

VÝBER ROZPŮŠŤADLA PRE EXTRAKCIU PANTENOLU ZO VZORIEK TELOVÝCH MLIEK

BARBORA ŠIMKOVÁ, KATARÍNA HROBOŇOVÁ
a ANDREA ŠPAČKOVÁ

Slovenská technická univerzita v Bratislave, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Ústav analytickej chémie, Radlinského 9, 812 37, Bratislava
xsimkova@stuba.sk, katarina.hrobonova@stuba.sk

Kľúčové slová: D-pantenol, extrakcia v systéme kvapalina-kvapalina, extrakcia tuhou fázou, HPLC

• <https://doi.org/10.54779/ccsss20220340>

Úvod

D-pantenol-((2*R*)-2,4-dihydroxy-*N*-(3-hydroxypropyl)-3,3-dimetylbutanamid; dexpanthenol) je vďaka svojim priaznivým účinkom dôležitou biologicky aktívnou zložkou farmaceutických výrobkov (lieky, výživové doplnky, atď.) a kozmetických výrobkov (telové mlieka, šampóny, kondicionéry, atď.) na ošetrovanie pokožky, na zmiernenie svrbenia alebo na podporu hojenia rán¹. Obsah D-pantenolu v kozmetických výrobkoch určených na telo, ako napr. telové mlieka, krémy, býva maximálne do 5,3 % (cit.²).

Kozmetické výrobky, napr. krémy, telové mlieka, sú mnohózložkové zmesi, ktoré okrem účinných látok obsahujú ďalšie zložky, napr. konzervačné látky (parabény), parafíny a minerálne oleje, glykoly, vonné látky vo forme prírodných alebo syntetických prídavných látok. Z hľadiska chemickej analýzy sú to zložité vzorky a pri chromatografickej analýze môžu negatívne ovplyvniť výsledok separácie a stanovenia cieľovej látky (môže napr. dochádzať ku koelúcii matricových zložiek a sledovaných analytov). Takéto vzorky je potrebné pred analýzou upravovať, napr. použitím extrakčných techník, ktorých cieľom je čo najúčinnejšie izolovať alebo aj skoncentrovať analyt. Najčastejšie sa používa extrakcia analytu z komplexnej matrice v systéme kvapalina-kvapalina alebo tuhá fáza-kvapalina. Extrakcia v systéme kvapalina-kvapalina (LLE, liquid-liquid extraction) je proces oddeľovania látok pozostávajúci z prenosu rozpustenej látky z jedného rozpúšťadla do druhého, pričom tieto dve rozpúšťadlá sú navzájom nemiešateľné alebo čiastočne miešateľné. Extrakcia tuhou fázou (SPE, solid phase extraction) je extrakčný postup založený na zachytávaní analytov vhodným adsorbentom. Interferujúce látky sa odstránia z adsorbentu premývaním rozpúšťadlom a následne sa adsorbované analyty desorbujú pomocou vhodného elučného rozpúšťadla³⁻⁵. V prípade kozmetických výrobkov je vhodné kombinovať obe extrakčné techniky.

Cieľom práce je prešetriť vplyv zloženia extrakčného rozpúšťadla na výťažnosť LLE D-pantenolu zo vzoriek vybraných kozmetických výrobkov a zvoliť vhodný typ SPE adsorbentu na prečistenie extraktu pred HPLC analýzou.

Experimentálna časť

Chemikálie a vzorky

D-pantenol (98 %, Alfa Aesar), acetonitril (pre HPLC, Centralchem), *n*-hexán (pre HPLC, VWR Chemicals), chloroform (Mikrochem), etanol (pre HPLC, Merck), metanol (pre HPLC, VWR Chemicals), deionizovaná voda, 15% roztok hexakynoželeznanu draselného (Carrez I), 30% roztok síranu zinočnatého (Carrez II).

Vzorky mliek na opaľovanie a po opaľovaní sa zaošetrovali v obchodnej sieti drogérií a lekární (štyri vzorky od rôznych výrobcov). Pred analýzou boli uskladnené v pôvodnom obale na suchom a tmavom mieste pri laboratórnej teplote.

Postupy

Extrakcia v systéme kvapalina-kvapalina: Vzorka (0,2 g telového mlieka) sa zmiešala s extrakčným rozpúšťadlom (3 ml; zmes chloroform/voda a *n*-hexán/voda v pomeroch 1:3, 2:2, 3:1, v/v) a zmes sa miešala na laboratórnej miešačke (200 rpm) 10 min pri teplote 23 °C. Následne sa oddelila vodná vrstva. K vodnému podielu sa pridalo 0,2 ml roztoku Carrez I a 0,2 ml roztoku Carrez II, zmes sa premiešala a následne centrifugovala (10 min, 3000 rpm). Tekutina sa oddelila, prefiltrovala cez 0,45 µm nylonový filter a následne sa prečistila pomocou SPE a analyzovala pomocou HPLC.

Extrakcia tuhou fázou: SPE kolónka sa kondicionovala metanolom (2 ml) a vodou (2 ml), dávkoval sa roztok referenčnej látky D-pantenolu pre vyhodnotenie výťažnosti (0,5 ml, koncentrácia 1 mg ml⁻¹) alebo vodný podiel po LLE pre analýzu reálnych vzoriek. Kolónka sa vysušila vákuom (5 min) a analyt sa eluoval etanolom (1 ml). Extrakt sa dávkoval do HPLC kolóny. Testovali sa nasledujúce typy SPE kolóniek: C8 (100 mg, Chromabond), Sep-Pak C18 (200 mg, Waters), C18 Hydra (100 mg, Chromabond), HR-P (100 mg, Chromabond), HR-X (100 mg, Chromabond), Sep-Pak Aminopropyl-NH₂ (100 mg, Waters), Silica-CN (100 mg, Tessek).

HPLC analýza extraktov

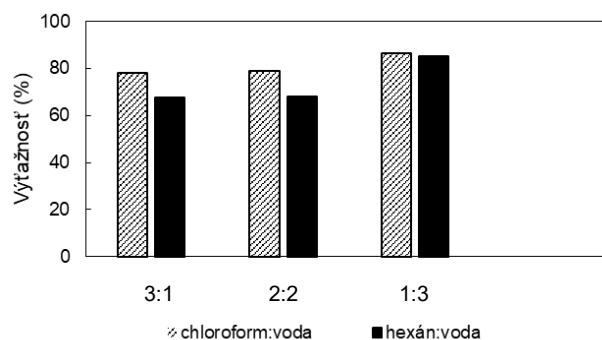
Na analýzu extraktov sa použila metóda HPLC s DAD detekciou. Separácia sa uskutočnila na kolóne typu

C18 (Nucleosil 100-5 C18 (125 × 4 mm, 5 μm)) s mobilnou fázou acetonitril:voda (10:90, v/v). Prietok mobilnej fázy bol 0,5 ml min⁻¹. Chromatogramy sa snímali pri vlnovej dĺžke 210 nm a UV spektrá sa snímali v rozsahu vlnových dĺžok 190–400 nm.

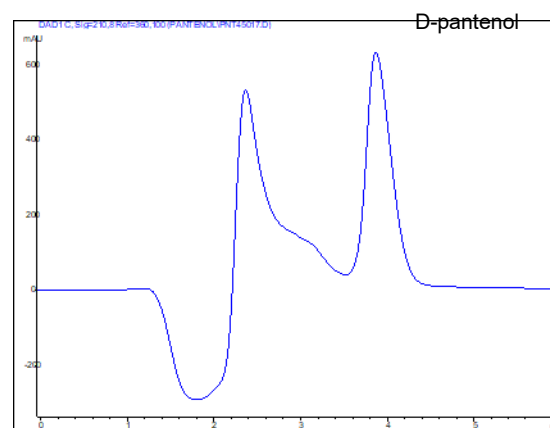
Výsledky a diskusia

Neexistuje univerzálne riešenie na prípravu vzoriek, pretože extrahované látky majú odlišné fyzikálno-chemické vlastnosti. Podmienky pre extrakciu cieľovej látky zo vzorky sa volia na základe zložitosti matrice a typu látky. Pre LLE D-pantenolu zo vzoriek telových mliek sa testovali ako extrakčné činidlá zmesi chloroform/voda a *n*-hexán/voda v rôznych pomeroch. Týmto spôsobom bolo možné oddeliť látky vo vode rozpustné zahrňujúce aj D-pantenol, od iných nerozpustných zložiek. Na vyčistenie extraktov sa použila zmes roztoku Carrez I a Carrez II. Z výsledkov hodnotenia vplyvu typu extrakčného rozpúšťadla na výťažnosť extrakcie vyplynulo, že ako vhodné rozpúšťadlo sa javí zmes chloroform/voda (1:3, v/v). Pre toto rozpúšťadlo sa dosiahla výťažnosť 86,6 % (testované pre telové mlieko s prídavkom D-pantenolu na koncentračnej hladine 1,5 mg g⁻¹). Porovnanie výťažností LLE v závislosti od typu a pomeru zložiek v extrakčnom rozpúšťadle je zobrazené na obr. 1.

Na prečistenie D-pantenolu od ďalších zložiek vo vodnom extrakte je vhodná SPE. Testovali sa viaceré typy SPE kolónok s adsorbentami s rozdielnou polaritou (typ C8, C18, NH₂, CN a polymérny typ HR-P a HR-X), avšak pre všetky bol vhodný mechanizmus sorpcie v systéme



Obr. 1. Výťažnosti LLE D-pantenolu použitím testovaných extrakčných rozpúšťadiel (RSD % menej ako 6 %, $n=3$, testované pre telové mlieko s prídavkom D-pantenolu na koncentračnej hladine 1,5 mg g⁻¹)



Obr. 2. Chromatografický záznam separácie D-pantenolu v extrakte vzorky mlieka na opaľovanie

Tabuľka I

Chromatografické charakteristiky a niektoré validačné parametre metódy

Chromatografické charakteristiky ^a	
t_R (min)	3,81 ± 0,07
RSD % (1 deň)	2,03
RSD % (3 dni)	1,73
k	0,69 ± 0,07
A	12123,60 ± 679,03
RSD % (1 deň)	0,23
RSD % (3 dni)	5,60
n	2298 ± 147
H (μm)	54
Validačné parametre	
Linearita (mg ml ⁻¹)	0,25-5,00
R^2	0,9991
LOD (mg ml ⁻¹)	0,04
LOQ (mg ml ⁻¹)	0,14

a – určené pre koncentračnú hladinu 0,2 mg ml⁻¹

s obrátenými fázami. Uspokojivá výťažnosť D-pantenolu (viac ako 85 %) sa dosiahla pri použití adsorbentu typu NH₂, ktorý sa zvolil ako najvhodnejší.

Pre extrakciu D-pantenolu z kozmetických vzoriek, ako sú telové mlieka, sa kombinovali obe techniky, LLE a následne SPE. Použitím najvhodnejších podmienok zistených v jednotlivých krokoch (chloroform/voda (1:3, v/v) pre LLE; adsorbent typu NH₂ pre SPE) sa dosiahla výťažnosť 79,7 % (RSD % menej ako 6 %, $n=3$, testované pre telové mlieko s prídavkom D-pantenolu na koncentračnej hladine 1,5 mg g⁻¹).

HPLC metóda v systéme s obrátenými fázami so spektrofotometrickou detekciou sa použila na analýzu extraktov. Celkový čas HPLC analýzy bol 6 min. Metóda bola hodnotená na základe parametrov vhodnosti HPLC podmienok (opakovateľnosť časov a plôch elučných vln, počet teoretických priehradiek, výškový ekvivalent teoretickej priehradky) a niektorých validačných parametrov (lineárny koncentračný rozsah, LOD, LOQ), ktoré sú uvedené v tab. I.

Zvolené podmienky extrakcie a HPLC separácie sa aplikovali pre analýzu vzoriek mliek na opaľovanie a po opaľovaní. Obr. 2 dokumentuje chromatografický záznam extraktu vzorky mlieka na opaľovanie. V testovaných vzorkách bol stanovený obsah D-pantenolu v rozsahu 0,2–1,5 %.

Záver

Práca sa zaoberala výberom vhodného rozpúšťadla na extrakciu D-pantenolu zo vzoriek opaľovacích mliek a výberom vhodného adsorbentu pre jeho prečistenie, prípadne aj skoncentrovanie. Zvolené podmienky extrakcie a HPLC stanovenia boli vhodné pre analýzu reálnych vzoriek s obsahom D-pantenolu. Navrhnuté extrakčné podmienky sa môžu využiť aj pre prípravu vzoriek mliek pre následnú chirálnu HPLC analýzu.

Práca bola finančne podporená grantom Vedeckej grantovej agentúry Ministerstva školstva Slovenskej republiky a Slovenskej akadémie vied (grant č. VEGA 1/0159/20).

LITERATÚRA

1. Bregnbak D., Johansen J. D., Zachariae C.: Contact Dermatitis. 75, 48, (2016).
2. *Safety Assessment of Panthenol, Pantothenic Acid, and Derivatives as Used in Cosmetics*. <http://www.cir-safety.org/sites/default/files/PANTS012017.pdf>, informácie získané 10. 3. 2022.
3. Abedi G., Talebpour Z., Jamechenarboo F.: TrAC Trends Anal. Chem. 102, 41 (2018).

4. Berk Z.: *Liquid-liquid extraction. Food process engineering and technology*. 3. vyd. Elsevier, Amsterdam 2018.
5. Labuda J., Špánik I., Tarapčík P., Hrouzková S., Vrábel V., Benická E., Hroboňová K., Sádecká J., Belnrohr E., Liptaj T.: *Analytická chémia*. STU, Bratislava 2019.

B. Šimková, K. Hroboňová, and A. Špačková (Slovak University of Technology in Bratislava, Faculty of Chemical and Food Technology, Institute of Analytical Chemistry, Bratislava): **The Choice of Solvent for the Extraction of D-panthenol from Samples of Body Milks**

The work dealt with the choice of a suitable solvent for extraction of D-panthenol from body milk samples and the choice of SPE adsorbent for its purification and pre-concentration. The suitable extraction and HPLC conditions were applied for analysis of body milks containing D-panthenol.

Keywords: D-panthenol, liquid-liquid extraction, solid-phase extraction, HPLC

● <https://doi.org/10.54779/ccsss20220340>

Acknowledgements

This work was financially supported by a grant from the Scientific Grant Agency of the Ministry of Education of the Slovak Republic and the Slovak Academy of Sciences (grant no. VEGA 1/0159/20).