο πτητικό ρυθμιστικό διάλυμα. Ως οργανικός τροποποιητής για τις μελέτες επιλέχθηκε το ακετονιτρίλιο, που θεωρείται ότι είναι ο οργανικός διαλύτης επιλογής στη χρωματογραφία αυτού του είδους, καθώς στερεί τη δυνατότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου και δεν ανταγωνίζεται τους αναλύτες για την αλληλεπίδραση τους με το πληρωτικό υλικό, Machairas (2018). Επιπλέον η μέτρια τιμή εκλουστικής ισχύος του ακετονιτριλίου δίνει τη δυνατότητα ανάλυσης και χρωματογραφικού διαχωρισμού

μεγάλου αριθμού αναλυτών. Η συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος παίζει καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της έκτασης των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα μεταξύ αναλυτών και στατικής φάσης. Στη χρωματογραφία HILIC για τους περισσότερους αναλύτες συγκεντρώσεις ρυθμιστικού διαλύματος σε εύρος 5 έως 20 mM είναι επαρκείς με ανώτατο όριο τα 200 έως 300 mM 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 95:5 v/v η οποία διοχετεύεται στη στήλη με ταχύτητα ροής 0,25 mL min^{-1}.

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. Αναπτύχθηκε μία νέα και διαφορετική τεχνική για το διαχωρισμό των συντηρητικών σε κοσμητολογικά προϊόντα με την τεχνική HILIC, που είναι μία νέα και πολλά υποσχόμενη τεχνική με αρκετά πλεονεκτήματα και μπορεί να προσφέρει ασφαλή και αξιόπιστα αποτελέσματα.

Βιβλιογραφία

1. Panderi I., Malamos Y., Machairas G., Zaharaki S., Investigation of the retention mechanism of cephalosporins by zwitterionic hydrophilic interaction liquid chromatography, Chromatographia, 79 (15-16), p.p. 995-1002, 2016, Athens, Greece
2. Machairas G, Panderi I, Geballa-Koukoula A, Rozou S, Antonopoulos N, Charitos C, Vonaparti A., "Development and validation of a hydrophilic interaction liquid chromatography method for the quantitation of impurities in fixed-dose combination tablets containing rosuvastatin and metformin", Talanta, 183, p.p. 131-141, 2018, Athens, Greece