

# COSMETIC<sup>®</sup> TECHNOLOGY

RIVISTA DI SCIENZE COSMETOLOGICHE

ISSN 1127-6312 Bimestrale. Poste Italiane s.p.a. - Spedizione in Abbonamento Postale - D.L. 353/2003 (convertito in Legge 27/02/2004 n° 46) art. 1, comma 1, L0/M1

5

SETTEMBRE-OTTOBRE



CEC  
EDITORE

# Filtri UV

## Sviluppo e convalida di un metodo HPLC per il controllo qualità dei filtri UV nelle preparazioni cosmetiche

- Parte I -

di Luigi Miori, Luca Pizzato, Debora Pepe, Laura Pelosi

Areaderma S.r.l. • [mioriluigi@areaderma.it](mailto:mioriluigi@areaderma.it)

### PAROLE CHIAVE

HPLC • Filtri UV • Estrazione • Validazione • SPF

## Riassunto

Lo scopo di questa ricerca è la messa a punto e la validazione di un metodo analitico per poter determinare e quantificare i filtri UV all'interno dei prodotti cosmetici.

Il metodo è focalizzato su 6 filtri UV: omosalato, butilmetossidibenzoil metano, octocrilene, etilesil metossicinnamato, etilesil salicilato e dietilammino idrossibenzoil esil benzoato.

Lo strumento utilizzato è un HPLC Agilent Technologies 1220 Infinity LC con colonna Zobrax Eclipse XDB-C18 5 µm 4,6x250 mm.

Il metodo prevede una fase mobile costituita da 2 fasi: una fase A composta da una soluzione acquosa di acido acetico a pH 3 e una fase B composta da etanolo e acetonitrile in rapporto 60:40.

Tutti i parametri necessari alla convalida sono stati accertati e i dati ottenuti rientrano nei criteri di accettazione.

Per effettuare tale validazione si sono seguite le linee guida ICH Q2 (R1) (1).

## Introduzione

I filtri UV sono sostanze chimiche presenti nei prodotti solari, sottoposte a quanto stabilito dalla normativa di prodotto, vale a dire dal Regolamento (CE)

### UV filters

Development and validation of an HPLC method, for quality control of UV filters in cosmetic preparations

The aim of this research is the development and internal validation of a new HPLC analysis method for the determination and quantification of UV filters in cosmetic preparations.

This method allows the determination and quantification of Diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate, Octocrylene, Octyl methoxycinnamate, Ethylhexyl salicylate, Homosalate and Butyl methoxydibenzoylmethane.

The analyzes were performed on an Agilent Technologies 1220 Infinity LC HPLC with a Zobrax Eclipse XDB-C18 5 µm 4,6x250 mm column and a Zobrax Eclipse XDB-C18 5µm 4,6x12,5 mm precolumn.

The method involves a mobile phase consisting in 2 phases: phase A, a pH3 acetic acid's aqueous solution and phase B, a 60:40 mixture of ethanol and acetonitrile.

All the parameters necessary for validation have been ascertained and the data obtained fall within the acceptance criteria.

To carry out this validation, the ICH Q2 (R1) guidelines were followed (1).

n.1223/2009 sui prodotti cosmetici (2). Tale norma li definisce all'art.2.1.n) come sostanze destinate esclusivamente o prevalentemente a proteggere la pelle da determinate radiazioni UV attraverso l'assorbimento, la riflessione o la diffusione delle radiazioni UV (3).

I filtri solari oggetto del presente studio sono quelli attualmente più utilizzati all'interno delle formulazioni cosmetiche, ovvero: Diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate (DHHB) (Fig.1A), Octocrylene

(OCR) (Fig.1B), Octyl methoxycinnamate (EHMC) (Fig.1C), Ethylhexyl salicylate (EHS) (Fig.1D), Homosalate (HMS) (Fig.1E) e Butyl methoxydibenzoylmethane (BMDM) (Fig.1F).

Si tratta di sostanze di sintesi con una struttura chimica costituita da uno o più anelli aromatici e da gruppi funzionali in grado di agire da donatori o da accettori di elettroni, e rappresentano quelli comunemente definiti come filtri organici o chimici.

## SUMMARY

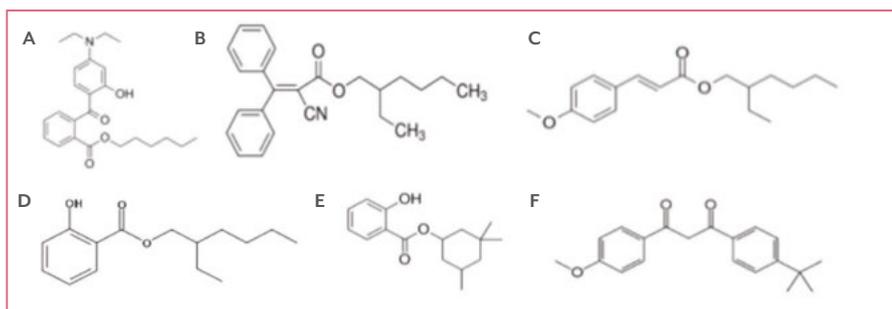


Figura 1 • Strutture molecolari di DHHB (A), OCR (B), EHMC (C), EHS (D), HMS (E) e BMDM (F)

Assorbono selettivamente i raggi UV a corta lunghezza d'onda e li convertono in radiazioni a lunghezza d'onda maggiore e meno energetiche.

L'energia assorbita da parte del filtro corrisponde all'energia richiesta per causarne l'eccitazione fotochimica a uno stato di energia più alto rispetto a quello nel quale si trova. Ritornando allo stato energetico iniziale, emette radiazioni di una lunghezza d'onda maggiore, non dannose per la cute.

L'energia può essere emessa come fluorescenza se cade nella regione del visibile, come calore se si trova nell'IR oppure può danneggiare la struttura chimica del filtro stesso con conseguente perdita dell'attività filtrante e produzione di prodotti di degradazione potenzialmente dannosi (3).

L'obiettivo del presente studio è sviluppare e validare un metodo HPLC che consenta di verificare dal punto di vista quali-quantitativo l'effettiva presenza di filtri UV in preparazioni topiche a uso multiplo per poterne monitorare la stabilità nel tempo. In particolare, il metodo dovrà consentire di determinare e quantificare in modo rapido, selettivo, ripetibile, accurato e preciso le molecole in oggetto.

## Materiali e Metodi

### Sostanze utilizzate

Acqua HPLC grade: PanReacAppliChem; metanolo HPLC grade: Scharlau;

acetonitrile HPLC grade: PanReacAppliChem; etanolo HPLC grade: PanReacAppliChem; acido acetico glaciale HPLC grade: Scharlau.

### Standard analitici

Homosalate: Sigma-Aldrich®, Pharmaceutical Secondary Standard; Avobenzonone: Sigma-Aldrich®, Pharmaceutical Secondary Standard; Octocrylene: Sigma-Aldrich®, Pharmaceutical Secondary Standard; Octinoxate: Sigma-Aldrich®, Pharmaceutical Secondary Standard; 2-Ethylhexyl salicylate: Sigma-Aldrich®, Analytical Standard, purity 99,8%; Hexyl 2-[4-diethylamino]-2-hydroxybenzoyl]benzoate: Sigma-Aldrich®, Analytical Standard, purity 99,5%.

### Strumenti e attrezzature

HPLC Agilent Technologies mod. 1220 Infinity LC fornito con rivelatore DAD UV - G4294B e due pompe A e B. Colonna Zobrax Eclipse XDB-C18 5 µm 4,6x250 mm e una precolonna Zobrax Eclipse XDB-C18 5 µm 4,6x12,5 mm.

Bilancia analitica marca Sartorius (s=0,0001 g; p=210 g).

Centrifuga Hettich Zentrifugen (0-6000 giri/min). Agitatore magnetico: Velp Scientifica, micro stirrer. pHmetro: Mettler Toledo, Seven Compact. Sonificatore marca Falc.

Becher, matracci, pipette, cilindri, bottiglie di diversi volumi VWR. Filtri RC da HPLC: Agilent da 0,45 µm.

### Condizioni cromatografiche

- Colonna cromatografica: C18, 5 µm, 4,6x250 mm.
- Fase mobile:
  - A. soluzione acquosa di acido acetico pH 3;
  - B. etanolo/acetonitrile in rapporto 60:40.
- Velocità di flusso: 1,0 mL/min.
- Volume di iniezione: 5 µL.
- Lunghezza d'onda: 300 nm, 313 nm e 360 nm.
- Temperatura della colonna: 30°C±1°C.
- Gradiente di eluizione (Tab.1).

### Preparazione delle soluzioni

#### Preparazione

#### delle soluzioni madre

In un matraccio tarato da 10 mL sono stati pesati circa 10 mg di standard, dopodiché il matraccio è stato portato a volume con metanolo ed è stato posto in ultrasuoni per favorire la dissoluzione e la relativa solubilizzazione dello standard (soluzione a 1000 mg/L).

#### Preparazione

#### delle soluzioni standard

La soluzione standard a 100 mg/L è stata preparata prelevando 1 mL dalla soluzione madre e, una volta trasferita tale aliquota in un matraccio da 10 mL, aggiungendo 9 mL di metanolo.

Tempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)
0	25	75
18	25	75
26	10	90
27	10	90
30	25	75

Tabella 1 • Gradiente di eluizione utilizzato

Concentrazione dei filtri UV (mg/mL)	Volume prelevato dalla soluzione madre (mL)	Volume di metanolo utilizzato (mL)
0,01	0,1	9,9
0,02	0,2	9,8
0,05	0,5	9,5
0,08	0,8	9,2
0,1	1,0	9,0

**Tabella 2** • Soluzioni per lo studio di linearità

### Preparazione delle soluzioni necessarie per la validazione

- Preparazione delle soluzioni per lo studio della linearità.

La preparazione di queste soluzioni prevede la diluizione della soluzione madre per ottenere 5 soluzioni a concentrazione crescente, come dimostrato nella **Tabella 2**.

L'aliquota che viene prelevata dalla soluzione madre viene posta in un matraccio da 10 mL, portato poi a volume con metanolo.

- Concentrazioni delle soluzioni per la determinazione del limite di rivelabilità (LOD).

Partendo dalla soluzione madre si sono effettuate diluizioni sino a giungere al LOD (**Tab.3**).

- Concentrazioni delle soluzioni per la determinazione del limite di quantificazione (LOQ).

Partendo dalla soluzione madre si sono effettuate diluizioni sino a giungere al LOQ (**Tab.4**).

### Soluzioni per lo studio della precisione

Sono state utilizzate le soluzioni preparate per lo studio della linearità.

Per ogni soluzione sono state effettuate 3 run ripetute per valutare la precisione del sistema cromatografico.

### Preparazione del campione

Pesare su bilancia analitica circa 100 mg di cosmetico su provetta da centrifuga da 15 mL e addizionarvi 10 mL MeOH; vortexare per 1 minuto e sottoporre la provetta agli ultrasuoni in bagno a ghiaccio per 15

	Concentrazione soluzione LOD (mg/mL)
DHHB	0,0001
OCR	0,0005
EHMC	0,00025
EHS	0,0015
HMS	0,001
BMDM	0,0005

**Tabella 3** • Soluzioni per la determinazione del LOD

	Concentrazione soluzione LOQ (mg/mL)
DHHB	0,0003
OCR	0,0015
EHMC	0,0005
EHS	0,003
HMS	0,003
BMDM	0,0015

**Tabella 4** • Soluzioni per la determinazione del LOQ

minuti; centrifugare a 6000 rpm per 20 minuti.

Prelevare 1 mL di surnatante tramite una micropipetta, trasferirlo in un matraccio da 10 mL e portare a volume con 9 mL di MeOH; prelevare 1 mL dal matraccio e procedere con filtrazione a 0,45 µm su Vial da HPLC.

Risultati della validazione	DHHB	OCR	EHMC	EHS	HMS	BMDM
Linearità	r: 0,99992	r: 0,99991	r: 0,99992	r: 0,99997	r: 0,99993	r: 0,99983
	m: 27,7764809	m: 11,0174321	m: 26,0573236	m: 5,03222634	m: 4,2329307	m: 33,06
	b: -41,844391	b: 15,641843	b: -13,066668	b: -7,1623059	b: 0,8440851	b: 5,51
Precisione	Dev Std: 0,355	Dev Std: 0,524	Dev Std: 0,507	Dev Std: 0,281	Dev Std: 0,527	Dev Std: 1,062
	CV%: 0,013	CV%: 0,044	CV%: 0,018	CV%: 0,052	CV%: 0,102	CV%: 0,031
	Recupero: 100,67	Recupero: 100,39	Recupero: 100,38	Recupero: 100,20	Recupero: 100,05	Recupero: 100,44
Accuratezza	t (p 0,01; gdl 4) 3,747 T <sub>sper</sub> = 1,26	t (p 0,01; gdl 4) 3,747 T <sub>sper</sub> = 1,23	t (p 0,01; gdl 4) 3,747 T <sub>sper</sub> = 1,24	t (p 0,01; gdl 4) 3,747 T <sub>sper</sub> = 1,20	t (p 0,01; gdl 4) 3,747 T <sub>sper</sub> = 1,28	t (p 0,01; gdl 4) 3,747 T <sub>sper</sub> = 1,51

**Tabella 5** • Risultati della validazione

## Risultati

In *Tabella 5* sono presentati i risultati della validazione. Tutti i parametri necessari per la validazione rientrano nei range di accettazione dettati dalle linee guida ICH Q2 (R1) (*Tab.5*) (1,4).

Come è possibile osservare dal cromatogramma ottenuto dall'analisi di una soluzione mix standard, i picchi delle varie molecole sono perfettamente separati (*Fig.2*).

## Robustezza del metodo

Sono stati effettuati i test di robustezza del metodo modificando la percentuale delle fasi utilizzate, il pH e il flusso (1,4).

Il metodo è testato su un'altra colonna HPLC Zorbax Eclipse XDB-C18, 4,6x250 mm 5 µm, permettendo di completare gli studi di robustezza.

Come si evince dai dati raccolti in *Tabella 6*, il metodo risulta essere robusto.

## Conclusioni

### Validazione del metodo

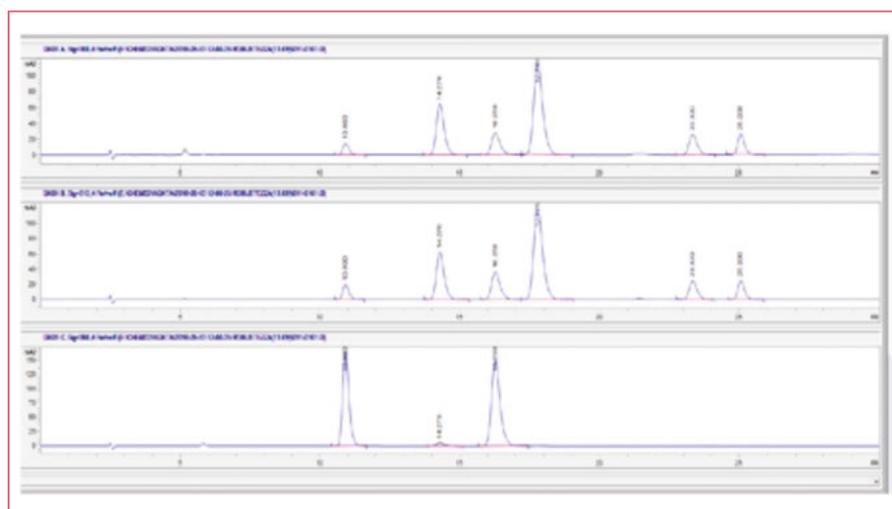
L'identità di ciascun picco è stata confermata in base al tempo di ritenzione (*Fig.2*). Per effettuare la validazione di questo metodo ci si è basati sui requisiti delle linee guida ICH Q2 per la convalida di procedure analitiche (1).

La linearità della retta di calibrazione è stata determinata studiando il coefficiente di correlazione tra le concentrazioni e l'area di risposta di ogni concentrazione (*Tabb.2,5*).

La precisione è stata valutata dalla percentuale di recupero (*Tab.5*).

Le deviazioni standard relative per selettività, ripetibilità, precisione intermedia e robustezza sono inferiori al 2% (*Tab.5*).

Valori limiti di rilevazione (0,001 mg/mL per omosalato; 0,0005 mg/mL per avobenzone; 0,0005 mg/mL per octocrilene; 0,00025 mg/mL per octinoxate; 0,0015 mg/mL per etilesil salicilato e 0,001 mg/mL per dietilammino idrossibenzoil esil benzoato) (*Tab.3*) e limiti di quantificazione (0,003 mg/mL per omosalato;



**Figura 2** • Cromatogrammi di mix standard a 300 nm, 313 nm e 360 nm. Possiamo notare il picco di ogni molecola con relativo tempo di ritenzione. Da sinistra a destra: DHHB, OCR, BMDM, EHMC, EHS e HMS

DHHB	Flusso 0,9 mL/min	Flusso 1 mL/min	Flusso 1,1 mL/min	74% Fase B	75% Fase B	76% Fase B	pH 2,9 Fase A	pH 3,0 Fase A	pH 3,1 Fase A
RT	12,19	10,89	9,94	11,94	10,89	10,09	10,94	10,89	10,97
USP Tailing	1,25	1,26	1,24	1,26	1,26	1,27	1,27	1,26	1,24
N	9012	8742	8373	8971	8742	8398	8600	8742	8620
Risoluzione	17,26	16,74	16,28	17,71	16,74	15,72	16,63	16,74	16,74
OCR	Flusso 0,9 mL/min	Flusso 1 mL/min	Flusso 1,1 mL/min	74% Fase B	75% Fase B	76% Fase B	pH 2,9 Fase A	pH 3,0 Fase A	pH 3,1 Fase A
RT	15,97	14,27	13	15,86	14,27	13,01	14,32	14,27	14,36
USP Tailing	1,28	1,23	1,25	1,23	1,23	1,24	1,23	1,23	1,25
N	10213	9695	9438	9409	9695	9548	9752	9695	9735
Risoluzione	7,66	7,45	7,25	7,86	7,45	6,96	3,14	7,45	7,44
EHMC	Flusso 0,9 mL/min	Flusso 1 mL/min	Flusso 1,1 mL/min	74% Fase B	75% Fase B	76% Fase B	pH 2,9 Fase A	pH 3,0 Fase A	pH 3,1 Fase A
RT	19,88	17,77	16,18	19,65	17,77	16,26	17,82	17,77	17,88
USP Tailing	1,25	1,24	1,25	1,25	1,24	1,25	1,24	1,24	1,25
N	11390	11146	10557	11139	11146	10482	10905	11146	10519
Risoluzione	2,72	2,69	2,59	2,71	2,69	2,60	2,65	2,69	2,67

Continua →

EHS	Flusso 0,9 mL/min	Flusso 1 mL/min	Flusso 1,1 mL/min	74% Fase B	75% Fase B	76% Fase B	pH 2,9 Fase A	pH 3,0 Fase A	pH 3,1 Fase A
RT	25,11	23,32	21,56	24,69	23,32	21,70	23,24	23,32	23,40
USP Tailing	1,26	1,20	1,22	1,25	1,20	1,21	1,23	1,20	1,22
N	40945	25369	14930	42023	25369	14524	25863	25369	26226
Risoluzione	9,62	3,17	3,26	3,17	3,17	3,12	3,14	3,17	3,15
HMS	Flusso 0,9 mL/min	Flusso 1 mL/min	Flusso 1,1 mL/min	74% Fase B	75% Fase B	76% Fase B	pH 2,9 Fase A	pH 3,0 Fase A	pH 3,1 Fase A
RT	26,58	25,03	23,58	26,12	25,03	23,78	25,05	25,03	25,10
USP Tailing	1,29	1,28	1,24	1,3	1,28	1,27	1,27	1,28	1,28
N	57881	39581	25820	57810	39581	24470	40405	39581	40369
Risoluzione	3,59	3,64	3,58	3,60	3,64	3,56	3,59	3,64	3,61
BMDM	Flusso 0,9 mL/min	Flusso 1 mL/min	Flusso 1,1 mL/min	74% Fase B	75% Fase B	76% Fase B	pH 2,9 Fase A	pH 3,0 Fase A	pH 3,1 Fase A
RT	18,18	16,25	14,80	17,95	16,256	14,90	16,30	16,25	16,35
USP Tailing	1,28	1,28	1,27	1,27	1,28	1,26	1,28	1,28	1,28
N	10326	10037	9695	10965	10037	9896	9939	10037	9913
Risoluzione	3,88	3,83	3,67	3,59	3,83	3,90	3,72	3,83	3,78

**Tabella 6** • Risultati robustezza del metodo

0,0015 mg/mL per avobenzone; 0,0015 mg/mL per octocilene; 0,005 mg/mL per octinoxate; 0,003 mg/mL per etil salicilato e 0,0003 mg/mL per dietilammino idrossibenzoil esil benzoato) (**Tab.4**) indicano una buona sensibilità del metodo.

## Bibliografia

1. ICH Harmonized Tripartite Guideline (2005) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1), somatek.com/wp-content/uploads/2014/06/sk140605h.pdf
2. D'agostinis GME, Mignini GE (2015) Manuale del cosmetologo. Tecniche nuove, Milano, pp.74-78
3. D'agostinis GME, Mignini GE (2015) Manuale del cosmetologo. Tecniche nuove, Milano, pp.402-407
4. Piccini G (2008) Validazione dei metodi di prova e stima dell'incertezza di misura, www.artaabruzzo.it/download/news/134/validazione\_e\_incetezza.pdf