

TECNICA HIGH PERFORMANCE THIN LAYER CHROMATOGRAPHY PER UN RAPIDO SCREENING QUALITATIVO DI PRODOTTI COSMETICI A BASE VEGETALE

Francesca Romana Gallo, Giuseppina Multari
Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

Le piante possono entrare nella composizione di molti prodotti commerciali la cui classificazione merceologica viene stabilita dal produttore che è l'unico responsabile. Molto spesso è la quantità di sostanza attiva che determina la collocazione merceologica. L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), nel *General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicines* per definire la qualità di una pianta o di un prodotto a base di piante (WHO/EDM/TRM/2000.1), ove altre tecniche da sole non sono sufficienti, prende in considerazione la possibilità di identificare una sostanza caratteristica o una miscela di sostanze tramite il *fingerprint*, definito come impronta digitale specifica della pianta. L'analisi tramite *fingerprint* è un valido metodo d'identificazione per le piante, soprattutto quando non sia possibile effettuare l'isolamento e il riconoscimento dei vari principi attivi (1-3). Il gran numero di molecole diverse, presenti negli estratti vegetali, rende la separazione cromatografica complessa sia come tempi di analisi che come rese dei vari costituenti.

Una tecnica rapida ed efficace per effettuare uno screening veloce di più campioni di piante dello stesso genere e specie e molto spesso anche di specie diverse, è la cromatografia su strato sottile ad alta prestazione (*High Performance Thin Layer Chromatography*, HPTLC). Mediante HPTLC è possibile identificare e ottenere una visione di insieme dei componenti la pianta con un *fingerprint* specifico e caratteristico per ogni singola specie vegetale (4,5).

Il *fingerprint* è la singola traccia che rappresenta, il più vicino possibile, la miscela di sostanze organiche prodotte da un organismo vivente. L'approccio tramite l'impronta digitale è un prodotto della filosofia metabolomica, è lo "studio di tante piccole molecole quanto possibile" che sono presenti in un sistema organico.

Piante utilizzate in cosmetica

Dal 2008 ad oggi nel Reparto Sostanze Naturali, Medicine Tradizionali del Dipartimento del Farmaco (Istituto Superiore di Sanità) oltre alle piante dotate di una attività farmacologica, sono state studiate piante che rientrano nella composizione degli integratori alimentari e dei cosmetici; tra queste: la *Lawsonia inermis*, l'*Arctostaphylos uva-ursi* e l'*Argania spinosa*.

La *Lawsonia inermis* L. (*Lythraceae*), comunemente conosciuta come henné, è una pianta originaria delle regioni dell'Africa centro-orientale, coltivata in diversi paesi. Da millenni viene usata per tingere capelli, unghie e per fare tatuaggi in varie parti del corpo. Contiene resine, tannini, glicosidi primari quali hennoside A, B e C il cui prodotto di idrolisi e di autossidazione

è il lawsone. La Commissione scientifica europea sui prodotti cosmetici e i prodotti non alimentari destinati ai consumatori (*Scientific Committee on Cosmetic Products and Non Food Products*, SCCNFP) con il documento SCCNFP/0798/04 fornisce una valutazione e caratterizzazione tossicologica del lawsone proponendo di inserirlo nella classe 2A delle sostanze pericolose (6), e con il documento SCCP/0943/05 mette in evidenza che la *Lawsonia inermis* non è presente ancora nell'allegato IV della Direttiva 76/768/EEC tra i coloranti che possono essere contenuti nei prodotti cosmetici, e che necessita ancora di ulteriori indagini per una valutazione sulla sicurezza d'uso (7). Per quanto riguarda la *Lawsonia inermis* utilizzata come colorante per capelli, con il documento SCCS/1511/13, si attesta la sua sicurezza d'uso per un contenuto massimo in lawsone pari all'1,4% (8). Con il termine henné vengono erroneamente indicate altre piante come la *Cassia* (*Cassia obovata* Collad.) e l'*Indigofera* (*Indigofera tinctoria* L.). Grazie alla tecnica del *fingerprint* e la lettura del relativo densitogramma (Figura 1) è stato possibile delineare il profilo chimico caratteristico della *Lawsonia* e distinguerlo da quello della *Cassia* e dell'*Indigofera* alle quali, per conferire poteri coloranti diversi, possono essere aggiunte sostanze di sintesi (9).

In Figura 1A viene riportata l'HPTLC eseguita su prodotti commerciali etichettati come henné (tracce 1-3) ma si evidenzia chiaramente che le tracce 2 e 3 non sono *Lawsonia* (Rif 1) bensì *Cassia* (Rif 2) con o senza aggiunta di un colorante, traccia 2 e 3 rispettivamente.

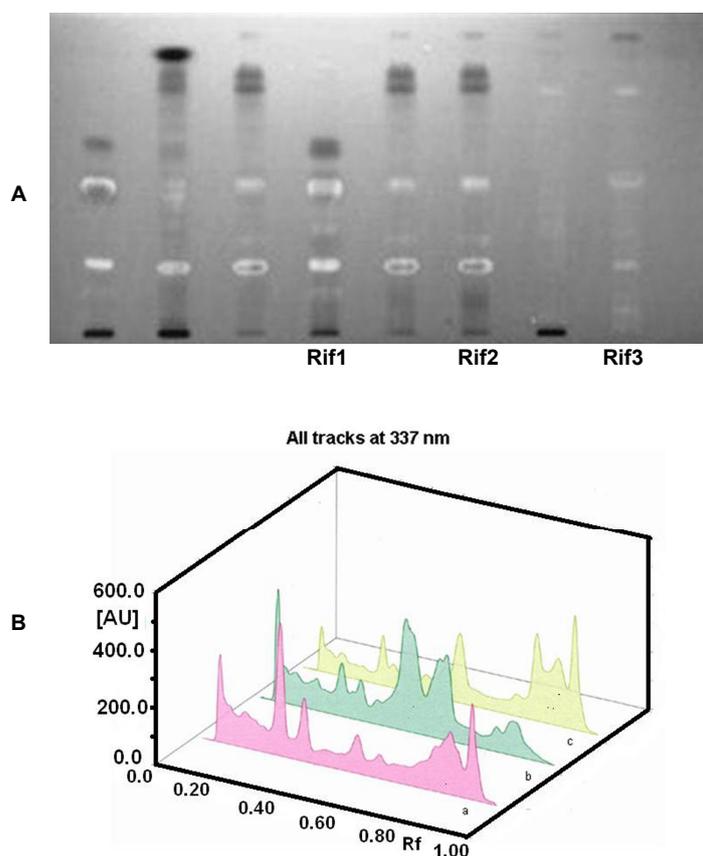


Figura 1. (A) HPTLC fingerprint di prodotti commerciali a base di *Lawsonia inermis* (Tracce 1, 2, 3), *Cassia obovata* (traccia 5) e *Indigofera tinctoria* (traccia 7) confrontate con le loro piante di riferimento Rif 1, Rif 2 e Rif 3; (B) visualizzazione tridimensionale dell'analisi densitometrica di *C. obovata*, (a) *L. inermis* (b) e *I. tinctoria* (c) di riferimento

L'*Arctostaphylos uva-ursi* L. (*Ericaceae*) è una pianta nativa della zona circumboreale, in particolare del Canada, del nord degli Stati Uniti, del Caucaso e della Siberia e delle zone montuose dell'Europa. La droga, costituita dalle foglie essiccate, contiene una grande quantità di composti fenolici di cui l'arbutina ($C_{12}H_{16}O_7$; 8-16%), glucoside dell'idrochinone ($C_6H_6O_2$). L'arbutina nell'industria cosmetica viene principalmente utilizzata come sbiancante naturale; ostacola la formazione del pigmento melanina inibendo l'attività della tirosinasi e protegge la pelle contro i danni causati dai radicali liberi. L'idrochinone è presente nella lista dell'annesso II del Regolamento (EU) 344/2013 delle sostanze proibite nella composizione dei prodotti cosmetici (10).

Tramite le analisi in HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) e HPTLC dello standard di *A. uva-ursi* è stato possibile delineare il profilo chimico dell'uva ursina e confrontarlo con i tracciati di campioni commerciali etichettati come uva ursina. I diversi cromatogrammi paragonati con quello standard hanno permesso di stabilire che non tutti i campioni appartenevano alla specie *uva-ursi* ma ad un'altra specie la *pungens*. Le analisi in HPLC-MS (*High Performance Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*) hanno identificato inequivocabilmente il picco relativo all'arbutina anche nei campioni di *A. pungens* sebbene fosse presente in minime quantità. Tali cromatogrammi evidenziavano un contenuto in arbutina inferiore al 2% e un contenuto maggiore in flavonoidi (11).

Tabella 1. Contenuto in arbutina presente in 16 campioni di foglie di "Bearberry" provenienti da diversi Paesi

Campione	Origine	Nome in etichetta	Arbutina (% peso/peso)
1	Macedonia	<i>Bearberry</i>	Non rilevabile
2	Non dichiarato	<i>Bearberry</i>	2,00±0,10
3	Non dichiarato	<i>Bearberry leaf</i>	11,38±0,06
4	Non dichiarato	<i>Bearberry leaf (tea)</i>	8,09±0,33
5	Messico	<i>Bearberry Uva-ursi</i>	0,80±0,10
6	America Latina	<i>Bearberry leaf (tea)</i>	0,43±0,03
7	Balceni	<i>Bearberry leaf</i>	9,55±0,01
8	Messico	<i>Bearberry glauca leaf (tea)</i>	0,64±0,03
9	Albania	<i>Bearberry leaf</i>	11,59±0,02
10	Siberia	<i>Bearberry leaf</i>	15,29±0,06
11	Messico	<i>Bearberry leaf (tea)</i>	0,61±0,01
12	Albania	<i>Bearberry officinal (tea)</i>	12,45±0,04
13	Macedonia	<i>Bearberry officinal (tea)</i>	7,65±0,07
14	Macedonia	<i>Bearberry leaf (tea)</i>	10,48±0,04
15	Messico	<i>Bearberry leaf (tea)</i>	0,34±0,01
16	Serbia	<i>Bearberry leaf (tea)</i>	16,93±0,07

L'*Argania spinosa* L. (*Sapotaceae*) volgarmente chiamato albero di argan, per secoli cresciuto nelle vallate del nord Africa, ora è presente esclusivamente nel sud-ovest del Marocco in seguito ad un disboscamento sconsiderato, per sfruttarne i legni pregiati o per ottenere terra coltivabile. Solo nel 1996 l'UNESCO (Organizzazione delle Nazioni Unite per l'Educazione, la Scienza e la Cultura) ha dichiarato l'albero di argan patrimonio dell'umanità salvandolo dalla definitiva estinzione.

Il pregiatissimo olio di argan è ottenuto dalla spremitura a freddo del seme macinato, privato del guscio, in cosmetica viene utilizzato come emolliente (12). Mediante il metodo del *fingerprint* messo a punto nel nostro laboratorio è stata caratterizzata la sequenza dei trigliceridi e sono stati analizzati alcuni campioni commerciali di creme e oli a base di olio di Argan. La qualità di tali campioni è stata valutata tramite il confronto con il *fingerprint* dell'olio puro.

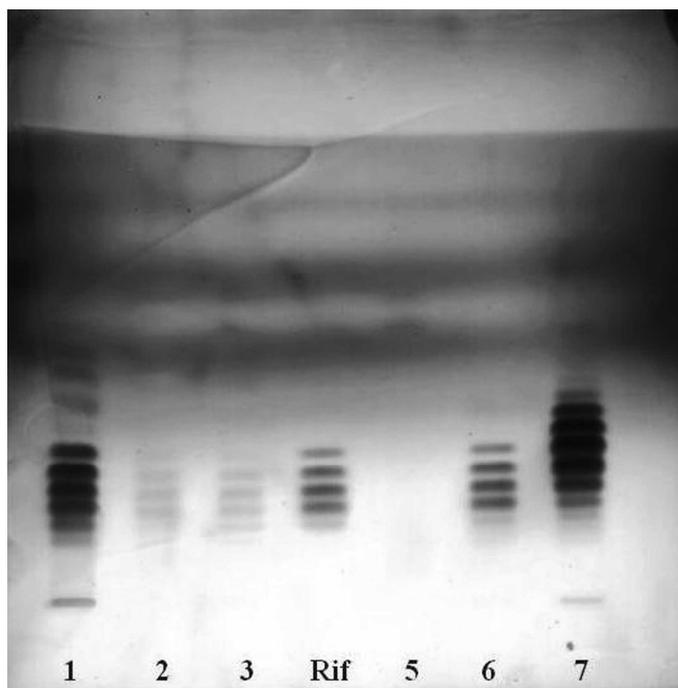


Figura 2. HPTLC della frazione lipidica estratta in esano da creme a base di Argan in confronto con un campione di olio di argan di riferimento

Nel Reparto Sostanze Naturali, Medicine Tradizionali, sono in corso studi in HPTLC per caratterizzare chimicamente la composizione della polpa del frutto attualmente impiegata come foraggio per gli animali.

Conclusioni

Le tecniche quali-quantitative ufficialmente riconosciute, come quelle di Farmacopea, unite a tecniche identificative quali il *fingerprint* in HPTLC e HPLC, forniscono un valido aiuto per uno screening di qualità veloce di piante e loro prodotti commerciali derivati.

Con la metodica del *fingerprint* è possibile individuare eventuali adulterazioni in tali prodotti mediante il semplice confronto del loro tracciato cromatografico con quello standardizzato della pianta di riferimento.

Bibliografia

1. WHO. *General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine. Assessment of quality*. Geneva: World Health Organization; 2000. (WHO/EDM/TRM/2000.1).
2. Nicoletti M, Petitto V, Gallo FR, Multari G, Federici E, Palazzino G. The modern analytical determination of botanicals and similar novel natural products by the HPTLC fingerprint approach. In: Atta-ur-Rahman Frs (Ed.). *Studies in natural product chemistry*. Oxford: Elsevier; 2012. p. 217-75.

3. Reich E, Schibli A. *High-Performance Thin-Layer Chromatography for the analysis of medicinal plants*. New York: Thieme; 2006.
4. Pereira CAM, Yariwake JH, Lancas FM, Wauters JN, Tits M, Angenot L. A HPTLC densitometric determination of flavonoids from *Passiflora alata*, *P. edulis*, *P. incarnata* and *P. caerulea* and comparison with HPLC method. *Phytochem Anal* 2004;15:241-8.
5. Srivastava A, Misra H, Verma RK, Gupta MM. Chemical fingerprinting of *Andrographis paniculata* using HPLC, HPTLC and densitometry. *Phytochem Anal* 2004;15:280-5.
6. Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products Intended for Consumers. *Opinion concerning Lawsone Colipa n. C146*. Brussels: SCCNFP; 2004. (SCCNFP/0798). Disponibile all'indirizzo: http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/sccp/documents/out254_en.pdf; ultima consultazione 08/01/14.
7. Scientific Committee on Consumer Products. *Opinion on Lawsonia inermis (Henna) Colipa n. C169.*, Brussels: SCCP; 2005. (SCCP/0943./05). Disponibile all'indirizzo: http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_034.pdf; ultima consultazione 08/01/14.
8. Scientific Committee on Consumer Safety. *Opinion on Lawsonia inermis (Henna) Colipa n. C169*, Brussels: SCCNFP; 2013. (SCCS/1511). Disponibile all'indirizzo: http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_140.pdf; ultima consultazione 08/01/14.
9. Gallo FR, Multari G, Giambenedetti M, Federici E. Chemical fingerprinting of *Lawsonia inermis* L. using HPLC and HPTLC and densitometry. *Phytochem Anal* 2008;19:550-9.
10. Europe. Regulation (EU) No 344/201 of 4 April 2013 amending Annexes II, III, V and VI to Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council on cosmetic products. *Official Journal of the European Union* L 114/1 del 25.4.2013.
11. Gallo FR, Multari G, Panusa A, Pagliuca G, Palazzino G, Giambenedetti M, Petitto V, Nicoletti M. Bearberry identification by a multidisciplinary study on commercial raw materials. *Nat Prod Res* 2013;27(8):735-42.
12. Charrouf Z, Guillaume D. Phenols and Polyphenols of *Argania spinosa*. *Am J Food Technol* 2007;2(7):679-83.