



Screening quali-quantitativo di allergeni da contatto in fragranze per l'industria cosmetica

Le potenzialità della cromatografia bidimensionale comprehensive basata su modulatore a flusso

Introduzione

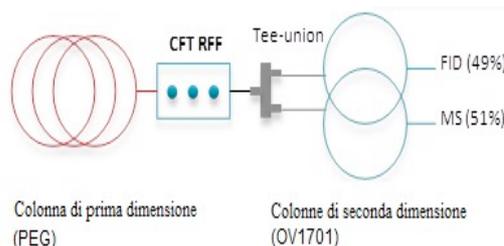
Nel 1999, il "Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products" ha pubblicato una lista di 24 sostanze identificate come allergeni da contatto. A distanza di quattro anni, la Direttiva Europea 2003/15/EC ha regolato tali sostanze per le quali diventa necessaria l'indicazione in etichetta qualora esse superino, nel cosmetico finito, la soglia dello 0.01% (prodotti con risciacquo) o dello 0.001% (prodotti che rimangono a contatto con la pelle).

Il metodo multi-target di quantificazione via GC-MS messo a punto da IFRA (International Fragrance Association), prevede un range operativo tra i 10 ed i 100 ppm; tale metodo è stato oggetto di numerose prove interlaboratorio coordinate dal Centre Européen de Normalisation – CEN, ed è attualmente incluso, nella sua versione finale, nella norma europea EN 16274:2012. "Nel 2011 il "Scientific Committee on Consumer Safety" ha riconsiderato la lista di allergeni da contatto normati precedentemente estendendola a più di 60 composti singoli e circa 30 estratti naturali.

La prospettiva che si delinea oggi per le aziende produttrici e/o utilizzatrici di fragranze, nel quadro della formulazione di cosmetici e prodotti per la cura personale, è quella di dover monitorare sistematicamente un più ampio numero di specie chimiche (sia naturali che di sintesi, inclusi molti isomeri), oltre a doverne determinare con accuratezza le concentrazioni. Il metodo recentemente approntato dalla International Fragrance Association (IFRA) prevede l'utilizzo della gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa a singolo

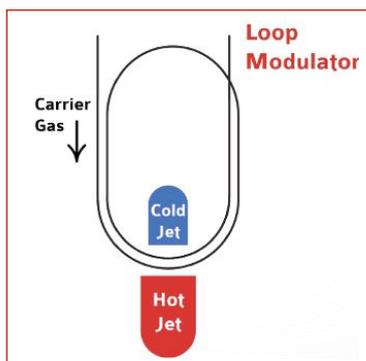
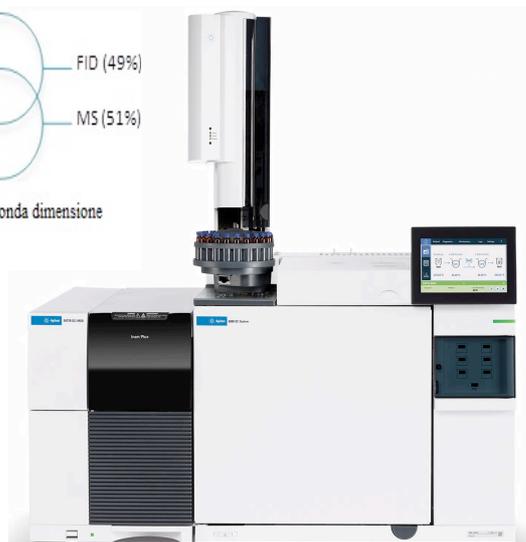
quadrupolo (GC-MSD) per la quantificazione di 57 composti nel range compreso tra 2 e 250 mg/Kg

Nella presente Nota Applicativa vengono illustrate alcune potenzialità della Gascromatografia bidimensionale comprehensive (GC×GC), basata su modulatori a flusso ed accoppiata a rilevatori FID/MSD, per lo screening quali/quantitativo esteso a 57 allergeni per i quali, nell'ambito della Commissione Europea, si è trovato un accordo per l'inclusione nella lista di prossima regolamentazione.



Sopra - Schema del sistema GCxGC-MSD/FID

A fianco - GCxGC-MSD/FID, Agilent



La tecnica GC×GC basata su modulatore termico (loop-type thermal modulator - Zoex), accoppiata al singolo quadrupolo, è stata utilizzata come tecnica di riferimento per la determinazione quantitativa degli allergeni regolamentati dalla Direttiva 2003/15/EC; la validazione di tali metodiche è stata oggetto di pubblicazioni scientifiche su riviste internazionali.

Nell'ottica di ampliare lo spettro di molecole monitorate, evitando contemporaneamente l'utilizzo di azoto liquido, i recenti modulatori a flusso sviluppati da Agilent Technologies, consentono lo screening di tutti i 57 allergeni della lista estesa senza necessità di lavorare con fluidi criogenici. Il sistema proposto prevede l'utilizzo di un "reverse-inject" flow modulator ed un doppio rivelatore FID/MSD. (Fig. 4)

Gli analiti separati in uscita dalla colonna di prima dimensione entrano nel

modulatore riempiendo il loop di raccolta; terminata la fase di caricamento, un flusso di gas ausiliario indirizza il contenuto del loop di caricamento nella direzione opposta (reversed fill/flush). La frazione di campione viene quindi inviata per la separazione nelle due colonne di seconda dimensione collegate a FID e Spettrometro di Massa (Fig. 2). Oltre ad essere caratterizzato da una notevole semplicità di utilizzo e da bassissimi costi di gestione, il modulatore a flusso presenta anche una

elevata riproducibilità: in Tab. I vengono riportati i valori di RSD% relativamente ad aree cromatografiche (volumi) e tempi di ritenzione per molti degli allergeni previsti nella nuova lista estesa .

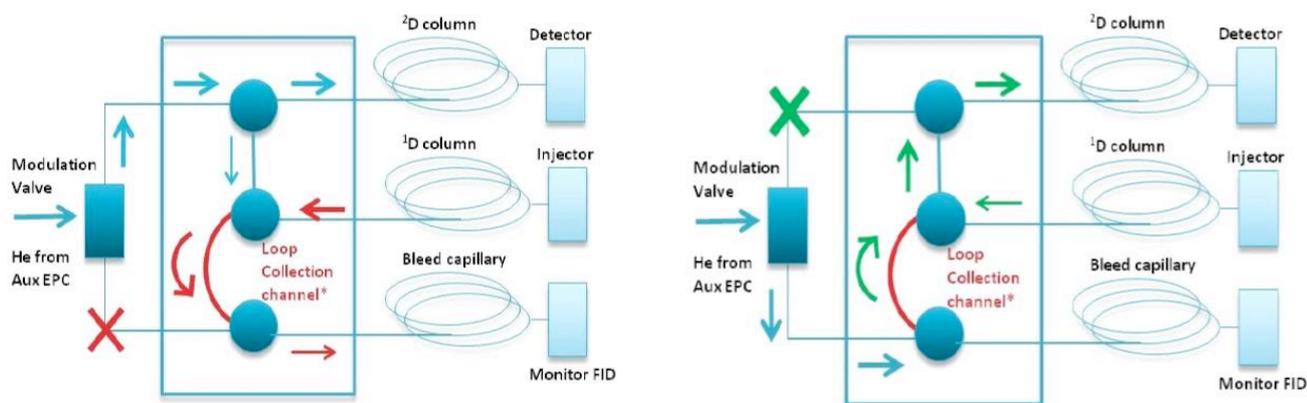


Fig. 4 – Modulatore a flusso, Agilent Technologies e schema differential flow modulation with "reverse fill/flush"

	Retention I		Retention II		Volume Ratio		Percent Response	
	Mean	RSD %	Mean	RSD %	Mean	RSD %	Mean	RSD %
α-Pinene	2.58	1.06	0.91	0.61	1.01	5.29	2.32	5.07
β-Pinene	3.11	1.61	1.02	1.57	0.16	10.25	2.22	7.33
Limonene	4.04	0.34	1.13	0.36	1.07	1.40	2.26	1.96
α-Terpinolene	5.11	0.27	1.25	0.21	0.36	0.57	0.82	0.69
Camphor	8.81	0.15	1.23	0.31	0.91	0.69	2.08	1.06
Benzaldehyde	8.83	0.00	0.73	0.83	0.34	1.50	0.78	0.94
Linalool	9.30	0.00	0.87	0.43	0.80	0.64	1.84	0.74
Linalyl acetate	9.57	0.00	1.33	0.34	0.70	1.41	1.61	1.78
trans-Caryophyllene	10.47	0.00	2.00	0.22	1.16	0.70	2.06	0.66
Menthol	10.97	0.12	0.93	0.59	0.86	0.50	1.97	0.46
Methyl Octinoate	11.13	0.00	1.00	0.38	0.67	0.36	1.53	0.74
Salicylaldehyde	11.53	0.00	0.70	0.37	0.39	1.01	0.91	1.13
Neral	11.70	0.00	1.13	0.23	0.72	0.41	1.65	0.55
α-Terpineol	11.97	0.00	0.88	0.36	1.26	0.54	1.89	0.61
ISTD I	12.37	0.00	0.83	0.31	1.00	0.00	0.00	0.00
Carvone	12.60	0.00	1.02	4.84	0.17	11.84	1.11	12.68
Geranial	12.60	0.00	1.10	3.78	1.20	15.34	1.65	12.26
Geranyl acetate	13.10	0.00	1.21	0.35	0.74	0.68	1.71	0.86
β-Citronellol	13.20	0.00	0.82	0.64	0.76	12.70	1.74	12.80

	Retention I		Retention II		Volume Ratio		Percent Response	
δ-Damascone	13.23	0.00	1.29	0.25	0.99	1.52	2.27	2.03
Methyl salicylate	13.26	0.13	0.81	0.39	0.39	16.32	0.72	19.61
DMBCA	13.27	0.00	1.05	0.26	0.71	1.34	1.63	1.17
α-Damascone	13.67	0.00	1.30	0.35	0.71	0.74	1.63	0.89
β-Damascone	14.08	0.12	1.32	0.29	1.22	2.13	2.81	2.67
β-Damascenone	14.13	0.00	1.18	0.32	0.77	2.79	1.77	2.58
Anethole	14.17	0.00	0.87	0.36	1.11	1.98	1.56	1.45
Geraniol	14.53	0.00	0.75	0.34	1.00	0.83	2.31	1.03
α-Isomethylionone	14.67	0.00	1.48	0.17	0.75	0.64	1.73	0.74
Benzyl alcohol	14.90	0.00	0.55	0.50	0.67	0.73	1.53	0.91
Ebanol I	15.21	0.09	1.13	0.49	0.85	1.14	1.95	1.64
Ebanol II	15.77	0.00	1.07	0.19	0.79	4.13	1.81	4.52
Hydroxy citronellal	16.10	0.00	0.82	0.39	0.60	5.45	1.38	6.06
Cinnamaldehyde	17.53	0.00	0.73	0.72	0.39	2.22	0.91	2.76
Amyl Salicylate	17.64	0.08	1.11	0.74	0.37	13.62	1.59	13.21
Lilial	17.77	0.00	1.09	0.45	1.39	0.74	3.20	0.64
Iso E Super Isomer I	18.07	0.00	1.50	0.30	0.93	0.43	2.13	0.95
Majantol	19.00	0.00	0.74	0.27	1.05	1.05	2.42	0.84
Eugenol	19.50	0.00	0.66	0.57	0.63	0.69	1.44	0.66
Acetyl Cedrene I	20.60	0.00	1.42	0.18	0.83	2.83	1.90	3.40
Eugenyl acetate	20.86	0.08	0.79	1.22	0.61	2.28	1.21	3.83
Amyl cinnamic aldehyde	20.90	0.00	1.00	0.32	1.09	4.73	2.51	5.30
Anisyl alcohol	21.07	0.00	0.55	0.50	0.30	4.96	1.01	5.05
Cinnamyl alcohol	21.17	0.00	0.57	0.73	4.86	2.61	2.32	2.00
Acetyl Cedrene II	21.20	0.00	1.37	0.38	0.44	8.66	0.23	11.90
Musk G II	21.83	0.00	1.30	0.16	2.18	5.96	1.11	3.82
Musk G I	21.93	0.00	1.29	0.29	2.26	4.32	1.07	1.34
Farnesol Isomer I	21.97	0.00	0.89	0.50	1.97	5.69	0.97	2.43
Isoeugenol	22.07	0.00	0.64	0.66	1.63	11.24	1.38	4.95
α-Z-Santalol	22.21	0.08	0.87	0.73	3.43	6.91	1.08	0.94
Farnesol Isomer II	22.35	0.08	0.89	0.96	2.23	6.52	1.00	5.64
Hexyl cinnamic aldehyde	22.37	0.00	1.03	0.48	6.00	12.20	2.93	5.99
Hexadecanolactone	22.57	0.06	1.47	0.26	3.03	2.72	1.49	5.21
Iso Eugenyl acetate	23.17	0.00	0.77	0.53	3.40	6.86	1.67	1.06
β-Z-Santalol	23.33	0.00	0.86	0.37	2.13	3.66	0.80	3.91
Coumarin	23.40	0.00	0.68	0.30	2.14	10.80	1.05	4.44
Lyrar major Isomer	23.73	0.00	0.82	0.25	1.74	5.57	2.00	1.54
Lyrar minor Isomer	23.90	0.00	0.81	0.32	4.60	5.92	0.85	1.79
Amylcinnamic alcohol	24.67	0.06	0.72	0.95	2.08	5.78	1.02	3.74
Vanillin	24.90	0.00	0.56	0.46	2.41	5.84	1.18	1.45
6-Methyl coumarin	25.07	0.00	0.71	0.36	2.89	3.86	1.14	3.36
Benzyl benzoate	25.82	0.07	0.76	1.34	3.26	10.01	1.20	11.60
Benzyl salicylate	27.77	0.00	0.77	0.41	2.33	3.88	1.14	4.15
ISTD 2	29.97	0.00	0.80	0.73	1.00	0.00	0.00	0.00
Sclareol	31.73	0.00	1.00	0.26	2.42	2.12	1.19	7.65
Benzyl cinnamate	32.10	0.00	0.82	0.50	2.31	2.53	1.14	7.61

Tab. 1 Valori di RSD% aree cromatografiche (volumi) e tempi di ritenzione

Nell'ambito dell'analisi di fragranze complesse (cfr Fig. 5), risulta evidente come la capacità separativa del sistema permetta di minimizzare l'incidenza delle co-eluzioni, aprendo così alla possibilità di utilizzare il canale FID per l'analisi quantitativa mediante fattori di risposta relativi. La contemporanea presenza del canale di acquisizione in massa consente inoltre la conferma dell'identità degli analiti, nonché l'identificazione di sostanze incognite.

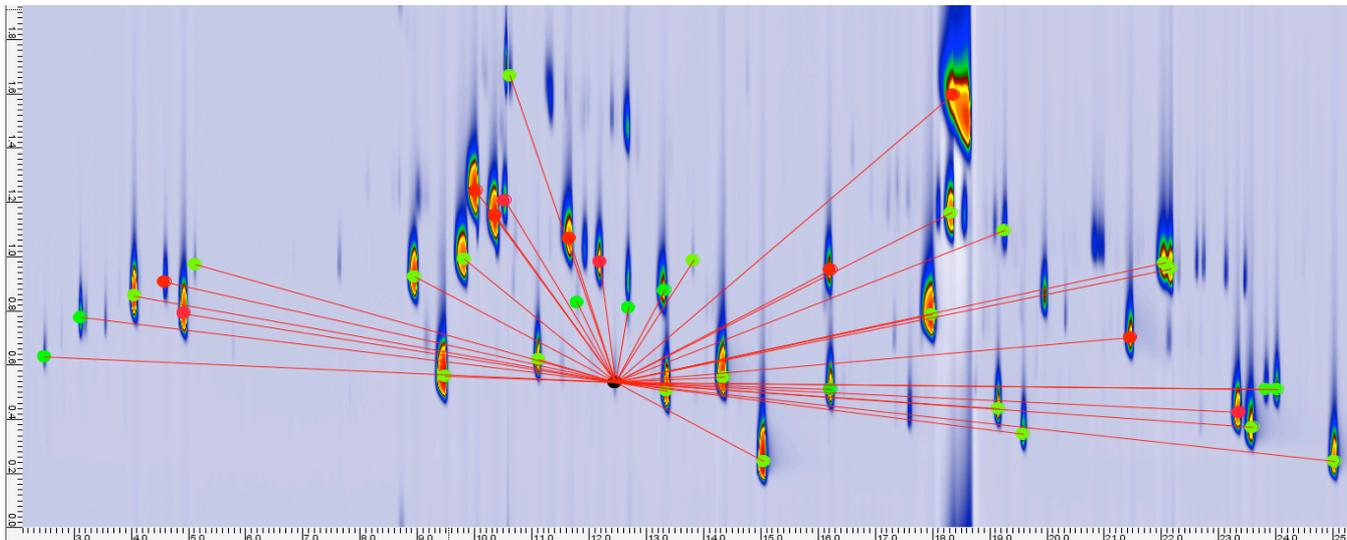


Fig. 5 – Fragranza grezza per ammorbidente diluita 1/5 (cfr protocollo IFRA)

L'accuratezza quantitativa del metodo di screening degli allergeni è stata validata analizzando il campione rappresentato in Fig. 2 e confrontando i risultati ottenuti utilizzando i due modulatori disponibili per le piattaforme Agilent: modulatore a fluidi criogenici (loop-type thermal modulator) e reverse-inject flow modulator. Prendendo come riferimento la quantificazione con la piattaforma classica, l'errore assoluto non eccede mai il 15 % (Fig. 6).

L'impiego del modulatore a flusso per l'analisi di miscele complesse, nella sua configurazione "reverse-inject" accoppiata a detector FID/MSD, consente di ottenere risultati estremamente soddisfacenti in termini qualitativi e quantitativi.

Inoltre, l'assenza di fluidi criogenici unitamente all'estendibilità ad un range di volatilità più ampio, lo rende più versatile e di più immediato utilizzo rispetto al modulatore termico, garantendo al contempo la corrispondenza in termini di accuratezza e precisione con la metodica di riferimento.

Si ringrazia il Dipartimento di Scienza e Tecnologia del Farmaco - Università degli Studi di Torino, nelle persone della Prof.ssa Chiara Cordero e del Prof. Carlo Bicchi, per aver messo a disposizione i dati utilizzati nella presente nota applicativa e per averne contribuito alla stesura.

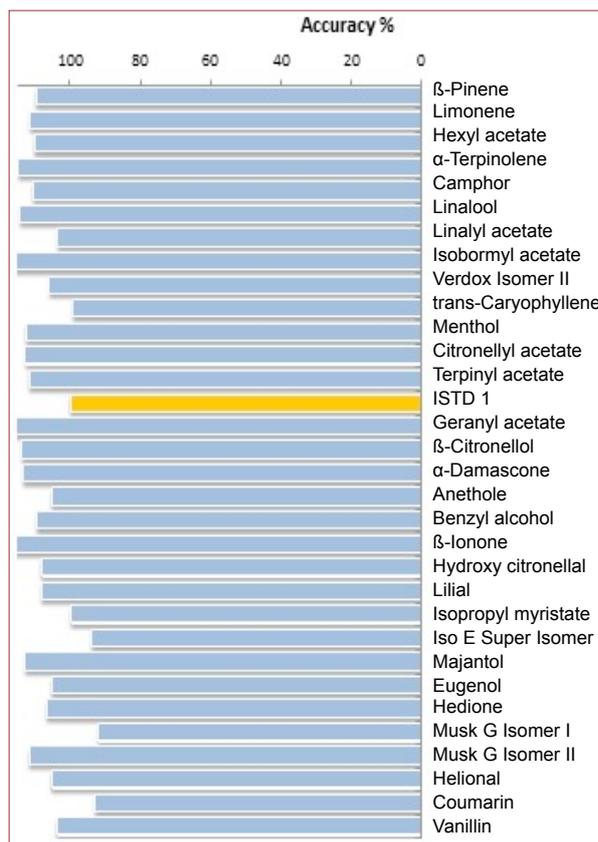


Fig. 6 – Comparazione quantitativa della tecnica "Flow" rispetto al riferimento "Thermal"

References

- PJ Marriott et al. Trends Anal Chem 34 (2012) 1-21
- PQ Tranchida et al. Trends Anal. Chem. 30 (2011) 1347-1461
- C Cordero et al. J. Chromatogr. A 1147 (2015) 79-95