

METODO RP-HPLC PER LA DETERMINAZIONE SIMULTANEA DI 24 ALLERGENI IN PRODOTTI COSMETICI PROFUMATI

Carla Villa, Raffaella Gambaro, Stefano Dorato, Emilia Mariani

Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi di Genova,

Viale Benedetto XV, 3 - I - 16132 Genova – Italy

Riassunto

La legislazione europea in materia di prodotti cosmetici ha recentemente stabilito che deve essere dichiarata in etichetta l'eventuale presenza di 26 fragranze (24 composti chimici volatili e due estratti naturali) quando queste superano una certa concentrazione.

In questo lavoro viene riportato un metodo RP-HPLC con rivelazione UV-DAD per la determinazione simultanea dei 24 composti volatili. Il metodo è stato applicato all'analisi di quattro prodotti commerciali profumati.

Introduzione

Il “profumo” fa parte della nostra vita quotidiana. Le fragranze sono presenti in tutti i prodotti di largo consumo ed in particolare, nei prodotti cosmetici, si stima che più di 3000 fragranze, tra composti chimici odorosi e oli essenziali siano impiegati con diverse funzioni.

In questo settore, a causa di episodi di dermatiti allergiche da contatto associati all'utilizzo di prodotti profumati, il comitato scientifico SCCNFP (Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products), oggi SCCP (Scientific Committee on Consumer Products), ha identificato 26 ingredienti impiegati come fragranze, 24 composti chimici volatili e 2 estratti naturali (oak moss and treemoss), per i quali è necessario fornire al consumatore informazioni circa la possibile presenza nei prodotti cosmetici ed imporne determinate condizioni d'uso¹⁻².

Sulla base di queste indicazioni recentemente la Legislazione Europea, con la VII modifica, ha introdotto nuove norme in materia di etichettatura per quanto riguarda i profumi. In particolare l'emendamento stabilisce l'obbligo di indicare in etichetta ognuna delle 26 fragranze considerate allergizzanti, oltre al termine generico *profumo*, qualora la concentrazione di tali sostanze superi i seguenti valori: 0.001% (pari a 10 ppm) in prodotti che non vengono risciacquati (“*leave-on products*”) e 0.01% (pari a 100 ppm) in prodotti destinati ad essere risciacquati (“*rinse-off products*”).

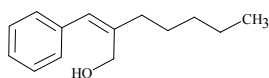
Questa problematica ha reso di attuale e crescente interesse avere a disposizione metodiche analitiche semplici ed efficienti per lo studio di composti profumati odorosi.

Scopo di questo lavoro è stato quindi la messa a punto di un metodo HPLC semplice, selettivo ed affidabile per la determinazione simultanea dei 24 allergeni volatili indicati dalla legislazione (escludendo i due estratti naturali) da applicare allo studio di oli essenziali e prodotti finiti per uso topico. La scelta è ricaduta su questa tecnica cromatografia per la sua semplicità, diffuso utilizzo nella maggior parte dei laboratori per le analisi di routine ed applicabilità anche a matrici molto complesse⁶⁻⁷. A nostra conoscenza, fino ad oggi, questa metodica non è stata applicata per l'analisi simultanea di fragranze e, in letteratura, tutti gli studi riguardanti le sostanze in esame si riferiscono principalmente all'analisi gascromatografica accoppiata a spettrometria di massa (GC-MS)⁴⁻⁵.

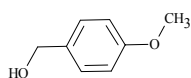
I composti allo studio appartengono a diverse classi chimiche: alcoli (amylcinnamyl alcohol, anisyl alcohol, benzyl alcohol, cinnamyl alcohol, citronellol, farnesol, geraniol, linalool), composti carbonilici (amyl cinnamal, cinnamal, citral, hydroxy-citronellal, hexyl cinnamal, α -isomethylionone, lilial[®], lylal[®]), esteri e lattoni (benzyl benzoate, benzyl cinnamate, benzyl salicylate, coumarin and methyl-octinoate), fenoli (eugenol and isoeugenol) ed un idrocarburo ciclico (d-limonene) (Tabella 1).

Lo studio analitico ha previsto l'utilizzo di una semplice miscela binaria di eluizione (acetonitrile e acqua) e rivelazione UV mediante Diode Array Detector (DAD). Questo tipo di rivelatore permette di ottimizzare le diverse lunghezze d'onda di acquisizione, di fissare riferimenti spettrali durante lo sviluppo del metodo e di confermare l'identità e la purezza dei picchi in analisi. L'analisi quantitativa è stata condotta utilizzando il metodo dello standard interno (*p*-anisaldehide).

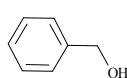
La metodica sviluppata è stata quindi applicata all'analisi di quattro prodotti commerciali: una crema idratante per il corpo, un balsamo per capelli, un olio da massaggio cosmetico e una miscela di oli essenziali per uso topico, commercializzata come repellente per insetti.



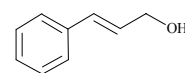
Amylcinnamyl alcohol
(CAS: 101-85-9)



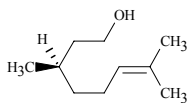
Anisyl alcohol
(CAS: 105-13-5)



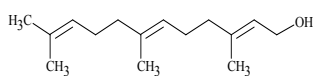
Benzyl alcohol
(CAS: 100-51-6)



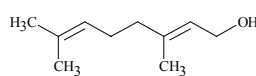
Cinnamyl alcohol
(CAS: 104-54-1)



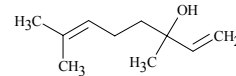
Citronellol
(CAS: 106-22-9)



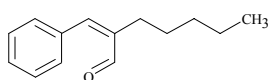
Farnesol
(CAS: 4602-84-0)



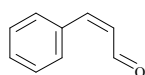
Geraniol
(CAS: 106-24-1)



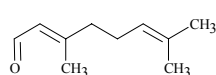
Linalool
(CAS: 78-70-6)



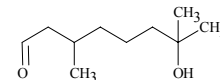
Amyl cinnamal
(CAS: 122-40-7)



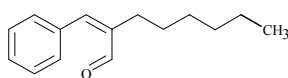
Cinnamal
(CAS: 104-55-2)



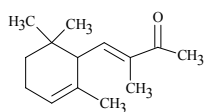
Citral
(CAS: 5392-40-5)



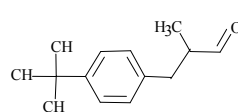
Hydroxy-citronellal
(CAS: 107-75-5)



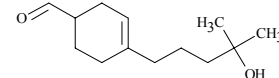
Hexyl cinnamal
(CAS: 101-86-0)



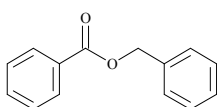
3-Methyl-4-(2,6,6-trimethyl-2-cyclohexen-1-yl)-3-buten-2-one
(CAS: 101-86-0)



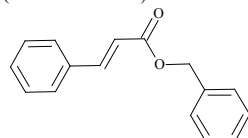
2-(4-tert-butylbenzyl)propionaldehyde (Lilial®)
(CAS: 80-54-6)



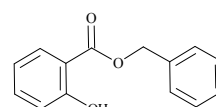
Hydroxy-isoheptyl-3-cyclohexene carboxaldehyde (Lyrall®)
(CAS: 31906-04-4)



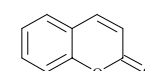
Benzyl benzoate
(CAS: 120-51-4)



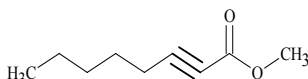
Benzyl cinnamate
(CAS: 103-41-3)



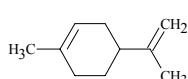
Benzyl salicylate
(CAS: 118-58-1)



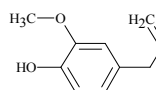
Coumarin
(CAS: 91-64-5)



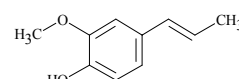
Methylheptin carbonate
(CAS: 111-12-6)



d-Limonene
(CAS: 5989-27-5)



Eugenol
(CAS: 97-53-0)



Isoeugenol
(CAS: 97-54-1)

Parte Sperimentale

Materiali

Esano, etanolo e acetonitrile di grado gradiente per HPLC sono stati forniti da Merck (Darmstadt, Germany). Gli standard degli allergeni sono stati ottenuti da Accustandard Inc. (New Haven USA). Lo standard interno è stato fornito da Aldrich Chimica (Milano, Italy). L'acqua è stata bidistillata e filtrata su filtri di cellulosa rigenerata con dimensione dei pori 0.45 μm (Seitz-Filter-Werke, Germany). I filtri Anotop 10 mm con pori da 0.2 μm utilizzati per il filtraggio preliminare all'analisi di tutti i campioni sono stati forniti da Merck, (Darmstadt, Germany.)

Metodo

Soluzioni standard

Le soluzioni madre di ciascuno dei 24 allergeni selezionati e dello standard interno sono state preparate in matraccio tarato a concentrazioni di 1.00 - 1.05 mg/ml in acetonitrile ad eccezione della soluzione di hydroxy-citronellal (10.0 mg/ml).

Le soluzioni sono state utilizzate ad opportune diluizioni, singolarmente ed in miscela per l'acquisizione degli spettri UV, per la messa a punto del metodo cromatografico e per la costruzione delle curve di calibrazione.

Strumento e condizioni operative

E' stato impiegato un sistema cromatografico ad alta risoluzione Hewlett-Packard 1100 composto da una pompa quaternaria, un degasatore sottovuoto in continuo, un iniettore manuale Rheodyne 7125 (20µl volume d'iniezione) e un HP UV-Vis Diode Array Detector (DAD). La separazione cromatografica in fase inversa è stata ottenuta utilizzando una colonna cromatografica C18 Merck LiChroCART Purospher Star RP-18-e (250mm × 4.6mm × 5µm) accoppiata con una precolonna Merck LiChroCART 4-4 LiChrospher 100 RP-18 (5µm) e un'eluizione a gradiente di acetonitrile / acqua (da 50:50 a 90 :10 in 40 minuti) con gradiente di flusso (da 0.7 ml/min a 1.0 ml/min).

Un software HP ChemStation interfacciato al sistema cromatografico è stato impiegato per l'acquisizione e l'elaborazione dei dati.

Il DAD è stato monitorato in un intervallo di lunghezze d'onda da 190 a 500 nm, e l'acquisizione cromatografica è stata settata a tre differenti lunghezze d'onda (210, 238 e 280 nm), vicine alle λ_{max} di tutti gli allergeni studiati, grazie alla capacità multisegnale del DAD.

Identificazione e dosaggio

L'identificazione dei 24 allergeni in miscela è stata condotta per paragone dei tempi di ritenzione (R_t) e degli spettri d'assorbimento UV ottenuti dall'acquisizione cromatografica dei relativi standard. In Figura 1 viene riportato, come esempio, il tipico cromatogramma della miscela registrato a 210 nm e in Tabella 2 sono riportati tutti gli $R_t \pm SD$ relativi all'analisi della miscela di allergeni .

L'analisi quantitativa è stata condotta mediante il metodo dello standard interno. Per ciascun analita è stata costruita una curva di calibrazione a cinque punti (ogni punto rappresenta la media di cinque determinazioni) ottenuta mediante analisi di regressione lineare, con coefficienti di correlazione (r^2) superiori a 0.99/1. Il limite di rilevabilità (LOD) e' stato determinato attraverso soluzioni diluite di ciascuno standard, sulla base di un rapporto segnale /rumore superiore a tre (Tabella 2).

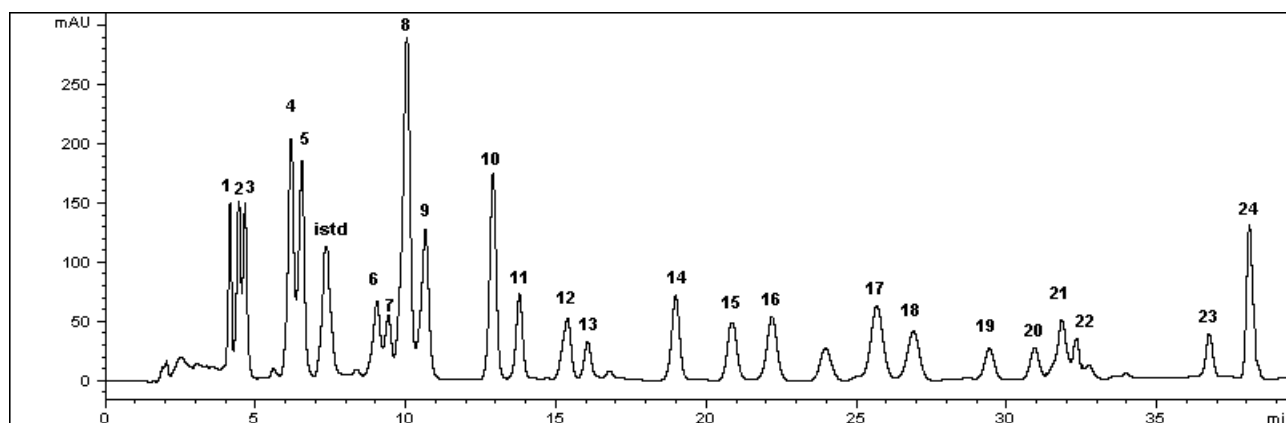
Tabella 2 - Analisi cromatografica della miscela standard contenente i 24 allergeni e lo standard interno:

Tempi di ritenzione (Rt) \pm deviazione standard (SD) e limite di rilevabilità (LOD).

Composto	Picco (Fig. 1)	Rt \pm SD ^a	LOD (μ g/ml)
Hydroxy-citronellal	1	4.28 \pm 0.02	10.88
Anisyl alcohol	2	4.56 \pm 0.02	0.13
Benzyl alcohol	3	4.70 \pm 0.07	0.09
Cinnamyl alcohol	4	6.43 \pm 0.04	0.05
Coumarin	5	6.77 \pm 0.05	0.07
Cinnamal	6	9.37 \pm 0.08	0.06
Lyral [®]	7	9.84 \pm 0.07	1.89
Eugenol	8	10.44 \pm 0.08	0.11
Isoeugenol	9	11.06 \pm 0.09	0.10
Geraniol	10	13.29 \pm 0.08	0.21
Linalool	11	14.15 \pm 0.08	0.68
Citronellol	12	15.75 \pm 0.08	0.71
Citral	13	16.47 \pm 0.06	0.07
Methylheptin carbonate	14	19.45 \pm 0.08	0.37
Amylcinnamyl alcohol	15	21.38 \pm 0.10	0.22
Benzyl benzoate	16	22.73 \pm 0.10	0.34
Benzyl salicylate	17	26.28 \pm 0.12	0.17
Benzyl cinnamate	18	27.46 \pm 0.12	0.25
Lilial [®]	19	29.82 \pm 0.08	1.68
Farnesol	20	31.26 \pm 0.07	0.74
Cetone Alpha	21	32.20 \pm 0.08	0.12
Amyl cinnamal	22	32.58 \pm 0.06	0.02
Hexyl cinnamal	23	36.90 \pm 0.09	0.03
d-Limonene	24	38.17 \pm 0.02	0.48
p-anisaldheyde	istd	7.62 \pm 0.07	0.05

^a I valori rappresentano media di cinque determinazioni

Figura 1 – Tipico cromatogramma della miscela dei 24 standard addizionata di standard interno acquisita a 210nm (Tabella 2)



Il metodo cromatografico messo a punto è stato applicato all'analisi di quattro prodotti commerciali rappresentativi **A – D**.

A - Crema idratante per il corpo (emulsione O/A) contenente i seguenti ingredienti (INCI name):

Aqua, paraffinum liquidum, myristyl alcohol, glycerin, butylene glycol, alcohol denat., stearic acid, myristyl myristate, cera microcristallina, glyceryl stearate, hydrogenate coco-glycerides, dimethicone, *Simmondsia chinensis*, tocopheryl acetate, polyglyceryl-2 caprate, sodium carbomer, phenoxyethanol, lanolin alcohol, methyl paraben, butyl paraben, ethyl paraben, isobutyl paraben, propyl paraben, parfum, linalool, citronellol, alpha-isomethyl ionone, butylphenyl methylpropional, limonene, benzyl salicylate.

B - Balsamo per capelli (emulsione O/A) contenente i seguenti ingredienti (INCI name):

Aqua, cetearyl alcohol, dimethiconol, cetrimonium chloride, paraffin, glyceryl stearate, parfum, amyl cinnamal, butylphenyl methylpropional, geraniol, hexyl cinnamal, limonene, linalool, citric acid, TEA-dodecylbenzenesulphonate, hydrolysed keratin, phenoxyethanol, sodium hydroxide.

C – Olio da massaggio cosmetico contenente oli essenziali da *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, *Geranium*, *Mentha piperita*, in olio di nocciolo.

D – Repellente per insetti ad uso topico composto da una miscela di oli essenziali da *Lavandula angustifolia*, *Cymbopogon nardus*, *Geranium*, *Mentha piperita*.

Preparazione dei campioni

Campioni A e B

Una quantità accuratamente pesata di ciascun campione (1.0g circa) è stata dispersa in 6 ml di acetonitrile e sonicata per 15 minuti. La sospensione ottenuta è stata filtrata mediante filtro a membrana in nylon con pori da 0.2µm. Dopo addizione dello standard interno la soluzione è stata portata a volume (10ml) con acetonitrile e direttamente iniettata.

Campioni C e D

Una quantità accuratamente pesata di ciascun campione (da 100mg a 400mg) è stata addizionata di una quantità nota standard interno (100µl), diluita in matraccio tarato (10ml) con acetonitrile e direttamente processata per HPLC.

Analisi dei campioni A - D

I campioni sono stati processati utilizzando le stesse condizioni cromatografiche utilizzate per lo studio della miscela standard degli allergeni, acquisendo i cromatogrammi a 210, 238 e 280 nm. L'identificazione delle fragranze presenti in tutti i campioni è stata condotta per paragone dei tempi di ritenzione (Rt) e degli spettri d'assorbimento UV ottenuti dall'acquisizione cromatografica dei relativi standard. L'analisi quantitativa è stata condotta mediante il metodo dello standard interno.

Come esempio viene riportato il tipico cromatogramma del campione **B** acquisito a 210nm (Figura 2) e in Tabella 3 i dati relativi all'analisi quantitativa dello stesso campione.

Figura 2 - Tipico cromatogramma relativo all'analisi del campione **B** acquisita a 210 nm .

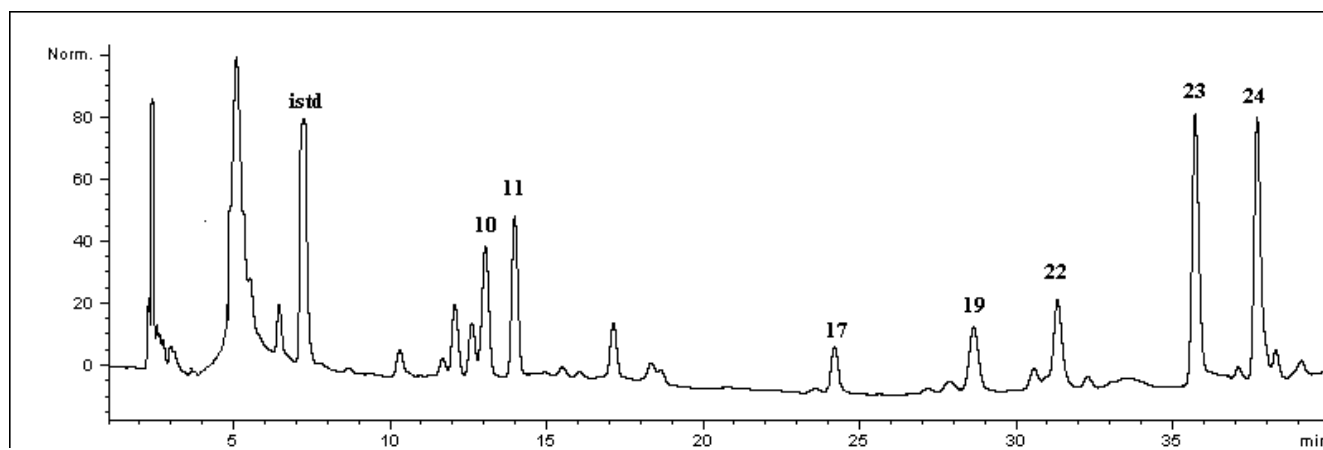


Tabella 3 – Analisi quali-quantitativa del campione **B**

Composto	Picco (fig. 2)	Quantità* (%) ± SD	RSD (%)
Geraniol	10	$1.08 \times 10^{-2} \pm 0.70 \times 10^{-3}$	6.48
Linalool	11	$3.74 \times 10^{-2} \pm 0.62 \times 10^{-3}$	1.66
Benzyl salicylate	17	$4.36 \times 10^{-3} \pm 0.27 \times 10^{-3}$	6.21
Lilial®	19	$1.08 \times 10^{-2} \pm 0.11 \times 10^{-3}$	1.01
d-Limonene	24	$5.66 \times 10^{-2} \pm 0.85 \times 10^{-3}$	1.50
Amyl cinnamal	22	$6.19 \times 10^{-2} \pm 0.76 \times 10^{-3}$	1.22
Hexyl cinnamal	23	$3.56 \times 10^{-2} \pm 0.76 \times 10^{-3}$	2.13

* media di cinque determinazioni

Risultati e discussione

Come risulta evidente dalla figura 1, nelle condizioni cromatografiche descritte, tutti i 24 analiti sono stati opportunamente separati in meno di 40 minuti; non sono presenti coppie critiche di rilievo e la *p*-anisaldeide, usata come standard interno, non interferisce con l'eluizione di alcun analita. I dati riportati in Tabella 2 indicano buoni valori di precisione (SD) e la LOD si colloca in un range di concentrazioni da 0.013 µg/ml a 0.746 µg/ml per tutti i composti eccetto che per tre allergeni sintetici: lyral® (1.89 µg/ml), lilial® (1.68 µg/ml) e hydroxy-citronellal (10.88 µg/ml).

Per quanto riguarda lo studio dei prodotti commerciali, nel campione **A** sono stati determinati sei allergeni: benzyl salicylate, butylphenyl methylpropional (lilial[®]), cetone alpha, citronellol, d-limonene, linalool. Nel campione **B** sono risultati presenti amyl cinnamal, benzyl salicylate, butylphenyl methylpropional (lilial[®]), geraniol, hexyl cinnamal, limonene, linalool.

L'analisi del campione **C** ha identificato cinque allergeni: benzyl benzoate, citral, citronellol, geraniol, linalool, mentre nel campione **D** sono stati identificati citral, citronellol, coumarin, eugenol, geraniol, linalool.

Dall'analisi quantitativa del campione **B** (Tabella 3) risulta che tutti gli allergeni riportati in etichetta (amyl cinnamal, butylphenyl methylpropional, geraniol, hexyl cinnamal, limonene, linalool) sono presenti in concentrazioni da $1.08 \times 10^{-2} \%$ a $3.19 \times 10^{-2} \%$. E' stato inoltre identificato il benzyl salicylate (non presente in etichetta) alla percentuale di $4.36 \times 10^{-3} \%$; questo non e' in contrasto con quanto dichiarato in quanto, secondo la legge, questa percentuale permette di ometterne la dicitura (*rinse-off* product - concentrazione superiore allo 0.001%).

Conclusioni

Il metodo HPLC messo a punto ha permesso un'efficiente separazione cromatografica e determinazione quantitativa delle 24 fragranze considerate allergeni. I risultati ottenuti dall'analisi dei prodotti commerciali, sembrano indicare una buona selettività e affidabilità della procedura analitica. La metodica proposta può quindi essere considerata di interesse nelle analisi di routine per lo studio diretto di queste fragranze in matrici complesse.

Bibliografia

- [1] Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food products intended for Consumers (1999) 'Opinion concerning Fragrance Allergy in Consumers. A review of the problem. Analysis of the need for appropriate consumer information and identification of consumer allergens'. Adopted by the SCCNFP during the plenary session of 8 December 1999.
- [2] Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food products intended for Consumers (2000) 'Opinion concerning an Initial List of Perfumery Materials which must not form part of Fragrances Compounds used in Cosmetic Products'. Adopted by the SCCNFP during the 12th Plenary meeting of 3 May 2000.
- [3] Directive 2003/15/ec of the European Parliament and of the Council of 27 february 2003 amending Council Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products.
- [4] C. Debonneville, A. Chaintreau *J. Chromatography A*, 1027 (2004) 109.
- [5] Rastogi, S.C.. *J. High Resolut. Chromatogr.* 18 (1995) 653
- [6] E. Mariani, C. Villa, M. Longobardi. *Il Farmaco* 52 (1997) 247.
- [7] E. Mariani, C. Neuhoff and C. Villa, *International Journal of Cosmetic Science* 19 (1997)