

CEC
EDITORE

COSMETIC[®] 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, LO/MI

Solari **6** Nov/Dic
2018



Betacarotene
incapsulato

Polimero naturale
filmogeno

I conservanti

Sviluppo, convalida e applicazione di un metodo HPLC

Luigi Miori, Luca Pizzato

Areaderma
mioriluigi@areaderma.it
pizzatoluca@areaderma.it

Parole chiave

HPLC
Conservanti
Estrazione
Stabilità
Validazione

Riassunto

Lo scopo del lavoro è la messa a punto e la convalida interna di un nuovo metodo di analisi HPLC per la determinazione e la quantificazione dei conservanti all'interno delle preparazioni cosmetiche.

Tale metodo permette la determinazione e la quantificazione degli acidi benzoico, sorbico, deidroacetico, del fenossietanolo e dell'alcol benzilico.

Le analisi sono state effettuate su un HPLC Agilent Technologies 1220 Infinity LC con una colonna Zobrax Eclipse XDB-C18 5 µm 4,6 x 250 mm e una precolonna Zobrax Eclipse XDB-C18 5 µm 4,6 x 12,5 mm.

La fase mobile, invece, è costituita da una soluzione tampone acetato 20 mM pH 4,3 e acetonitrile eluiti in colonna secondo uno specifico gradiente. Il tempo di analisi è di 18 minuti, con un flusso di 1,5 mL/min a 30°C a una pressione di 135 bar, mentre il rivelatore è un DAD UV - G4294B a 230, 254 e 260 nm.

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 (1).

Dopo aver validato il metodo, lo si è potuto applicare per monitorare la concentrazione dei conservanti durante i test di stabilità accelerata.

Introduzione

I conservanti sono sostanze, naturali o di sintesi, che vengono aggiunte alle formulazioni cosmetiche (ma anche a preparazioni farmaceutiche o alimenti) per preservarle dalla contaminazione di microrganismi quali batteri, lieviti, muffe e funghi.

Le formulazioni cosmetiche, essendo costituite per la maggior parte da acqua, sono infatti un ottimo ambiente per la proliferazione batterica.

Questa può avvenire in qualunque fase della vita del cosmetico, dalla fase

Preservatives

Development, validation and application of an HPLC method

Summary

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

This method allows the determination and quantification of Benzoic Acid, Sorbic Acid, Dehydroacetic Acid, Phenoxyethanol and Benzyl Alcohol.

The analyses were performed on an Agilent Technologies 1220 Infinity LC HPLC with a Zobrax Eclipse XDB-C18 5µm 4,6 x 250 mm column and a Zobrax Eclipse XDB-C18 5µm 4,6 x 12.5 mm precolumn.

The mobile phase, on the other hand, consists of a 20 mM acetate buffer solution pH 4.3 and acetonitrile eluted in the column according to a specific gradient.

The analysis time is 18 minutes, with a flow of 1,5 mL / min at 30 °C at a pressure of 135 bar, while the detector is a DAD UV - G4294B at 230, 254 and 260 nm.

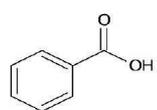
All the parameters necessary for validation have been ascertained and the data obtained fall within the acceptance criteria.

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

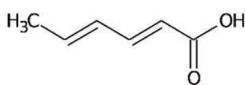
After validating the method, it was applied to monitor the concentration of preservatives during accelerated stability tests.

di produzione al confezionamento, sino al momento in cui questo viene utilizzato dal consumatore. I microrganismi usano i componenti del cosmetico come substrato, andando ad alterare le caratteristiche chimico-fisiche del prodotto.

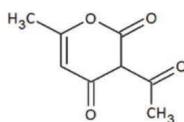
I conservanti oggetto di tale studio sono indicati in *Figura 1* e sono l'acido benzoico, l'acido sorbico, l'acido deidroacetico, il fenossietanolo e l'alcol benzilico: alcune tra



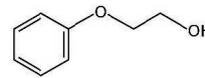
Acido benzoico



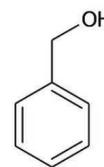
Acido sorbico



Acido deidroacetico



Fenossietanolo



Alcol benzilico

Figura 1 - Conservanti analizzati.

le molecole più utilizzate in campo alimentare, cosmetico e farmaceutico.

L'efficacia antimicrobica dev'essere dimostrata per tutti i prodotti contenenti conservanti, per i prodotti a uso topico e a uso multiplo.

Questo perché la concentrazione di un conservante può diminuire durante la shelf-life del prodotto.

La concentrazione di tali molecole deve quindi essere quantificata e la probabile quantità consumata durante l'apertura del prodotto dev'essere calcolata (1).

Scopi di questo studio sono lo sviluppo e la validazione di un metodo HPLC che consenta di determinare e quantificare in modo rapido, selettivo, ripetibile, accurato e preciso le molecole in oggetto.

Materiali e Metodi

Sostanze utilizzate

Acqua HPLC grade: PanReac AppliChem; metanolo HPLC grade: Scharlau; acetonitrile HPLC grade: PanReac AppliChem; acetato di ammonio HPLC grade: Scharlau; acido acetico glaciale HPLC grade: Scharlau.

Standard analitici

Benzoic Acid: Supelco®, analytical standard, purity 99,9%; Benzyl Alcohol: Sigma-Aldrich®, Pharmaceutical Secondary Standard, Certified Reference Material; Dehydroacetic Acid: Sigma-Aldrich®, Pharmaceutical Secondary Standard, Certified Reference Material; 2-Phenoxyethanol: Sigma-Aldrich®, Analytical Standard, purity 99,5%; Sorbic Acid: Supelco®, Analytical Standard.

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 5µm 4,6 x 250 mm e una precolonna Zobrax Eclipse XDB-C18 5µm 4,6 x 12,5 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. Sonicatore marca Falc. Becher, matracci, pipette, cilindri, bottiglie di diversi volumi dell'azienda VWR. Filtri RC da HPLC: Agilent da 0,45 µm.

Condizioni cromatografiche

- Colonna cromatografica: C18, 5 µm, 4,6 x 250 mm.
- Fase mobile:
 - A. pesare 0,7708 di acetato di ammonio, aggiungere 450 mL di acqua e portare a pH 4,3 aggiungendo acido acetico glaciale; trasferire la soluzione in un matraccio da 500 mL e portare a volume con acqua.
 - B. Acetonitrile.
- Velocità di flusso: 1,5 mL/min.
- Volume di iniezione: 5 µL.
- Lunghezza d'onda: 230 nm, 260 nm e 280 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 acido benzoico utilizzando una micro-spatolina, 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).

Le soluzioni madre di acido sorbico, acido deidroacetico, fenossietanolo e alcol benzilico vengono preparate con la medesima modalità.

Tempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)
0	76	24
14	70	30
15	76	24

Tabella 1 - Gradiente di eluizione utilizzato.

Preparazione delle soluzioni standard

La soluzione standard di acido benzoico 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.

Le soluzioni standard di acido sorbico, acido deidroacetico, fenossietanolo e alcol benzilico vengono preparate con la medesima modalità.

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 cinque soluzioni a concentrazione crescente come indicato nella *Tabella 2 (2-4)*. 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 LOD

Partendo dalla soluzione madre, si sono effettuate diluizioni sino a giungere al LOD (*Tab.3 (2-4)*).

Concentrazioni delle soluzioni per la determinazione del LOQ

Partendo dalla soluzione madre, si sono effettuate diluizioni sino a giungere al LOQ (*Tab.4 (2-4)*).

Soluzioni per lo studio della precisione

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

Per ogni soluzione sono state effettuate tre *run* ripetute per valutare la precisione del sistema cromatografico (*2-4*).

Preparazione della fase mobile

Pesare, su bilancia analitica, esattamente 0,7708 g di acetato di ammonio (HPLC Grade) e discioglierli in circa 450 mL di H₂O. Misurare il pH della soluzione così ottenuta e, aggiungendo acido acetico glaciale, portare il pH a un valore finale di 4,3. Trasferire la soluzione in un matraccio da 500 mL e portare a volume.

Preparazione del campione

Pesare su bilancia analitica circa 100/150 mg di cosmetico su provetta da centrifuga da 15 mL e addizionarvi 10 mL MeOH; *vortexare* per 1 minuto e sottoporre la provetta agli

Concentrazione dei conservanti (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.

	Concentrazione Soluzione LOD (mg/mL)
Acido benzoico	0,001
Acido sorbico	0,00025
Acido deidroacetico	0,002
Fenossietanolo	0,005
Alcol benzilico	0,015

Tabella 3 - Soluzioni per la determinazione del LOD.

	Concentrazione soluzione LOQ (mg/mL)
Acido benzoico	0,003
Acido sorbico	0,0005
Acido deidroacetico	0,006
Fenossietanolo	0,01
Alcol benzilico	0,03

Tabella 4 - Soluzioni per la determinazione del LOQ.

ultrasuoni in bagno a ghiaccio per 15 minuti; centrifugare a 6'000 rpm per 20 minuti.

Prelevare 1 mL di surnatante tramite una micropipetta; procedere con filtrazione a 0,45 µm su Vial da HPLC.

Risultati della validazione

Tutti i parametri necessari per la validazione rientrano nei *range* di accettazione dettati dalle linee guida ICH Q2 (R1) (*Tab.5 (2-4)*).

Come possiamo notare 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 e il pH (*2*).

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

Risultati della validazione	Acido benzoico	Acido sorbico	Acido deidroacetico	Fenossietanolo	Alcol benzilico
Linearità	r: 0,99993	r: 0,99993	r: 0,99991	r: 0,99998	r: 0,99993
	m: 14,44360	m: 45,93655	m: 11,88557	m: 2,48065	m: 0,29624
	b: 11,68196	b: 9,33607	b: 10,47409	b: 0,721824	b: 0,196623
	Sa: 0,12049	Sa: 0,46170	Sa: 0,65312	Sa: 0,75965	Sa: 0,18264
Precisione	Dev Std: 0,41	Dev Std: 0,53	Dev Std: 0,41	Dev Std: 0,75	Dev Std: 0,40
	CV%: 0,41	CV%: 0,53	CV%: 0,41	CV%: 0,75	CV%: 0,40
	Recupero: 100,4	Recupero: 100,5	Recupero: 100,4	Recupero: 100,5	Recupero: 99,7
Accuratezza	t (P 0,05; gdl 4) 2,776 T _{sper} = 1,1124	t (P 0,05; gdl 4) 2,776 T _{sper} = 1,0658	t (P 0,05; gdl 4) 2,776 T _{sper} = 1,0658	t (P 0,05; gdl 4) 2,776 T _{sper} = 1,1445	t (P 0,05; gdl 4) 2,776 T _{sper} = 1,5085

Tabella 5 - Risultati della validazione.

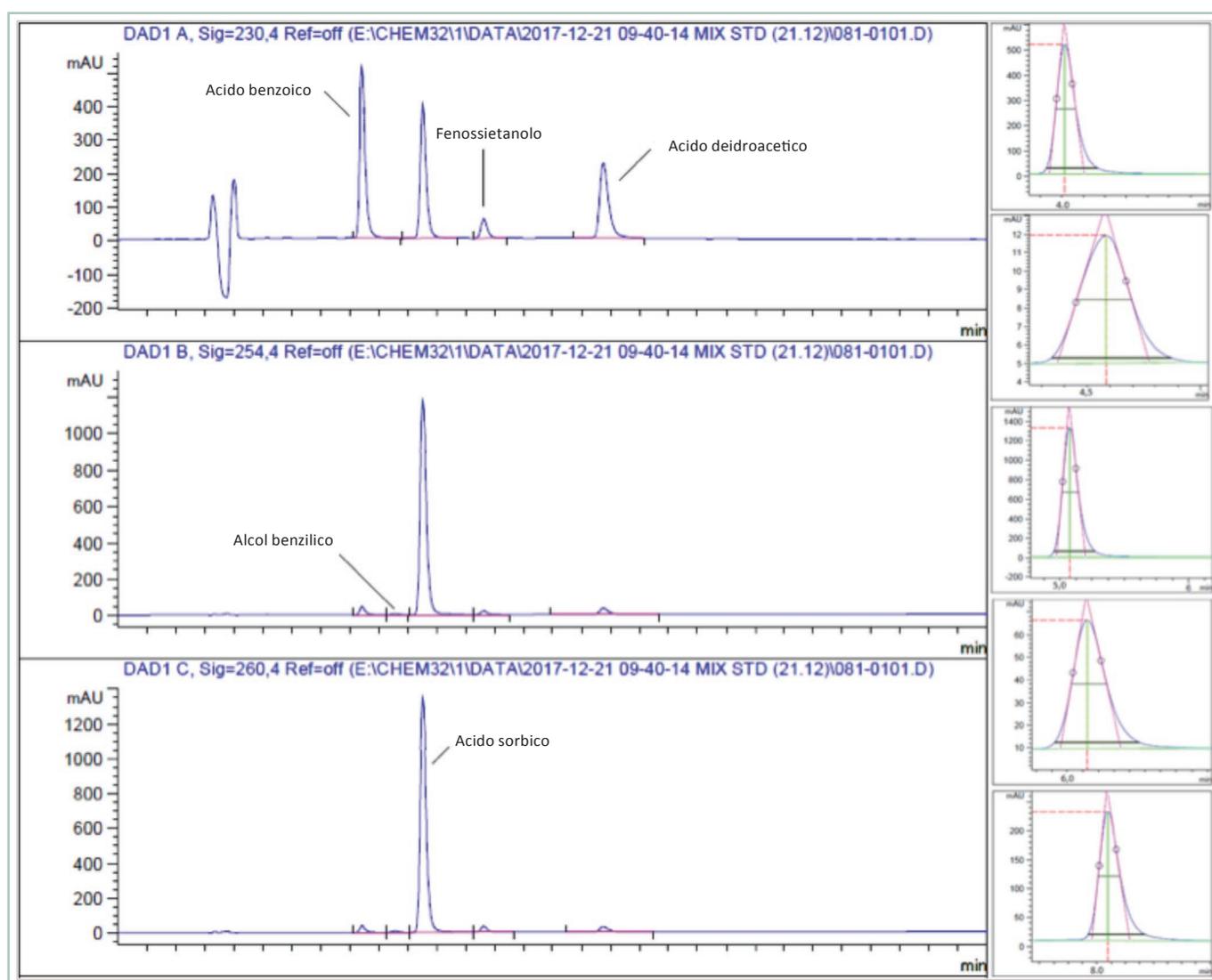


Figura 2 - Cromatogramma mix standard. A destra si può notare il picco di ogni molecola nel dettaglio. Dall'alto verso il basso: acido benzoico, alcol benzilico, acido sorbico, fenossietanolo e acido deidroacetico.

Applicazione del metodo in stabilità accelerata

Dopo la messa a punto e la validazione, si è deciso di testare il metodo monitorando la concentrazione dei con-

servanti presenti in tre diverse formulazioni cosmetiche: un gel (**Figg.3A-C e Tab.7**), una crema (**Figg.4A-C e Tab.8**) e un detergente (**Figg.5A-E e Tab.9**). Tali campioni sono stati sottoposti al test di stabilità accelerata.

<i>Acido benzoico</i>	14% Fase B	24% Fase B	34% Fase B	pH 4,2	pH 4,3	pH 4,4
RT	4,22	4,02	3,81	4,1	4,02	3,9
USP Tailing	1,41	1,44	1,4	1,42	1,44	1,41
N	12301	13251	11503	12505	13056	10546
Risoluzione	10,95	12,42	11,54	11,23	12,42	11,98

<i>Acido sorbico</i>	14% Fase B	24% Fase B	34% Fase B	pH 4,2	pH 4,3	pH 4,4
RT	5,3	5,1	4,9	5,3	5,1	5
USP Tailing	1,28	1,32	1,29	1,27	1,32	1,29
N	10335	14520	12364	14323	14520	11056
Risoluzione	1,5	1,97	1,6	1,91	1,97	1,8

<i>Acido deidroacetico</i>	14% Fase B	24% Fase B	34% Fase B	pH 4,2	pH 4,3	pH 4,4
RT	8,5	8,11	7,9	8,3	8,11	8
USP Tailing	1,29	1,34	1,31	1,32	1,34	1,3
N	10013	10839	9133	10233	10839	9463
Risoluzione	11,45	12,41	11,64	11,12	12,41	11,65

<i>Fenossietanolo</i>	14% Fase B	24% Fase B	34% Fase B	pH 4,2	pH 4,3	pH 4,4
RT	6,4	6,1	5,8	6,1	6,1	6,1
USP Tailing	1,8	2	1,8	1,79	2	1,85
N	11321	12947	10645	11664	12947	10364
Risoluzione	12	13	11	12	13	10

<i>Alcol benzilico</i>	14% Fase B	24% Fase B	34% Fase B	pH 4,2	pH 4,3	pH 4,4
RT	5	4,6	3,5	4,6	4,6	4,6
USP Tailing	1,2	1,25	1,22	1,18	1,25	1,2
N	13846	15706	12664	14623	15706	13065
Risoluzione	2,6	4,21	1,9	4,01	4,21	3,95

Tabella 6 - Risultati robustezza del metodo.

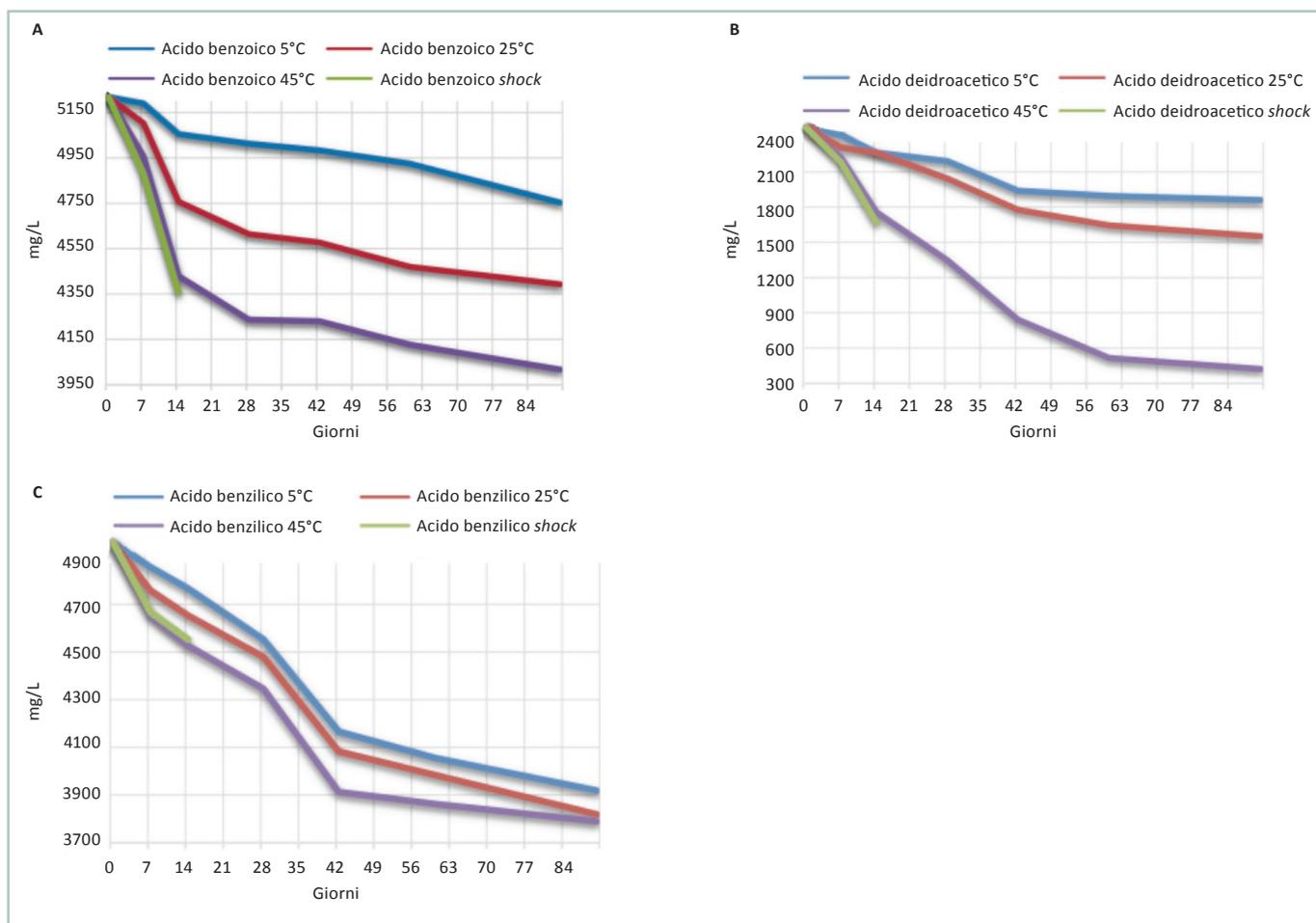


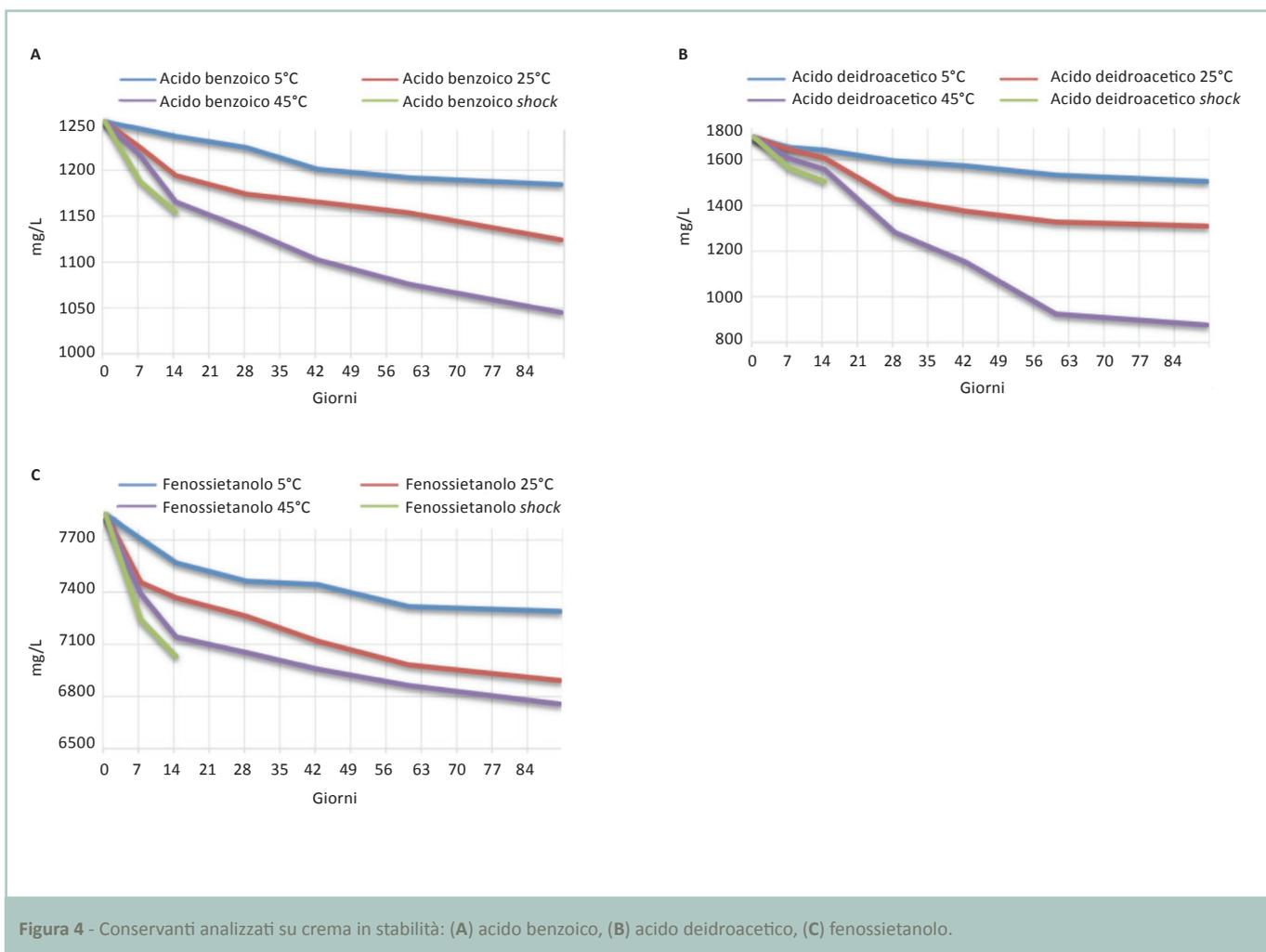
Figura 3 - Conservanti analizzati su gel in stabilità: (A) acido benzoico, (B) acido deidroacetico, (C) alcol benzilico.

Gel 5°C		
<i>Percentuale residua di conservante</i>		
Acido benzoico	Acido deidroacetico	Alcol benzilico
91,08%	75,13%	78,98%
Gel 25°C		
<i>Percentuale residua di conservante</i>		
Acido benzoico	Acido deidroacetico	Alcol benzilico
84,17%	62,65%	76,96%
Gel 45°C		
<i>Percentuale residua di conservante</i>		
Acido benzoico	Acido deidroacetico	Alcol benzilico
76,98%	17,02%	76,38%
Gel shock		
<i>Percentuale residua di conservante</i>		
Acido benzoico	Acido deidroacetico	Alcol benzilico
83,51%	67,34%	91,76%

Tabella 7 - Percentuale residua dei conservanti su gel in stabilità.

Crema 5°C		
<i>Percentuale residua di conservante</i>		
Acido benzoico	Acido deidroacetico	Fenossietanolo
94,53%	88,63%	92,90%
Crema 25°C		
<i>Percentuale residua di conservante</i>		
Acido benzoico	Acido deidroacetico	Fenossietanolo
89,72%	77,11%	87,83%
Crema 45°C		
<i>Percentuale residua di conservante</i>		
Acido benzoico	Acido deidroacetico	Fenossietanolo
83,41%	51,59%	86,11%
Crema shock		
<i>Percentuale residua di conservante</i>		
Acido benzoico	Acido deidroacetico	Fenossietanolo
92,13%	88,62%	89,59%

Tabella 8 - Percentuale residua dei conservanti su crema in stabilità.



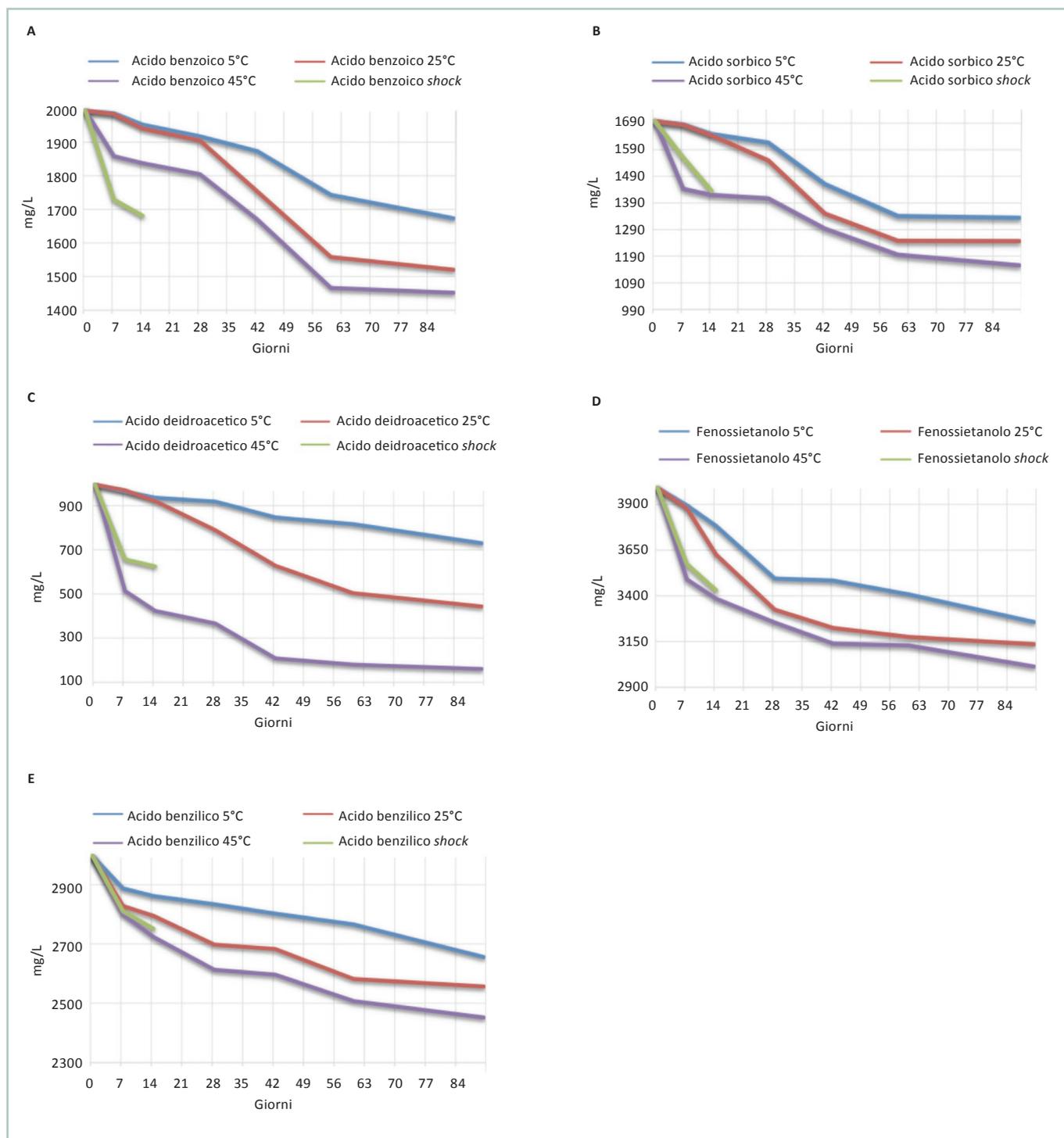


Figura 5 - Conservanti analizzati su detergenza in stabilità: (A) acido benzoico, (B) acido sorbico, (C) acido deidroacetico, (D) fenossietanolo, (E) alcol benzilico.

Questo esame consiste nel porre le varie preparazioni in diverse condizioni ambientali per il medesimo lasso di tempo, ossia 90 giorni.

Per ogni formulazione sono stati preparati quattro campioni; sono stati posti rispettivamente a 5, a 25 e a 45°C. Il restante campione è stato sottoposto allo *shock* termico, un test che espone il campione a sbalzi termici; la temperatura all'interno della camera climatica passa dai 45 ai

5°C ogni 48 ore e in questo caso la durata del test è solamente di 15 giorni. Sono state ricercate le concentrazioni dei conservanti a t0, t7, t14, t30, t44, t60, t75, t90 (ogni punto del grafico è dato dalla media di tre analisi).

Lo scopo è quello di comprendere al meglio come vanno a rapportarsi queste molecole una volta sottoposte a determinate temperature e riuscire a determinare se il pacchetto conservante sia o meno attivo dopo tale trattamento.

Detergenza 5°C				
Percentuale rimasta di conservante				
Acido benzoico	Acido deidroacetico	Fenossietanolo	Acido sorbico	Alcol benzilico
83,93%	73,34%	81,60%	78,59%	88,62%
Detergenza 25°C				
Percentuale rimasta di conservante				
Acido benzoico	Acido deidroacetico	Fenossietanolo	Acido sorbico	Alcol benzilico
76,25%	44,55%	78,56%	73,43%	85,31%
Detergenza 45°C				
Percentuale rimasta di conservante				
Acido benzoico	Acido deidroacetico	Fenossietanolo	Acido sorbico	Alcol benzilico
72,82%	16,12%	75,50%	68,06%	81,81%
Detergenza Shock				
Percentuale rimasta di conservante				
Acido benzoico	Acido deidroacetico	Fenossietanolo	Acido sorbico	Alcol benzilico
84,30%	62,77%	85,95%	84,55%	91,82%

Tabella 9 - Percentuale residua dei conservanti su detergenza in stabilità.

Risultati

Validazione del metodo

L'identità di ciascun picco è stata confermata in base al tempo di ritenzione (**Tab.6**). Per effettuare la validazione di questo metodo ci si è basati sui requisiti delle linee guida ICH Q2 per la convalida di procedure analitiche (**2**).

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 la robustezza erano inferiori al 2% (**Tab.5**).

Valori limite di rilevazione (0,001 mg/mL per l'acido benzoico, 0,00025 mg/mL per l'acido sorbico, 0,002 mg/mL per l'acido deidroacetico, 0,005 mg/L per il fenossietanolo e 0,015 mg/mL per l'alcol benzilico) (**Tab.3**) e limiti di quantificazione (0,003 mg/mL per l'acido benzoico, 0,0005 mg/mL per l'acido sorbico, 0,006 mg/mL per l'acido deidroacetico, 0,01 mg/mL per il fenossietanolo e 0,03 mg/mL per l'alcol benzilico) (**Tab.4**) indicano una buona sensibilità del metodo.

Applicazione del metodo

I tre prodotti selezionati sono stati analizzati correttamente sfruttando il metodo precedentemente validato; è quindi stato possibile determinare e quantificare le cinque molecole in esame ed è stato possibile valutarne il conseguente cambiamento di concentrazione durante il test.

Dall'analisi organolettica si è evinto come i prodotti posti a 45°C e quelli sottoposti allo *shock* termico, siano quelli che hanno subito una maggior modificazione; il cambiamento di colore è palese, mentre il profumo non ha subito modifiche particolarmente tangibili.

Per quanto riguarda la viscosità, vi è stata una variazione inversamente proporzionale alla temperatura.

Dai risultati ottenuti dalle stabilità delle diverse formulazioni si evince come l'acido deidroacetico sia il conservante, tra quelli testati, più instabile a temperatura ambiente, a 45°C e sottoposto a *shock* termico (**Tabb.7,8,9**).

Possiamo notare come nella crema la concentrazione rilevata di tale conservante sia ridotta del 50% circa (**Tab.8, Fig.4B**), mentre sia nel gel che nella detergenza tale concentrazione si sia ridotta quasi del 90% (**Tab.7, Fig.3B, Tab.9, Fig.5C**).

Il motivo di tale discrepanza tra i dati è in corso di accertamento. Per completare tale studio, si è deciso di sottoporre i campioni post stabilità a *challenge test* e i pacchetti conservanti delle tre preparazioni risultano ancora attivi portando la carica batterica inoculata <10 UFC.

Bibliografia

1. D'Agostinis G, Mignini E (2015) Manuale del cosmetologo. Tecniche nuove:74-78
2. Guideline, ICH Harmonized Tripartite Q2 (R1) 1 (2005) Validation of analytical procedures: text and methodology.
3. Piccini G, Arpa Umbria (2008) Validazione dei metodi di prova e stima dell'incertezza di misura.
4. http://www.masterreach.unina.it/Lezioni%202013_2014/Analischimicatossicologica/02-Analisi%20chimica%20tossicologica-Prof.%20Perissutti-Dr.%20Frecentese.pdf