

DETERMINAREA PRIN METODA HPLC A D-PANTENOLULUI SI A ACIDULUI GLICIRETINIC DINTR-UN SUPLIMENT ANTIHERPETIC PE BAZA DE PLANTE

DETERMINATION BY HPLC METHOD OF D-PANTHENOL AND GLYCYRRHETINIC ACID IN A ANTIHERPES HERBAL SUPPLEMENT

Elena Gabriela Oltean, G. Oltean, C. Chiurciu
Romvac Company SA, Bucharest

Cuvinte cheie: pantenol, acid gliciretinic, UV-VIS cromatografie de lichide de performanță ridicată de fază inversă, Glycyrrhiza glabra, virus herpetic.

Key words: panthenol, glycyrrhetic acid, UV - VIS RP-HPLC reversed phase high performance liquid chromatography, Glycyrrhiza glabra, herpes virus.

Rezumat

Metoda HPLC a fost utilizata pentru determinarea cantitativa a pantenol si a acidului gliciretinic dintr-un supliment antiherpes pe baza de plante, constituit din pantenol (provitamina B5) si un extract alcoolic de Glycyrrhiza glabra (lemn dulce). Pentru determinarea pantenolului separarea s-a realizat pe o coloana KROMASIL 60D HILIC C18, 250x4.6 mm, 5 μ, utilizand ca si faza mobila un amestec format din metanol si o solutie tampon de fosfat dipotasic, 20 mM, pH 6, in raport volumetric de 10/90. Lungimea de unda a fost setata la 210 nm. Fluxul a fost de 1 ml/min, iar temperatura coloanei a fost mentinuta la (30±5) °C. Pentru acidul gliciretinic a fost folosita elutia izocratica pe o coloana HYPERSIL C18 BDS, 250x4.6 mm, 5 μ, cu un amestec acetoneitril – solutie apoasa de acid fosforic 0.1%, in raport volumetric de 75/25. Lungimea de unda a fost stabilita la 250 nm. Fluxul a fost de 1 ml/min, iar temperatura coloanei a fost mentinuta la (30±5) °C.

Abstract

HPLC was used for the quantitative determination of panthenol and glycyrrhetic acid in an antiherpes herbal supplement based on panthenol (B₅ provitamin) and alcoholic extract of *Glycyrrhiza glabra*. For the determination of panthenol, the separation was carried out on a Kromasil 60-S HILIC D C₁₈ column (250x4.6 mm, 5 μm), with methanol – 20 mM potassium phosphate dibasic, pH 6 (10:90, volume ratio) as the mobile phase. The detection wavelength was set at 210 nm. Flow was 1 mL·min⁻¹ and the column temperature was maintained at (30±0.5) °C. For glycyrrhetic acid, a Hypersil C₁₈ BDS column (250x4.6 mm, 5 μm) with acetonitril – 0.1% phosphoric acid in water (75:25, volume ratio) isocratic elution. The detection wavelength was set at 250 nm. Flow was 1 mL·min⁻¹ and the column temperature was maintained at (30±0.5) °C.

Introducere

Lemnul dulce (*Glycyrrhiza glabra*) este o planta ierbacee perena, leguminoasa, care creste in sudul Europei si in anumite parti ale Asiei (India). De la plantă se foloseste radacina, bogata in acid gliciretinic (glicirizina). Acidul gliciretinic este folosit si in scop de indulcitor, fiind de 30-50 de ori mai dulce decat zaharul.

Au fost demonstrate efectele antivirale, antimicrobiene, anti-inflamatorii si de crestere a presiunii sangelui ale glicirizinei, atat *in vitro* cat si *in vivo*.

Injectarea intravenoasa, cat si administrarea orala a glicirizinei duce la incetinirea progresiei hepatitei virale si a celei autoimune.

Aplicată topic, s-a demonstrat actiunea asupra dermatitei atopice.

Până acum a fost demonstrată activitatea anti-hiperlipidemică, eficiența în terapia hiperpigmentării pielii indusă de inflamații, precum și în prevenirea problemelor neuro-degenerative și a cariilor dentare.

De asemenea, au fost investigate deja proprietățile specifice antiulceroase, laxative, antidiabetice, antiinflamatorii, imunomodulatoare, antitumorale și expectorante ale acidului gliciretinic.

Pantenolul (provitamina B5) este un analog alcoolic al acidului pantotenic (vitamina B5).

Este folosit în industria farmaceutică, în prepararea cosmeticelor și a produselor de îngrijire personală ca și hidratant și umectant, în unguente, lotiuni, șampoane, spray-uri nazale, colire și soluții de curățare pentru lentilele de contact.

Este utilizat în unguente pentru tratarea arsurilor solare, arsurilor ușoare, în rănilor minore ale pielii, în concentrații de 2-5 %; îmbunătățește hidratarea, reduce pruritul și inflamația pielii, îmbunătățind elasticitatea și accelerând rata de vindecare a ranilor de la nivelul epidermei.

1. Materiale și Metode

Reactivii

- Pantenol CRS (Sigma) - utilizat ca standard intern.
- Acid gliciretinic CRS (Sigma) - utilizat ca standard intern.
- Toți ceilalți reactivi utilizați au fost de grad HPLC, furnizați de către Merck (Germania).
- Apa pentru soluții a fost obținută in-house cu un sistem Milli-Q (Millipore, USA).
- Toate soluțiile au fost preparate zilnic.

Metoda HPLC

A fost realizată pe un LC Surveyor (Thermo Electron Corporation, USA) echipat cu pompă cuaternară, autosampler, buclă de 25 μl și detector UV-VIS – diode array (Thermo Electron Corporation, USA).

Integrarea picurilor cromatografice a fost realizată cu softul ChromQuest (Thermo Electron).

Condițiile cromatografice sunt prezentate în Tabelul 1.

Tabel 1

Parametri de separare cromatografică aplicate în cazul pantenolului și acidului gliciretinic

Pantenol	Acid gliciretinic
Faza staționară Kromasil 60d Hilic C18 250x4.6 mm, 5μ	Faza staționară Hypersil BDS C18 250x4.6 mm, 5μ
Faza mobilă Metanol – K ₂ HPO ₄ 20 mM pH 6 – 10/90 raport volumetric	Faza mobilă Acetonitril – soluție apoasă acid fosforic 0.1% - 75/25 raport volumetric
UV VIS 210 nm	
Temperatura 30°C	Temperatura 30°C
Flux 1 ml/min	Flux 1 ml/min

Prepararea soluțiilor standard de referință

Soluția *standard de lucru acid gliciretinic*:

- a avut o concentrație finală de 0.02 mg/ml, preparată în apă, pornind de la o *soluție stoc de acid gliciretinic* de 1 mg/ml preparată apă.
- *Soluția standard de lucru pantenol*
- a avut o concentrație finală de 0.1 mg/ml preparată în alcool, pornind de la o *soluție stoc de pantenol* cu concentrația 1 mg/ml în alcool.

Prepararea soluțiilor de probe

Pentru determinarea acidului gliciretinic:

- se injectează în sistemul cromatografic 5 μl produs integral.
- Pentru determinarea pantenolului din produsul final:
- se realizează o diluție de 250 ori a acestuia în apă și se injectează în volum de 5 μl.

2. Rezultate și Discuții

Pentru determinarea cantitativa a pantenolului și acidului gliciretinic din produsul final a fost propusă o metoda HPLC de faza inversă, fiind selectate condițiile optime de separare cromatografică.

Parametri cromatografici aleși ca definatorii în cazul acestui studiu au fost:

- timpul de retenție,
- aria cromatogramei,
- rezoluția (selectivitatea metodei),
- numărul de talere teoretice (eficiența separării).

Din analiza cromatogramelor soluțiilor standard de referință și a soluțiilor de proba se constată că nu există diferențe între compuşii de interes analizați și restul matricei produsului finit (figurile 1 și 2).

Pentru dezvoltarea metodei HPLC de analiză a celor doi compuşii activi prezenți în suplimentul pe bază de plante, cu acțiune antiherpetică, a fost folosit și un produs similar, existent pe piață; rezultatele au fost similare, demonstrând reproductibilitatea metodei.

De asemenea, au fost analizate cromatografic mai multe serii de produs finit, rezultatele fiind comparabile (figura 3).

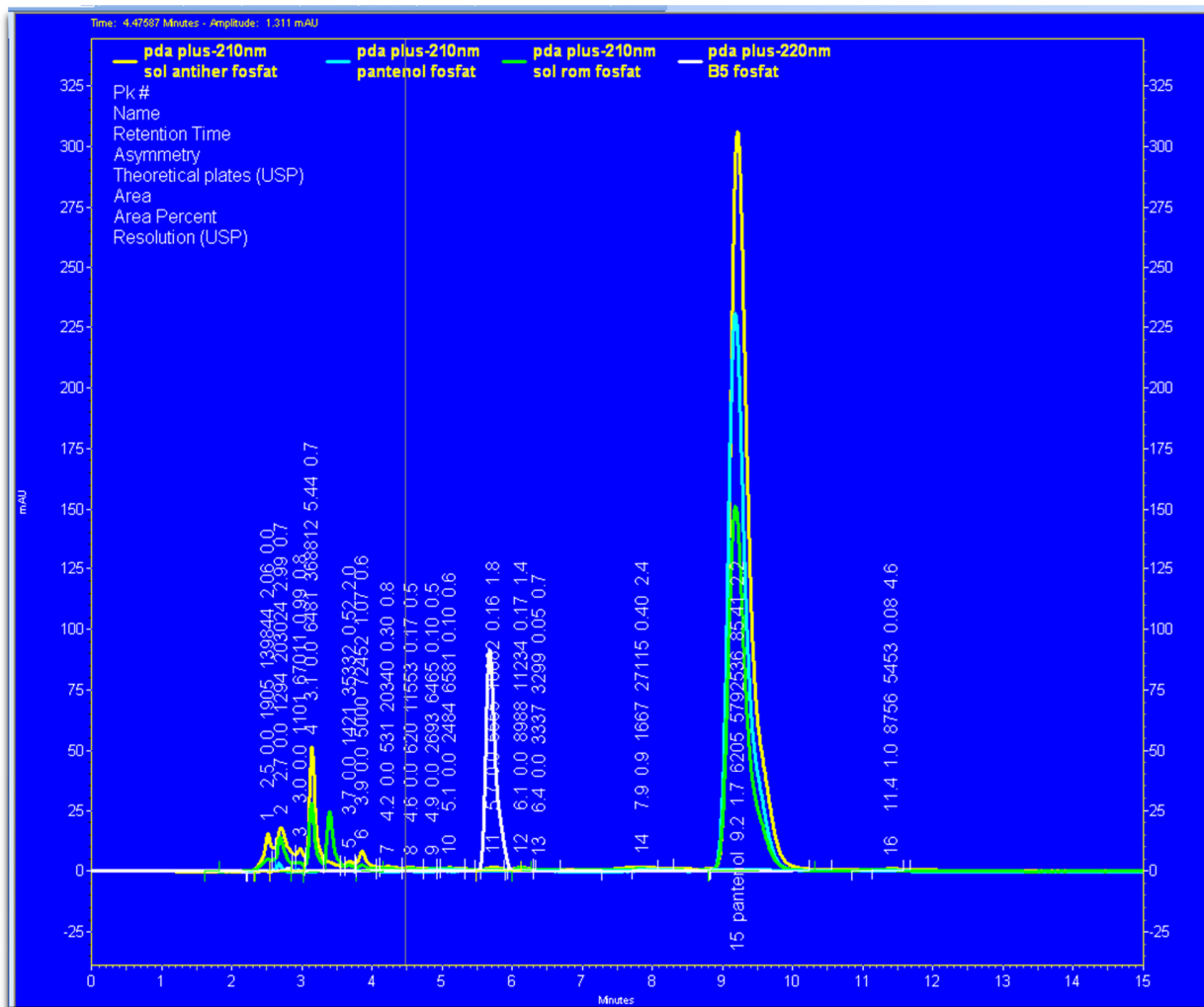


Figura 1. Comparatie între Solutia antiherpetică și substanța de referință D-Pantenol

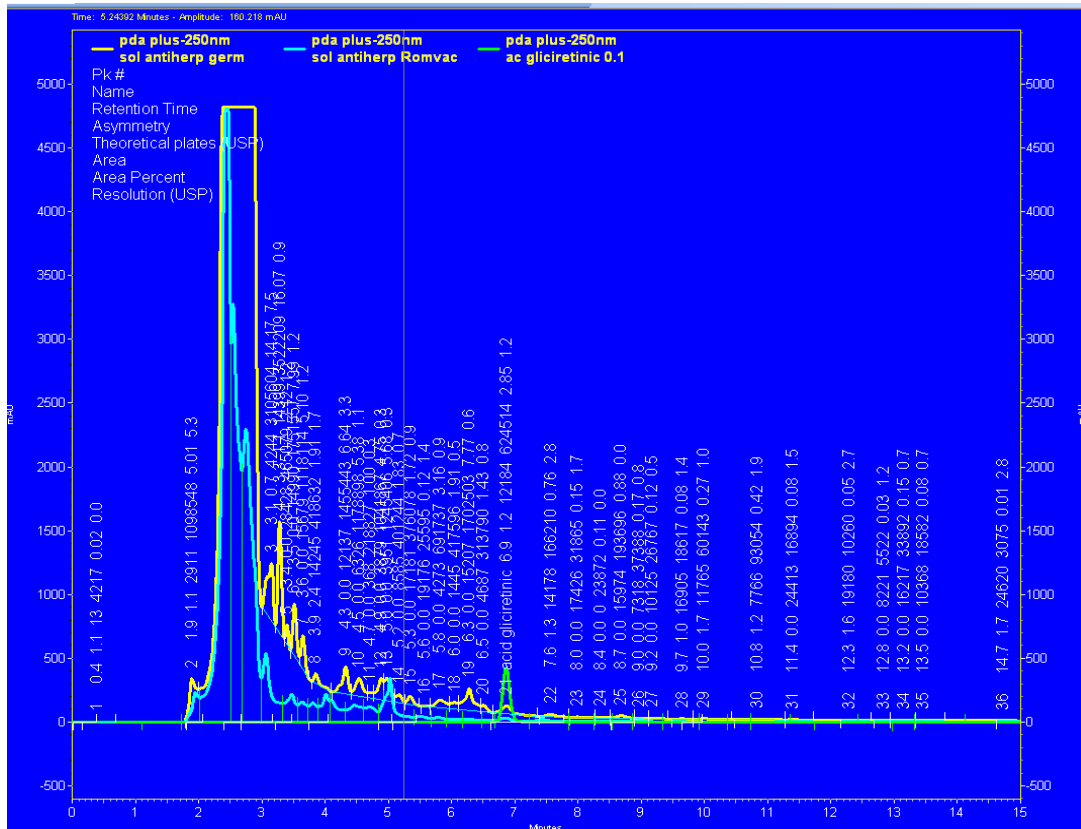
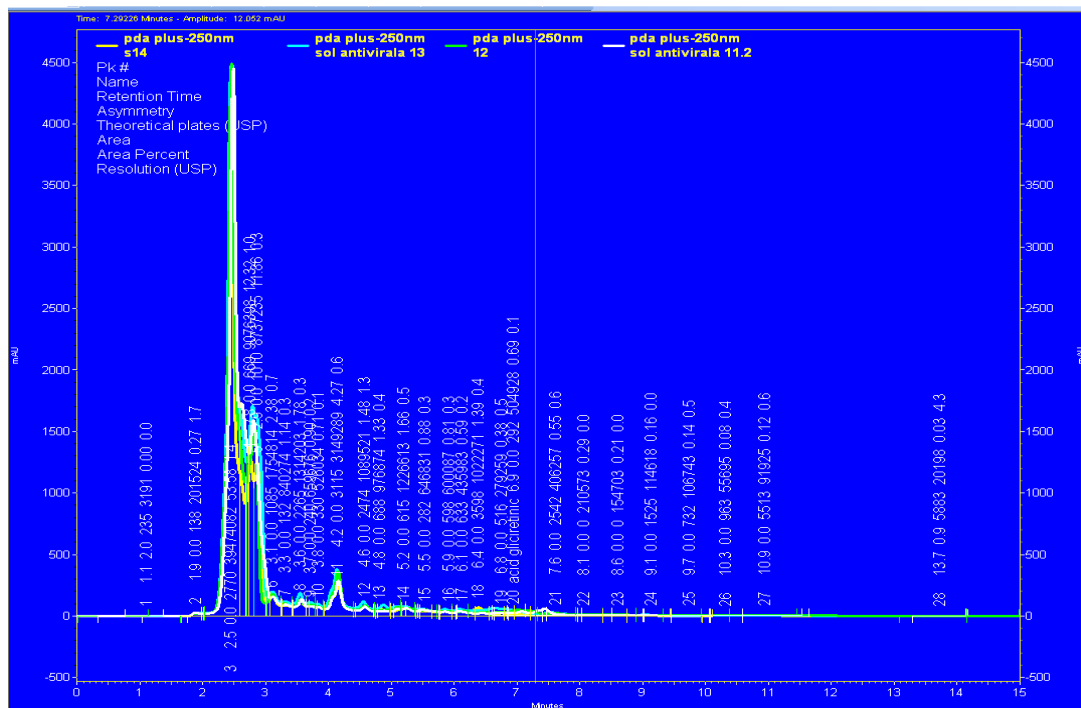


Figura 2. Comparatie între Solutia antiherpetica și substanța de referință Acid gliciretinic



3. Concluzii

A fost pusă la punct o metodă HPLC pentru determinarea pantenolului și acidului gliciretinic dintr-un supliment natural antiherpes.

Din studiul cromatogramelor substanțelor de referință și a celor corespunzătoare produsului finit, s-a demonstrat specificitatea metodei de analiză propusă.

De asemenea, analiza HPLC a seriilor succesive de produs finit a constituit un instrument de analiză sigur pentru reproductibilitatea procesului de fabricație.

Metoda HPLC de analiză a pantenol și acid gliciretinic a fost aplicată cu succes și pe un produs similar, aflat pe piață.

switching. *Journal of Liquid Chromatography*, **7(4)**, 823-837.

7. <http://en.wikipedia.org/wiki/Panthenol>
8. <http://en.wikipedia.org/wiki/Liquorice>
9. <http://agilent.com>
10. <http://dionex.com>

Bibliografie

1. **Andrisano V, Bonazzi D, Cavrini V** (1995). HPLC analysis of triterpenoides - applications to the quality control of pharmaceuticals. *Journal of pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **13**, 597-605.
2. **Sabbioni C, Ferranti A, Bugamelli F, Forti GC, Raggi MA** (2006). Simultaneous analysis, with isocratic elution, of glycyrrhizin and glycyrrhetic acid in liquorice roots and confectionary products. *Phytochem. Anal.*, **17(1)**, 25-31.
3. **Zhang Y, Cao J, Xiao S.** (2013). Simultaneous determination of glycyrrhizin and 15 flavonoids in liquorice and blood by high performance liquid chromatography with ultraviolet detector. *Analytical Chemistry*, **2013**.
4. **Spinks EA, Fenwick GR** (1990). The determination of glycyrrhizin in selected UK liquorice products. *Food additives and Contaminants*, **7(6)**, 769-778.
5. **Mao X, Hu X, Pan W** (2010). Simultaneous determination of pantothenic acid and D panthenol in cosmetics by high performance liquid chromatography. *SePu*, **28(11)**, 1061-1066.
6. **Franks TJ, Stodola JD** (1984). A reverse phase HPLC assay for the determination of calcium pantothenate utilizing column