ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΔΡΟΦΙΛΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΟΥ 3-ΑΚΕΤΥΛΟΕΞΑΠΕΠΤΙΔΙΟΥ ΣΕ ΚΟΣΜΗΤΟΛΟΓΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ

Β. Ράικου[1], Α. Βαρβαρέσου [2], Ε. Τσιρίβας[2], Ε. Καββάλου[3], Ε. Παντερή[1]
[1]Εργαστήριο Φαρμακευτικής Ανάλυσης, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
[2]Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, Αθήνα, Αιγάλεω
[3]Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ηρακλείου, Τμήμα Δερματολογίας, Σχολή Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο, Κρήτη
email: irenepanderi@gmail.com

Περίληψη

Η ενσωμάτωση δραστικών ουσιών σε καλλυντικά προϊόντα με σκοπό την αποκατάσταση των αλλοιώσεων της φωτογήρανσης παρουσιάζει αυξανόμενο ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια και έχει οδηγήσει στη δημιουργία μιας νέας γενιάς καλλυντικών προϊόντων που χαρακτηρίζονται με τον όρο φαρμακοκαλλυντικά (cosmeceuticals). Πεπτίδια ενσωματώνονται σε καλλυντικά προϊόντα με σκοπό την αύξηση της παραγωγής κολλαγόνου και υαλουρονικού οξέος, την αύξηση της ελαστικότητας, τη μείωση των ρυτίδων του δέρματος και την αντιμετώπιση των αλλοιώσεων της φωτογήρανσης. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε το 3-ακετυλοεξαπεπτίδιο (INCI: Acetyl hexapeptide-3) που ανήκει στην κατηγορία των πεπτιδίων που αναστέλλουν τη λειτουργία της νευρομυικής σύναψης. Το εξαπεπτίδιο αυτό, όταν εφαρμοσθεί τοπικά εμποδίζει την απελευθέρωση των νευρομεταβιβαστών στη νευρομυική σύναψη και έτσι τους μηχανικούς παράγοντες που οδηγούν στη δημιουργία ρυτίδων έκφρασης. Σχεδιάστηκε με πρότυπο το αμινοτελικό άκρο της μεμβρανικής πρωτεΐνης SNAP-25. Η πρωτεΐνη SNAP-25 σχηματίζει μαζί με άλλες πρωτεΐνες το σύμπλοκο SNARE, το οποίο ρυθμίζει την εξαρτώμενη από το ασβέστιο απελευθέρωση νευρομεταβιβαστών από τα κυστίδια στη νευρομυική σύναψη, διαδικασία απαραίτητη για την εκτέλεση της μυικής συστολής. Το 3-ακετυλοεξαπεπτίδιο μιμούμενο δομικά την πρωτεΐνη SNAP-25, παρεμβάλλεται στο σύμπλοκο SNARE, το αποσταθεροποιεί και έτσι εμποδίζει την απελευθέρωση των νευρομεταβιβαστών στη νευρομυική σύναψη και τη μυική συστολή. Παρουσιάζει ικανοποιητική *in vitro* ενδοδερμική απορρόφηση και ενσωματώνεται σε αντιρυτιδικά προϊόντα συνήθως σε συγκέντρωση 25-50 ppm. 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. Τα πεπτίδια πολλές φορές εμφανίζουν παράξενη συμπεριφορά στην κατακράτηση τους από τις αναλυτικές στήλες. 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 ολιγοπεπτιδίου σε κοσμητολογικά προϊόντα με την τεχνική της υγροχρωματογραφίας υδρόφιλης αλληλεπίδρασης (HILIC).

Βασιλική Ράικου, Ειρήνη Παντερή, ΕΚΠΑ, Α. Βαρβαρέσου, Ε. Τσιρίβας, Ε. Καββάλου, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, Ε. Καββάλου, Πανεπιστήμιο Κρήτης
Έλεγχος ποιότητας κοσμητολογικών προϊόντων με ενσωματωμένα πεπτίδια με υγροχρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης (HILIC)

7ο Τακτικό Εθνικό Συνέδριο Μετρολογίας
Αθήνα, 11-12 Μαΐου 2018

Λέξεις-Κλειδιά: *Κοσμητολογικά προϊόντα, Acetyl hexapeptide-3, HILIC, ποσοτικός προσδιορισμός, ανάπτυξη μεθόδου.*

Abstract

The integration of active substances into cosmetic products to remedy the alterations of photoaging has been increasing in recent years and has led to the creation of a new generation of cosmetic products characterized us cosmeceuticals. Peptides are integrated into cosmetic products to increase collagen and hyaluronic acid production, increase elasticity, reduce skin wrinkles and treat photoaging alterations. In the present study, 3-acetylhexapeptide (INCI: Acetyl hexapeptide-3) was studied. It belongs to the kind of peptides that inhibit the function of the neuromuscular junction. This hexapeptide, when applied topically, prevents the release of neurotransmitters into the neuromuscular junction and thus the mechanical factors that lead to expression wrinkles. It was designed as a template of the N-terminal end of the SNAP-25 membrane protein. The SNAP-25 protein, together with other proteins, forms the SNARE complex, which regulates the calcium-dependent release of neurotransmitters from the vesicles into the neuromuscular junction, a process necessary to perform the muscle contraction. The 3-acetylhexapeptide, structurally mimicking the SNAP-25 protein, interferes with the SNARE complex, destabilizes it and thus prevents the release of neurotransmitters into neuromuscular junction and muscle contraction. It exhibits satisfactory in vitro intradermal absorption and is incorporated into anti-wrinkle products usually at a concentration of 25-50 ppm. The increasing trend in the use of peptides in cosmetic products makes it necessary to develop and validate methods of quantification and methods for controlling their stability. Chromatography of the peptides typically involves gradient reversed-phase chromatography. In several HPLC studies it has been observed that the retention of peptides decreases by increasing the percentage of the organic modifier in the mobile phase to a minimum beyond which retention increases with increasing the percentage of the organic modifier in the mobile phase. In this study, a HILIC-PDA method is developed and validated for the quantitative determination of 3-acetylhexapeptide in cosmetic products.

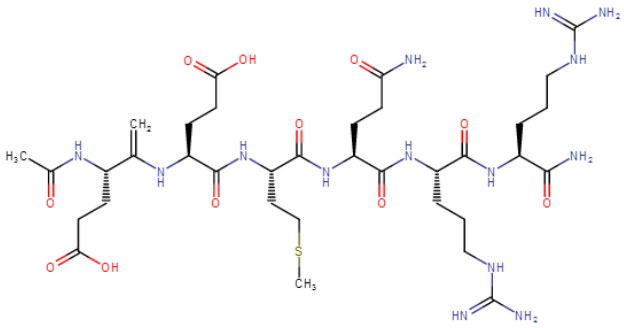
Keywords: *Cosmetic products, Acetyl hexapeptide-3, HILIC, assay, method development.*

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. Με σκοπό τον περιορισμό των αλλοιώσεων που συνοδεύουν τη γήρανση του δέρματος έχουν αναπτυχθεί διάφορα κοσμητολογικά προϊόντα, εξωτερικής χρήσης. Τα πιο πρόσφατα επιτεύγματα στο χώρο της κοσμητολογίας αφορούν φαρμακοκαλλυντικά προϊόντα που φέρουν ως δραστικά

Βασιλική Ράικου, Ειρήνη Παντερή, ΕΚΠΑ, Α. Βαρβαρέσου, Ε. Τσιρίβας, Ε. Καββάλου, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, Ε. Καββάλου, Πανεπιστήμιο Κρήτης

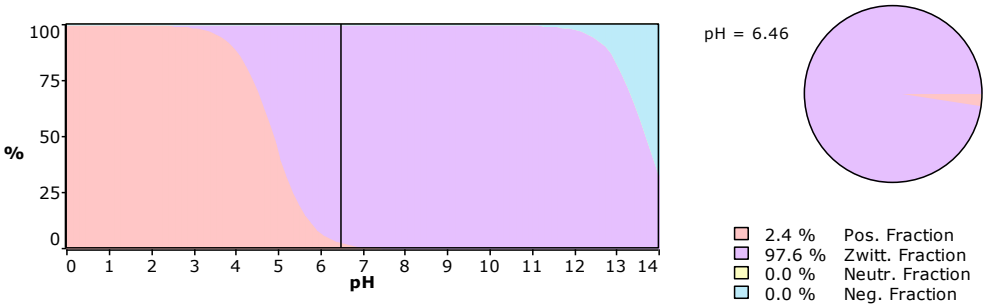
συστατικά πεπτίδια. Ο ρόλος των πεπτιδίων ποικίλει και εμπλέκονται σε πολλές φυσιολογικές διαδικασίες όπως στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, στη μετανάστευση κυττάρων, στη σύνθεση πρωτεϊνών και εξωκυτταρικών ουσιών, στη διαδικασία της φλεγμονής και της αγγειογένεσης, Papagianni (2011) και Giannakou (2018). Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε το 3-ακετυλοεξαπεπτίδιο που ανήκει στην κατηγορία των πεπτιδίων που αναστέλλουν τη λειτουργία της νευρομυικής σύναψης. Το εξαπεπτίδιο αυτό, όταν εφαρμοσθεί τοπικά εμποδίζει την απελευθέρωση των νευρομεταβιβαστών στη νευρομυική σύναψη και έτσι τους μηχανικούς παράγοντες που οδηγούν στη δημιουργία ρυτίδων έκφρασης, Raikou (2017). Η αυξανόμενη τάση της χρήσης των πεπτιδίων σε καλλυντικά προϊόντα καθιστά αναγκαία την ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδων ποσοτικού προσδιορισμού τους καθώς και μεθόδων για τον έλεγχο της σταθερότητάς τους. Στόχος της εργασίας είναι η ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου ποσοτικοποίησης του 3-ακετυλοεξαπεπτίδιο (σχήμα 1), σε κοσμητολογικό προϊόν με την τεχνική της υγροχρωματογραφίας υδρόφιλης αλληλεπίδρασης σε συνδυασμό με ανιχνευτή UV.



Σχήμα 1. Χημική δομή του 3-ακετυλοεξαπεπτιδίου.

2. Μεθοδολογία

Η επιλογή των κατάλληλων συνθηκών για την ανάλυση του 3-ακετυλο εξαπεπτιδίου πραγματοποιήθηκε λαμβάνοντας υπόψη πληροφορίες ως προς τον ιοντισμό και τη λιποφιλία του με τη χρήση του υπολογιστικού προγράμματος ADME (σχήμα 2). Η χρωματογραφική συμπεριφορά του μελετήθηκε σε μια σειρά από αναλυτικές στήλες HILIC και τελικά επιλέχθηκε ως κατάλληλη για τη μελέτη η αναλυτική στήλη Xbridge® HILIC BEH.



Σχήμα 2. Βαθμός ιοντισμού (%) του αναλύτη σε διάφορες περιοχές τιμών pH.

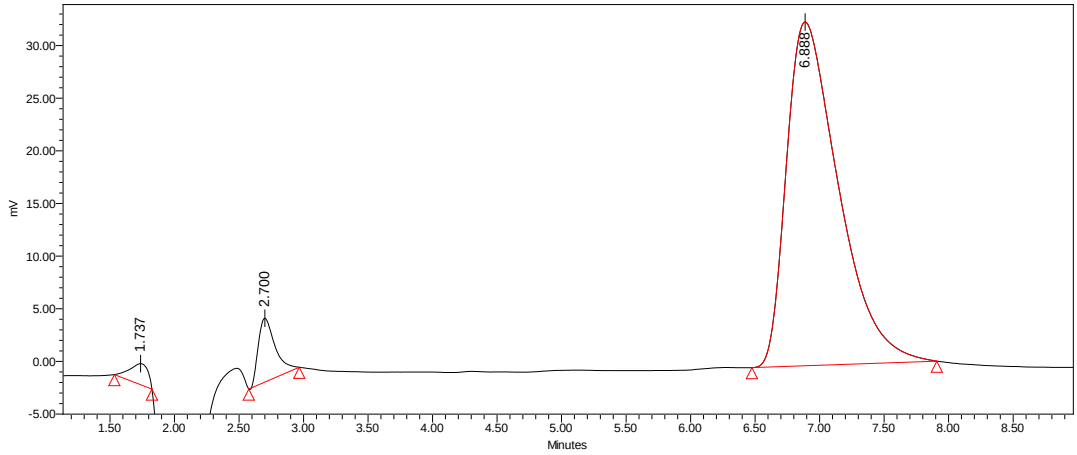
Ο μηχανισμός χρωματογραφικής συγκράτησης στις στήλες BEH XBridge®-HILIC περιλαμβάνει φαινόμενα προσρόφησης κατανομής και δευτερεύουσες αλληλεπιδράσεις ανάλογες με αυτές που λαμβάνουν χώρα σε στήλες πηκτής πυριτίας. Μεγαλύτερη συγκράτηση επιτυγχάνεται όταν στην κινητή φάση χρησιμοποιείται οργανικός διαλύτης (π.χ, ακετονιτρίλιο) σε ποσοστό μεγαλύτερο από 80%. Το pH της κινητής φάσης μπορεί επίσης, να μεταβάλλει τη συγκράτηση, ανάλογα με το φορτίο του αναλύτη ή/και των επιφανειακών ομάδων σιλανόλης, Panderi (2016).

2.1 Οργανολογία

Το σύστημα υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από αντλία ισοκρατικής έκλουσης της εταιρίας Spectra Physics, σύστημα εισαγωγής δείγματος της Rheodyne, και ανιχνευτή UV της εταιρίας Waters. Η χρωματογραφική στήλη που χρησιμοποιήθηκε είναι η στήλη BEH XBridge®-HILIC 3.5μm με διαστάσεις 2,1 x 150 mm της εταιρίας Waters . Η ταχύτητας ροής της κινητής φάσης ρυθμίστηκε στα 0,25 mL min^{-1}. Η επεξεργασία και η ανάλυση των χρωματογραφικών δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό πρόγραμμα Empower της εταιρίας Waters.

2.2. Ανάπτυξη μεθόδου

Κατά τη διαδικασία της ανάπτυξης της μεθόδου, χρησιμοποιήθηκε τόσο οξικό όσο και μυρμηκικό αμμώνιο ως άλας στην κινητή φάση. Η κινητή φάση αποτελείται από μίγμα που περιέχει υψηλό ακετονιτριλίου με μικρό ποσοστό νερού παρουσία άλατος. Η κατεργασία του δείγματος πραγματοποιήθηκε με αραίωση του κοσμητολογικού σκευάσματος. Στο σχήμα 3 παρουσιάζεται τυπικό χρωματογράφημα του 3-ακετυλο εξαπεπτιδίου σε συγκέντρωση 1 μg mL^{-1} σύμφωνα με τις βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες.



Σχήμα 3. Τυπικό χρωματογράφημα του 3-ακετυλο εξαπεπτιδίου

2.3 Επικύρωση

Η αναπτυχθείσα μεθοδολογία αξιολογήθηκε ως προς τα κύρια χαρακτηριστικά ποιότητας της, γραμμικότητα, ορθότητα, πιστότητα, όριο ανίχνευσης, όριο ποσοτικοποίησης και % ανάκτηση. Συγκεκριμένα, για την αξιολόγηση της γραμμικότητας

κατασκευάστηκαν και αναλύθηκαν τρεις καμπύλες αναφοράς σε τρεις διαφορετικές εργαστηριακές ημέρες. Ο προσδιορισμός του ορίου ανίχνευσης και του ορίου ποσοτικοποίησης πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους ορισμούς του ICH Topic Q2B. Η προτεινόμενη μέθοδος ελέγχθηκε ως προς την ορθότητα και την πιστότητά της, τόσο κατά τη διάρκεια μιας εργαστηριακής ημέρας, όσο και μεταξύ των ημερών. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ελέγχου σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων. Επιπλέον ελέγχθηκε η ανθεκτικότητα της και για το σκοπό αυτό μελετήθηκε η επιρροή μικρών προμελετημένων διαφοροποιήσεων των παραμέτρων της μεθόδου στο χρόνο ανάσχεσης και το εμβαδόν κορυφής του οκτρεοτιδίου. Η προτεινόμενη HILIC-UV μέθοδος εφαρμόσθηκε στην ανάλυση του 3-ακετυλο εξαπεπτιδίου σε κοσμητολογικό προϊόν.

3. Συμπεράσματα

Η χρωματογραφία HILIC μπορεί να χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στην ανάλυση πολικών πεπτιδίων. Η αναπτυχθείσα μέθοδος HILIC-UV επιτρέπει την γρήγορη χρωματογραφική ανάλυση του 3-ακετυλο εξαπεπτιδίου (χρόνος ανάλυσης < 8 λεπτά). Η μέθοδος χαρακτηρίζεται από γραμμικότητα, ικανοποιητική ακρίβεια και επαναληψιμότητα, τόσο εντός της ημέρας, όσο και μεταξύ των ημερών. Η μέθοδος κρίθηκε ανθεκτική καθώς μικρές και σταδιακές μεταβολές κάποιων παραμέτρων επέφεραν ελάχιστες μόνο διακυμάνσεις στις υπόλοιπες παραμέτρους. Η αναπτυχθείσα μεθοδολογία εφαρμόστηκε με επιτυχία σε ανάλυση κοσμητολογικού προϊόντος. Τα παραπάνω αποτελέσματα καθιστούν τη μέθοδο κατάλληλη να εφαρμοστεί σε αναλύσεις ρουτίνας.

4. Βιβλιογραφία

1. 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, Athens, Greece.
2. Giannakou M., Varvaresou A., Kiriazopoulos E., Papageorgiou S., Kavvalou E., Tsirivas E., Panderi I.**, "**Quantification of oligopeptide-20 and oligopeptide-24 in cosmetic creams using hydrophilic interaction liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry", Separation Science Plus, 1(3), 159-167, 2018, Athens, Greece.
3. Raikou V., Varvaresou A., Panderi I., Papageorgiou E., "The efficacy study of the combination of tripeptide-10-citrulline and acetyl hexapeptide-3 A prospective, randomized controlled study", Journal of Cosmetic Dermatology, 16(2), p.p. 271–278, 2017, Athens, Greece
4. 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.