

SEXTA DIRECTIVA 95/32/CE DE LA COMISIÓN

de 7 de julio de 1995

relativa a los métodos de análisis necesarios para el control de la composición de los productos cosméticos

(Texto pertinente a los fines del EEE)

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Europea,

Vista la Directiva 76/768/CEE del Consejo, de 27 de julio de 1976, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en materia de productos cosméticos⁽¹⁾, cuya última modificación la constituye la Directiva 94/32/CE de la Comisión⁽²⁾, y, en particular, el apartado 1 de su artículo 8,

Considerando que la Directiva 76/768/CEE prevé controles oficiales de los productos cosméticos con el fin de comprobar si se respetan las condiciones previstas en las disposiciones comunitarias relativas a la composición de los productos cosméticos;

Considerando que procede establecer lo más rápidamente posible todos los métodos de análisis necesarios y que algunos de ellos ya han sido fijados con la adopción de la Directiva 80/1335/CEE de la Comisión⁽³⁾, modificada por la Directiva 87/143/CEE⁽⁴⁾, de la Directiva 82/434/CEE⁽⁵⁾, modificada por la Directiva 90/207/CEE⁽⁶⁾, y de las Directivas 83/514/CEE⁽⁷⁾, 85/490/CEE⁽⁸⁾ y 93/73/CEE⁽⁹⁾ de la Comisión;

Considerando que la identificación y determinación del ácido benzoico, del ácido 4-hidroxibenzoico, del ácido sórbico, del ácido salicílico y del ácido propiónico en los productos cosméticos, así como la identificación y determinación de la hidroquinona, el éter monometílico de la hidroquinona, el éter monoetilico de la hidroquinona y el éter monobencílico de la hidroquinona en los productos cosméticos constituyen una sexta etapa;

Considerando que las medidas previstas en la presente Directiva se ajustan al dictamen del Comité para la adaptación al progreso técnico de la Directiva 76/768/CEE,

HA ADOPTADO LA PRESENTE DIRECTIVA:

Artículo 1

Los Estados miembros adoptarán todas las medidas necesarias a fin de que, con ocasión de los controles oficiales de los productos cosméticos:

— la identificación y determinación del ácido benzoico, del ácido 4-hidroxibenzoico, del ácido sórbico, del ácido salicílico y del ácido propiónico,

— la identificación y determinación de la hidroquinona, del éter monometílico de la hidroquinona, del éter monoetilico de la hidroquinona y del éter monobencílico de la hidroquinona,

se efectúen con arreglo a los métodos descritos en el Anexo.

Artículo 2

1. Los Estados miembros adoptarán las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas necesarias para cumplir la presente Directiva a más tardar el 30 de septiembre de 1996. Informarán inmediatamente de ello a la Comisión.

Cuando los Estados miembros adopten dichas disposiciones, éstas harán referencia a la presente Directiva o irán acompañadas de dicha referencia en su publicación oficial. Los Estados miembros establecerán las modalidades de la mencionada referencia.

2. Los Estados miembros comunicarán a la Comisión el texto de las disposiciones de Derecho interno que adopten en el ámbito regulado por la presente Directiva.

Artículo 3

La presente Directiva entrará en vigor el vigésimo día siguiente al de su publicación en el *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*.

Artículo 4

Los destinatarios de la presente Directiva serán los Estados miembros.

Hecho en Bruselas, el 7 de julio de 1995.

Por la Comisión

Emma BONINO

Miembro de la Comisión

⁽¹⁾ DO nº L 262 de 27. 9. 1976, p. 169.

⁽²⁾ DO nº L 181 de 15. 7. 1994, p. 31.

⁽³⁾ DO nº L 383 de 31. 12. 1980, p. 27.

⁽⁴⁾ DO nº L 57 de 27. 2. 1987, p. 56.

⁽⁵⁾ DO nº L 185 de 30. 6. 1982, p. 1.

⁽⁶⁾ DO nº L 108 de 28. 4. 1990, p. 92.

⁽⁷⁾ DO nº L 291 de 24. 10. 1983, p. 9.

⁽⁸⁾ DO nº L 295 de 7. 11. 1985, p. 30.

⁽⁹⁾ DO nº L 231 de 14. 9. 1993, p. 34.

ANEXO

I. IDENTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DEL ÁCIDO BENZOICO, DEL ÁCIDO 4-HIDROXI-BENZOICO, DEL ÁCIDO SÓRBICO, DEL ÁCIDO SALICÍLICO Y DEL ÁCIDO PROPIONICO EN LOS PRODUCTOS COSMÉTICOS**1. Objeto y campo de aplicación**

Este método se aplica a la identificación y determinación del ácido benzoico, del ácido 4-hidroxibenzoico, del ácido sórbico, del ácido salicílico y del ácido propiónico en los productos cosméticos. Mediante procedimientos separados se describe la identificación de estos conservantes, la determinación del ácido propiónico y la determinación del ácido 4-hidroxibenzoico, del ácido salicílico, del ácido sórbico y del ácido benzoico.

2. Definición

El contenido en ácido benzoico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido salicílico, ácido sórbico y ácido propiónico determinado mediante este método se expresa en porcentajes en masa de los ácidos libres.

A. IDENTIFICACIÓN**1. Principio**

Tras la extracción ácido/base de los conservantes, el extracto se analiza por cromatografía en capa fina (CCF), mediante derivatización en placa. Según los resultados, se confirma la identificación por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) o por CG (cromatografía de gases) para el ácido propiónico.

2. Reactivos

- 2.1. Norma general: Todos los reactivos deberán ser de calidad analítica. El agua utilizada deberá ser destilada, o al menos de pureza equivalente.
- 2.2. Acetona
- 2.3. Dietiléter
- 2.4. Acetonitrilo
- 2.5. Tolueno
- 2.6. n-Hexano
- 2.7. Parafina líquida
- 2.8. Ácido clorhídrico 4M
- 2.9. Hidróxido potásico 4M, disolución acuosa
- 2.10. Cloruro cálcico ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- 2.11. Carbonato de Litio (Li_2CO_3)
- 2.12. 2-Bromo-2'-acetonaftona
- 2.13. Ácido 4-Hidroxibenzoico
- 2.12. Ácido salicílico
- 2.15. Ácido benzoico
- 2.16. Ácido sórbico
- 2.17. Ácido propiónico

- 2.18. Disoluciones de referencia:
Preparar disoluciones al 0,1 % (m/v) (100 mg/100 ml) de cada uno de los cinco conservantes (2.13 a 2.17) en dietiléter.
- 2.19. Reactivo de derivatización:
Disolución al 0,5 % (m/v) de 2-bromo-2'-acetonaftona (2.12) en acetonitrilo (2.4), (50 mg/10 ml). Esta disolución deberá prepararse semanalmente y guardarse en frigorífico.
- 2.20. Disolución catalizadora:
Disolución al 0,3 % de carbonato de litio (2.11) en agua (300 mg/100 ml). Esta disolución se prepara en el momento de su uso.
- 2.21. Fase móvil:
Tolueno (2.5)/acetona (2.2) (20:0,5, v/v)
- 2.22. Parafina líquida (2.7)/n-hexano (2.6) (1:2, v/v)

3. Material y equipo instrumental

Material habitual de laboratorio

- 3.1. Baño de agua (baño María) capaz de mantener una temperatura de 60 °C.
- 3.2. Cámara cromatográfica
- 3.3. Lámpara de luz ultravioleta de 254 y 366 nm
- 3.4. Placas de capa fina, Kieselgel 60, sin indicador de fluorescencia, de 20 × 20 cm, de 0,25 mm de espesor con zona de concentración de 2,5 × 20 cm (Merck 11845 o equivalente).
- 3.5. Microjeringa de 10 µl
- 3.6. Microjeringa de 25 µl
- 3.7. Estufa capaz de mantener temperaturas de hasta 105 °C
- 3.8. Tubos de vidrio de 50 ml con tapón de rosca
- 3.9. Filtro de papel Schleicher & Schull, Weissband nº 5892, o equivalente, de 90 mm de diámetro
- 3.10. Papel indicador universal de pH, pH 1-11
- 3.11. Viales de vidrio de 5 ml, para muestra
- 3.12. Evaporador rotatorio (Rotavapor o equivalente)
- 3.13. Placa calefactora

4. Procedimiento

- 4.1. Preparación de la muestra:
Pesar aproximadamente 1 gramo de la muestra en un tubo de vidrio de 50 ml con tapón de rosca (3.8). Añadir 4 gotas de ácido clorhídrico 4M (2.8) y 40 ml de acetona (2.2). Para los productos fuertemente básicos, como el jabón de tocador, se añadirán 20 gotas de ácido clorhídrico 4M (2.8). Asegurarse de que el pH es aproximadamente 2, utilizando papel indicador (3.10). Cerrar el tubo y agitarlo enérgicamente durante un minuto.
- Si fuera necesario, para facilitar la extracción de los conservantes en la fase de acetona, calentar suavemente la mezcla hasta los 60 °C aproximadamente para fundir la fase lipídica.
- Enfriar la disolución a la temperatura ambiente y filtrarla a través de filtro de papel (3.9) en un matraz cónico.

Transvasar 20 ml de filtrado a un matraz cónico de 200 ml, añadir 20 ml de agua y mezclar. Ajustar el pH de la mezcla a aproximadamente 10 con hidróxido potásico 4M (2.9). Utilizar papel indicador (3.10) para medir el pH.

Añadir 1 g de cloruro cálcico (2.10) y agitar vigorosamente. Filtrar a través de un filtro de papel (3.9) en un embudo de separación de 250 ml que contenga 75 ml de éter dietílico (2.3) y agitar vigorosamente durante un minuto. Dejar separar y recoger la capa acuosa en un matraz cónico de 250 ml. Desechar la capa etérea. Utilizando papel indicador (3.10), ajustar el pH de la disolución acuosa a aproximadamente 2 con ácido clorhídrico 4M (2.8). Añadir 10 ml de éter dietílico (2.3), tapar el matraz y agitar vigorosamente durante 1 minuto. Dejar separar y pasar la capa etérea a un evaporador rotatorio (3.12). Desechar la capa acuosa.

Evaporar casi a sequedad la capa etérea y redissolver el residuo en 1 ml de éter etílico (2.3). Transvasar la disolución obtenida a un vial (3.11).

4.2. Cromatografía en capa fina:

Para cada una de las disoluciones de referencia y muestra que haya que cromatografiar, aplicar aproximadamente 3 µl de disolución de carbonato de litio (2.20) con una microjeringa (3.5) a distancias iguales de la línea de partida en la zona de concentración de una placa de CCF (3.4) y secar en una corriente de aire frío.

Colocar la placa CCF sobre una placa calefactora (3.13) calentada a 40 °C con el fin de mantener las manchas lo más pequeñas posible. Con una microjeringa (3.5) aplicar 10 µl de cada una de las disoluciones de referencia (2.18) y de muestra (4.1) en la línea de partida sobre los puntos exactos en los que se aplicó la disolución de carbonato de litio.

Finalmente aplicar aproximadamente 15 µl del reactivo de derivatización (2.19) (disolución de 2-bromo-2'-acetonaftona), también sobre los puntos exactos en los que se aplicaron las disoluciones de referencia, muestra y carbonato de litio.

Calentar la placa de CCF en una estufa (3.7) a 80 °C durante 45 minutos. Cuando se haya enfriado, diluir la placa en una cámara (3.2) que se haya equilibrado durante 15 minutos (sin utilizar revestimiento interior de papel de filtro), utilizando como fase móvil (tolueno/acetona) (2.21), hasta que el frente de disolvente alcance la distancia de 15 cm (80 minutos aproximadamente).

Secar la placa en una corriente de aire frío y examinar a la luz ultravioleta (3.3) las manchas obtenidas. Para hacer resaltar la fluorescencia de las manchas débiles, puede bañarse la placa CCF en parafina/n-hexano (2.22).

5. Identificación

Calcular el R_f para cada mancha.

Comparar el R_f y el comportamiento bajo exposición a luz ultravioleta de las manchas obtenidas con las disoluciones de referencia.

Establecer una conclusión preliminar sobre la presencia e identificación de los conservantes presentes. Realizar la CLAR que se describe en la sección B, o cuando parezca que hay ácido propiónico, la CG descrita en la sección C. Comparar los tiempos de retención obtenidos en los cromatogramas correspondientes a las disoluciones de muestra con los de las disoluciones de referencia.

Combinar los resultados de la CCF y CLAR o CG y basar la identificación final de los conservantes presentes en la muestra sobre dichos resultados.

B. DETERMINACIÓN DEL ÁCIDO BENZOICO, ÁCIDO 4-HIDROXIBENZOICO, ÁCIDO SÓRBICO Y ÁCIDO SALICÍLICO

1. Principio

Después de la acidificación, se extrae la muestra con una mezcla de etanol y de agua. Tras la filtración, los conservantes se determinan mediante cromatografía líquida de alta resolución.

2. Reactivos

2.1. Todos los reactivos deben ser de calidad analítica y aptos para CLAR, cuando proceda. El agua utilizada debe ser destilada o al menos de pureza equivalente.

2.2. Etanol absoluto

2.3. Ácido 4-hidroxibenzoico

- 2.4. Ácido salicílico
- 2.5. Ácido benzoico
- 2.6. Ácido sórbico
- 2.7. Acetato sódico ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)
- 2.8. Ácido acético, $\alpha_4^{20} = 1,05$ g/ml
- 2.9. Acetonitrilo
- 2.10. Ácido sulfúrico, 2 M
- 2.11. Hidróxido potásico disolución acuosa 0,2 M
- 2.12. Ácido 2-metoxibenzoico
- 2.13. Mezcla de etanol/agua:
Mezclar 9 volúmenes de etanol (2.2) y un volumen de agua (2.1).
- 2.14. Disolución de patrón interno:
Preparar una disolución que contenga aproximadamente 1 g de ácido 2-metoxibenzoico (2.12) en 500 ml de mezcla de etanol/agua (2.13).
- 2.15. Fase móvil para la CLAR:
 - 2.15.1. Tampón acetato: a 1 litro de agua añadir 6,35 g de acetato sódico (2.7) y 20,0 ml de ácido acético (2.8) y mezclar.
 - 2.15.2. Preparar la fase móvil mezclando 9 volúmenes de tampón acetato (2.15.1) y 1 volumen de acetonitrilo (2.9).
- 2.16. Disolución de referencia concentrada de conservantes:
Pesar con precisión aproximadamente 0,05 g de ácido 4-hidroxibenzoico (2.3), 0,2 g de ácido salicílico (2.4), 0,2 g de ácido benzoico (2.5) y 0,05 g de ácido sórbico (2.6) en un matraz aforado de 50 ml y completar hasta el volumen con la mezcla de etanol/agua (2.13). Conservar esta disolución en el frigorífico. La disolución es estable durante una semana.
- 2.17. Disoluciones de referencia diluidas de conservantes:
Transferir respectivamente 8,00; 4,00; 2,00; 1,00 y 0,50 ml de la disolución concentrada (2.16) a matraces aforados de 20 ml. Añadir a cada matraz aforado 10,00 ml de disolución de patrón interno (2.14), 0,5 ml de ácido sulfúrico 2 M (2.10), y completar hasta el volumen con la mezcla de etanol/agua (2.13). Estas disoluciones deben ser recientemente preparadas.
3. **Material y equipo instrumental**
Material habitual de laboratorio que no se detalla, y además:
 - 3.1. Baño María, capaz de mantener la temperatura a 60 °C.
 - 3.2. Cromatógrafo de líquidos de alta resolución, dotado de detector de ultravioleta de longitud de onda variable y de bucle de inyección de 10 μl .
 - 3.3. Columna:
Acero inoxidable, de 12,5 a 25 cm de longitud, 4,6 mm de diámetro interno, rellena de Nucleosil 5C18 o equivalente.
 - 3.4. Filtro de papel Schleicher y Schull, Weissband, nº 5892, o equivalente, de 90 mm de diámetro.
 - 3.5. Tubos de vidrio de 50 ml con tapón de rosca.

3.6. Viales de vidrio de 5 ml, para muestra.

3.7. Trozos de porcelana «carborundum» de 2 a 4 mm, o equivalente.

4. Procedimiento

4.1. Preparación de la muestra:

4.1.1. Preparación de la muestra sin añadir el patrón interno:

Pesar 1 g de la muestra en un tubo de vidrio de 50 ml con tapón de rosca (3.5). Pipetear en el tubo 1,00 ml de ácido sulfúrico 2 M (2.10) y luego 40,00 ml de mezcla de etanol/agua (2.13). Añadir aproximadamente 1 g de trozos de porcelana (3.7), cerrar el tubo y agitar vigorosamente al menos durante 1 minuto hasta obtener una suspensión homogénea. Colocar el tubo en baño María (3.1) y mantenerlo exactamente 5 minutos a 60 °C para facilitar la extracción de los conservantes en la fase etanólica.

Enfriar el tubo inmediatamente en una corriente de agua fría y conservar el extracto a 5 °C durante una hora.

Filtrar el extracto con filtro de papel (3.4). Transferir aproximadamente 2 ml del filtrado a un vial de muestra (3.6). Conservar el filtrado a 5 °C y efectuar la determinación por CLAR en las 24 horas que siguen a la preparación de la muestra.

4.1.2. Preparación de la muestra con la adición de patrón interno:

Pesar con precisión de 3 decimales 1 g $\pm 0,1$ g (a gramos) de la muestra en un tubo de vidrio de 50 ml con tapón de rosca (3.5). Pipetear 1,00 ml de ácido sulfúrico 2 M (2.10) y 30,0 ml de mezcla de etanol/agua (2.13). Añadir aproximadamente 1 g de trozos de porcelana (3.7) y 10,00 ml de disolución patrón interno (2.14). Cerrar el tubo y agitar vigorosamente al menos durante un minuto, hasta obtener una suspensión homogénea. Colocar el tubo en un baño de agua (3.1) y mantenerlo exactamente 5 minutos a 60 °C para facilitar la extracción de los conservantes en la fase etanólica.

Enfriar el tubo inmediatamente en una corriente de agua fría a conservar el extracto a 5 °C durante una hora.

Filtrar el extracto con papel de filtro (3.4). Transferir aproximadamente 2 ml del filtrado a un vial de muestra (3.6). Conservar el filtrado a 5 °C y efectuar la determinación por CLAR dentro de las 24 horas que siguen a la preparación de la muestra.

4.2. Cromatografía líquida de alto rendimiento:

Fase móvil: acetonitrilo/tapón acetato (2.15).

Ajustar la velocidad de flujo de la fase móvil en la columna a 2,0 ml/minuto $\pm 0,5$ ml/minuto.

Fijar la longitud de onda del detector en 240 nm.

4.2.1. Calibración:

Injectar 10 μ l de cada una de las disoluciones de referencia de los conservantes (2.17) en el cromatógrafo de líquidos (3.2). Para cada disolución determinar la relación entre las alturas de los picos de los conservantes investigados y la altura del pico del patrón interno en los cromatogramas obtenidos. Trazar la curva de calibrado para cada conservante, relacionando la altura de cada pico con la concentración de cada disolución de referencia.

Cerciorarse de que en el procedimiento de calibración, se obtiene una respuesta lineal para las disoluciones patrón.

4.2.2. Determinación:

Injectar 10 μ l del filtrado de la muestra (4.1.1) en el cromatógrafo de líquidos (3.2) y registrar el cromatograma. Injectar 10 μ l de disolución conservante patrón (2.17) y registrar el cromatograma. Comparar los cromatogramas obtenidos. Si en el cromatograma del filtrado de la muestra (4.1.1) no aparece un pico con aproximadamente el mismo tiempo de retención que el ácido 2-metoxibenzoico (patrón interno recomendado), injectar 10 μ l del filtrado de la muestra con adición de patrón interno (4.1.2) en el cromatógrafo de líquidos y registrar el cromatograma.

Si se observa presencia de un pico en el cromatograma del filtrado de la muestra (4.1.1) con el mismo tiempo de retención que el ácido 2-metoxibenzoico se elegirá otro patrón interno apropiado. (Si alguno de los conservantes objeto de investigación no aparece en el cromatograma, podrá usarse como patrón interno.)

Cerciorarse de que los cromatogramas obtenidos para las disoluciones de referencia y muestra cumplen los siguientes requisitos:

— la separación de los picos del par peor resuelto, será al menos 0,90. (Para definición de separación de picos ver figura 1.)

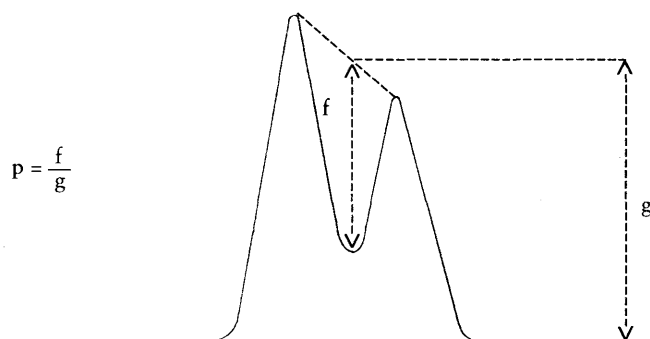


Figura 1: Separación de los picos

Si no se consigue la separación necesaria, deberá usarse una columna más eficaz, o ajustar la composición de la fase móvil hasta conseguirlo;

- el factor de asimetría A_s de todos los picos obtenidos fluctuará entre 0,9 y 0,15. (Para definir el factor de asimetría véase la figura 2).

Para registrar el cromatograma con el fin de determinar el factor de asimetría, se recomienda una velocidad del papel de al menos 2 cm/minuto;

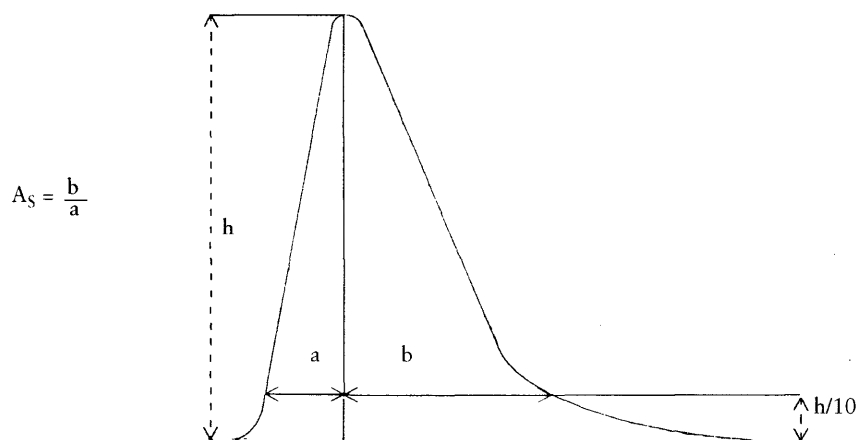


Figura 2: Factor de asimetría del pico

- la línea base deberá ser uniforme.

5. Cálculo

Utilizar las relaciones entre las alturas de los picos de los conservantes investigados y la altura del pico de ácido 2-metoxibenzoico (patrón interno), así como la curva de calibrado para calcular la concentración de los conservantes ácidos en la disolución de muestra.

Calcular el contenido en la muestra de ácido benzoico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido sórbico o ácido salicílico.

Expresar los resultados en porcentaje en masa (x_i) mediante la fórmula:

$$x_i \% (m/m) = \frac{100 \cdot 20 \cdot b}{10^6 \cdot a} = \frac{b}{500 \cdot a}$$

Siendo:

a = masa (g) de la porción analizada (4.1.2)

b = la concentración ($\mu\text{g/ml}$) del conservante en el filtrado de la muestra (4.1.2), obtenida de la curva de calibrado.

6. Repetibilidad ⁽¹⁾

Para un contenido en ácido 4-hidroxibenzoico de 0,40 %, la diferencia entre los resultados de dos determinaciones efectuadas paralelamente en la misma muestra no debería exceder de un valor absoluto de 0,035 %.

Para un contenido en ácido benzoico de 0,50 %, la diferencia entre los resultados de dos determinaciones efectuadas paralelamente en la misma muestra no debería exceder de un valor absoluto de 0,050 %.

Para un contenido de ácido salicílico de 0,50 %, la diferencia entre los resultados de dos determinaciones efectuadas paralelamente en la misma muestra no debería exceder de un valor absoluto de 0,045 %.

Para un contenido en ácido sórbico de 0,60 %, la diferencia entre los resultados de dos determinaciones efectuadas paralelamente en la misma muestra no debería exceder de un valor absoluto de 0,035 %.

7. Observaciones

7.1. Los resultados del ensayo de robustez realizados sobre el método indicaron que la cantidad de ácido sulfúrico añadido para extraer los ácidos de la muestra es crítica, y que los límites para la cantidad de muestra empleada deberán mantenerse dentro del margen recomendado.

7.2. Si se desea puede utilizarse una precolumna.

C. DETERMINACIÓN DEL ÁCIDO PROPIÓNICO**1. Objeto y campo de aplicación**

Este método se aplica a la determinación del ácido propiónico, concentración máxima del 2 % (m/m) en los productos cosméticos.

2. Definición

El contenido del ácido propiónico determinado por este método se expresa en porcentajes en masa (% m/m) del producto.

3. Principio

Tras la extracción del ácido propiónico del producto, la determinación se realiza por cromatografía de gases utilizando ácido 2-entilpropiónico como patrón interno.

4. Reactivos

Todos los reactivos deberán ser de calidad analítica. El agua utilizada deberá ser destilada, o al menos de calidad equivalente.

4.1. Etanol 96 % (v/v)

4.2. Ácido propiónico

4.3. Ácido 2-metilpropiónico

4.4. Ácido ortofosfórico, 10 % (m/v)

4.5. Disolución de ácido propiónico:

Pesar con precisión aproximadamente 1,00 g (p gramos) de ácido propiónico y completar a volumen con etanol hasta 50 ml (4.1).

4.6. Disolución de patrón interno:

Pesar con precisión aproximadamente 1,00 g (en gramos) de ácido 2-metilpropiónico y completar el volumen en un matraz aforado de 50 ml con etanol (4.1).

⁽¹⁾ ISO 5725.

5. Material y equipo instrumental

- 5.1. Material habitual de laboratorio:
- 5.2. Cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama.
- 5.3. Tubo de vidrio (20 × 150 mm) con tapón de rosca.
- 5.4. Baño de agua capaz de mantener una temperatura de 60 °C.
- 5.5. Jeringa de vidrio de 10 ml con filtro de membrana (diámetro del poro: 0,45 µm).

6. Procedimiento**6.1. Preparación de la muestra:****6.1.1. Preparación de la muestra sin patrón interno:**

En un tubo de vidrio con tapón de rosca (5.3) pesar aproximadamente 1 g de la muestra. Añadir 0,5 ml de ácido fosfórico (4.4) y 9,5 ml de etanol (4.1).

Cerrar el tubo y agitar vigorosamente. Si es necesario, colocar el tubo en el baño de agua a 60 °C (5.4) durante 5 minutos, para disolver la fase lipídica completamente. Enfriar rápidamente bajo corriente de agua. Filtrar parte de la disolución sobre un filtro de membrana (5.5). Cromatografiar el filtrado el mismo día.

6.1.2. Preparación de la muestra con patrón interno:

En un tubo de vidrio (5.3) pesar con precisión de tres decimales 1 g $\pm$ 0,1 g (a gramos) de la muestra. Añadir 0,5 ml de ácido fosfórico (4.4), 0,50 ml de disolución de patrón interno (4.6) y 9 ml de etanol (4.1). Cerrar el tubo y agitar vigorosamente. Si es necesario, poner el tubo en el baño de agua a 60 °C (5.4) durante 5 minutos para disolver la fase lipídica. Enfriar rápidamente bajo corriente de agua. Filtrar parte de la disolución sobre un filtro de membrana (5.5). Cromatografiar el filtrado el mismo día.

6.2. Condiciones de la cromatografía de gases

Se recomiendan las condiciones siguientes:

Columna:

Tipo	Acero inoxidable
Longitud	2 m
Diámetro	1/8"
Relleno	10 % SP TM 1000 (o equivalente) + 1 % H ₃ PO ₄ sobre Chromosorb WAW, de 100-120 de malla.

Temperatura:

Inyector	200 °C
Columna	120 °C
Detector	200 °C

Gas portador:

Nitrógeno	
Velocidad de flujo	25 ml/min

6.3. Cromatografía**6.3.1. Calibración:**

En una serie de matraces aforados de 20 ml pipetear 0,25; 0,50; 1,00; 2,00 y 4,00 ml respectivamente de la disolución de ácido propiónico (4.5). En cada matraz pipetear 1,00 ml de disolución de patrón interno; completar a volumen con etanol (4.1) y mezclar.

Las disoluciones preparadas de esta forma contienen en mg/ml de ácido 2-metilpropiónico como patrón interno (es decir, 1 mg/ml si e = 1,000) y p/4, p/2, p, 2p, 4p mg/ml de ácido propiónico (es decir 0,25, 0,50, 1,00, 2,00, 4,00 mg/ml si p = 1,000).

Injectar 1 µl de cada una de estas disoluciones y obtener la curva de calibración representando gráficamente la relación de masas de ácido propiónico/ácido 2-metilpropiónico en el eje de las X y la relación de sus correspondientes áreas de los picos en el eje de las abscisas.

Preparar 3 inyecciones de cada disolución y calcular la media de la relación del área de los picos.

6.3.2. Determinación:

Injectar 1 µl de muestra filtrada (6.1.1). Comparar el cromatograma con el de la disolución patrón (6.3.1). Si un pico tiene aproximadamente el mismo tiempo de retención que el ácido 2-metilpropiónico, cambiar el patrón interno. Si no se observa ninguna interferencia, inyectar 1 µl de la disolución filtrada (6.1.2) y medir las áreas del pico de ácido propiónico y del pico de patrón interno.

Hacer tres inyecciones de cada disolución y calcular la media de la relación del área de los picos.

7. Cálculos

7.1. A partir de la curva de calibración obtenida en 6.3.1 determinar la relación de masa (K) correspondiente a la relación del área de los picos calculada en 6.3.2.

7.2. A partir de la relación de masa así obtenida, calcular el contenido de ácido propiónico de la muestra (X), en porcentaje de masa mediante la fórmula:

$$x \% (m/m) = K \frac{0,5 \cdot 100 \cdot e}{50 \cdot a} = K \frac{e}{a}$$

Donde:

K = relación calculada en 7.1,

a = masa en gramos de la muestra pesada en 6.1.2.

e = masa en gramos de la disolución de patrón interno, pesada en 4.6.

Redondear los resultados a un decimal.

8. Repetibilidad ⁽¹⁾

Para un contenido de ácido propiónico del 2 % (m/m), la diferencia entre los resultados de dos determinaciones en paralelo efectuadas sobre la misma muestra no deberá sobrepasar el 0,12 %.

II. IDENTIFICACIÓN Y DETECCIÓN DE HIDROQUINONA, HIDROQUINONA MONOMETILÉTER, HIDROQUINONA MONOETILÉTER E HIDROQUINONA MONOBENCILÉTER EN LOS PRODUCTOS COSMÉTICOS

A. IDENTIFICACIÓN

1. Objeto y campo de aplicación

Este método describe la detección y la identificación de hidroquinona, hidroquinona monometiléter, hidroquinona monoetiléter e hidroquinona monobenciléter (monobenzona) en los productos cosméticos para aclarar la piel.

2. Principio

La hidroquinona y sus éteres se identifican por medio de cromatografía en capa fina (CCF).

3. Reactivos

Todos los reactivos deben ser de calidad analítica.

⁽¹⁾ ISO 5725.

- 3.1. Etanol, 96 % (v/v)
- 3.2. Cloroformo
- 3.3. Dietiléter
- 3.4. Fase móvil: Cloroformo/dietiléter, 66 + 33 (V/V)
- 3.5. Amoníaco, 25 % (m/m) ($d_4^{20} = 0,91$ g/ml)
- 3.6. Ácido ascórbico
- 3.7. Hidroquinona
- 3.8. Hidroquinona monometiléter
- 3.9. Hidroquinona monoetiléter
- 3.10. Hidroquinona monobenciléter (monobenzona)
- 3.11. Disoluciones de referencia

Las siguientes disoluciones de referencia deben haberse preparado recientemente y son estables durante un día.

 - 3.11.1. Pesar 0,05 g de hidroquinona (3.7) en un tubo de ensayo graduado de 10 ml. Añadir 0,25 g de ácido ascórbico (3.6) y 5 ml de etanol (3.1). Añadir amoníaco (3.5) hasta que el pH sea 10 y diluir a 10 ml con etanol (3.1).
 - 3.11.2. Pesar 0,05 g de hidroquinona monometiléter (3.8) en un tubo de ensayo graduado de 10 ml. Añadir 0,250 g de ácido ascórbico (3.6) y 5 ml de etanol (3.1). Añadir amoníaco (3.5) hasta que el pH sea 10 y diluir a 10 ml con etanol (3.1).
 - 3.11.3. Pesar 0,05 g de hidroquinona monoetiléter (3.9) en un tubo de ensayo graduado de 10 ml. Añadir 0,250 g de ácido ascórbico (3.6) y 5 ml de etanol (3.1). Añadir amoníaco (3.5) hasta que el pH sea 10 y diluir a 10 ml con etanol (3.1).
 - 3.11.4. Pesar 0,05 g de hidroquinona monobenciléter (3.10) en un tubo de ensayo graduado de 10 ml. Añadir 0,25 g de ácido ascórbico (3.6) y 5 ml de etanol (3.1). Añadir amoníaco (3.5) hasta que el pH sea 10 y diluir a 10 ml con etanol (3.1).
- 3.12. Nitrato de plata
- 3.13. Ácido 12-fosfomolibdico
- 3.14. Ferricianuro potásico, hexahidrato
- 3.15. Cloruro férrico, hexahidrato
- 3.16. Reactivos de pulverización:
 - 3.16.1. A una disolución acuosa al 5 % (m/v) de nitrato de plata (3.12), añadir amoníaco (3.5) hasta que se disuelva el precipitado formado ⁽¹⁾.
 - 3.16.2. Disolución al 10 % (m/v) de ácido 12-fosfomolibdico (3.13) en etanol (3.1).

⁽¹⁾ La disolución se vuelve inestable con riesgo de explosión si se conserva, y debe desecharse tras su uso.

- 3.16.3. Preparar una disolución acuosa al 1 % (m/v) de ferricianuro potásico (3.14) y una disolución acuosa al 2 % (m/v) de cloruro férrico (3.15). Mezclar a partes iguales ambas disoluciones, inmediatamente antes de su empleo.

4. **Material y equipo instrumental:**

Material habitual del laboratorio.

- 4.1. Equipo habitual para cromatografía en capa fina (CCF).
- 4.2. Placas de TLC listas para su uso: silicagel GHR/UV₂₅₄, 20 cm × 20 cm (Machery, Nagel o equivalente), espesor de la capa 0,25 mm.
- 4.3. Baño ultrasónico
- 4.4. Centrífuga
- 4.5. Lámpara UV de 254 nm.

5. **Procedimiento**

5.1. Preparación de la muestra:

Pesar 3,0 g de la muestra en un tubo graduado de 10 ml. Añadir 0,250 g de ácido ascórbico (3.6) y 5 ml de etanol (3.1). Ajustar el pH de la disolución a 10, utilizando amoníaco (3.5). Diluir a 10 ml con etanol (3.1). Cerrar el tubo con un tapón y homogeneizar en un baño ultrasónico durante 10 minutos. Filtrar por filtro de papel o centrifugar a 3 000 rpm.

5.2. CCF

- 5.2.1. Saturar una cámara de cromatografía con la fase móvil (3.4).
- 5.2.2. Depositar en la placa 2 µl de las disoluciones de referencia (3.11) y 2 µl de la disolución de muestra (5.1). Diluir a temperatura ambiente y a oscuras, hasta que el frente del diluyente haya avanzado 15 cm.
- 5.2.3. Sacar la placa de la cámara y dejarla secar a temperatura ambiente.
- 5.3. Detección
- 5.3.1. Examinar la placa bajo luz UV a 254 nm y marcar la posición de las manchas.
- 5.3.2. Pulverizar la placa con:
- reactivo de nitrato de plata (3.16.1),
 - reactivo de ácido 12-fosfomolídico (3.16.2) y calentar hasta 120 °C aproximadamente,
 - disolución de ferricianuro potásico y disolución de cloruro férrico (3.16.3).

6. **Identificación**

Calcular el valor de R_f para cada mancha.

Comparar las manchas obtenidas de la disolución de la muestra con las de las disoluciones de referencia, en cuanto a sus valores de R_f, coloración a la luz UV y coloraciones tras visualización mediante el reactivo de pulverización.

Realizar la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), que se describe en la sección siguiente (B), y comparar los tiempos de retención obtenidos para el pico (o picos) de la muestra con los obtenidos a partir de las disoluciones de referencia.

Combinar los resultados de la CCF y la CLAR, para identificar la presencia de hidroquinona y/o sus éteres.

7. **Observaciones**

En las condiciones descritas, se observaron los siguientes valores de R_f:

hidroquinona:	0,32
hidroquinona monometiléter:	0,53
hidroquinona monoetiléter:	0,55
hidroquinona monobenciléter:	0,58.

B. DETERMINACIÓN

1. Objeto y campo de aplicación

El presente método establece un procedimiento para la determinación de hidroquinona, hidroquinona monometiléter, hidroquinona monoetiléter e hidroquinona monobenciléter, en los productos cosméticos para aclarar la piel.

2. Principio

La muestra se extrae con una mezcla de agua/metanol, sometida a un ligero calentamiento para derretir cualquier material lípido. La determinación de los analitos en la disolución resultante, se lleva a cabo mediante cromatografía líquida en fase reversa con detección UV.

3. Reactivos

- 3.1. Todos los reactivos deben ser de calidad analítica. El agua empleada deberá ser agua destilada o, al menos, de pureza equivalente.
- 3.2. Metanol
- 3.3. Hidroquinona
- 3.4. Hidroquinona monometiléter
- 3.5. Hidroquinona monoetiléter
- 3.6. Hidroquinona monobenciléter (monobenzona)
- 3.7. Tetrahidrofurano, calidad CLAR
- 3.8. Mezcla agua/metanol 1:1 (v/v). Mezclar un volumen de agua y un volumen de metanol (3.2).
- 3.9. Fase móvil: mezcla de tetrahidrofurano/agua 45:55 (v/v). Mezclar 45 volúmenes de tetrahidrofurano (3.7) y 55 volúmenes de agua.
- 3.10. Disolución de referencia:
Pesar 0,06 g de hidroquinona (3.3), 0,08 g de hidroquinona monometiléter (3.4), 0,10 g de hidroquinona monoetiléter (3.5) y 0,12 g de hidroquinona monobenciléter (3.6), en un matraz aforado de 50 ml. Disolver y diluir hasta el volumen con metanol (3.2). Preparar la disolución de referencia diluyendo 10,00 ml de la disolución anterior a 50,00 ml con la mezcla de agua/metanol (3.8). Estas disoluciones deben prepararse cada día.

4. Material y equipo instrumental

Material habitual de laboratorio y:

- 4.1. Baño María, que permita mantener una temperatura de 60 °C.
- 4.2. Cromatógrafo de líquidos de alta resolución con detector UV de longitud de onda variable y un bucle de inyección de 10 µl.
- 4.3. Columna analítica:
Columna cromatográfica de acero inoxidable de 250 mm de longitud y un diámetro interno de 4,6 mm, con relleno de Zorvax fenilo (fenetilsilano químicamente unido sobre Zorvax SIL, con

bloqueo de trimetilclorosilano), con un tamaño de partícula de 6 μm o equivalente. No utilizar precolumna, excepto precolumna fenilo o equivalente.

- 4.4. Filtro de papel de 90 mm de diámetro, Schleicher and Schull, Weissband n° 5892, o equivalente.

5. Procedimiento

5.1. Preparación de la muestra:

Pesar con precisión de tres decimales 1 g $\pm 0,1$ g (a gramos) de muestra en un matraz aforado de 50 ml. Dispersar la muestra en 25 ml de la mezcla de agua/metanol (3.8). Tapar el matraz aforado y agitar enérgicamente hasta obtener una suspensión homogénea. Agitar durante un minuto como mínimo. Colocar el matraz en un baño María (4.1) mantenido exactamente a 60 °C, para facilitar la extracción. Enfriar el matraz y diluir hasta el volumen con agua/metanol (3.8). Filtrar el extracto por filtro de papel (4.4). Examinar por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), en las 24 horas siguientes a la preparación del extracto.

5.2. Cromatografía de líquidos de alta resolución.

- 5.2.1. Ajustar la velocidad de flujo de la fase móvil (3.9) a 1,0 ml/min y la longitud de onda del detector a 295 nm.

- 5.2.2. Inyectar 10 μl de la disolución de la muestra, obtenida tal como se describe en el apartado 5.1 y registrar el cromatograma. Medir las áreas de los picos. Efectuar una calibración como se describe en el apartado 5.2.3. Comparar los cromatogramas obtenidos para las disoluciones de muestra y referencia. Utilizar las áreas de los picos y los factores de respuesta (FR) calculados en el punto 5.2.3, para calcular la concentración de los analitos en la disolución de la muestra.

5.2.3. Calibración:

Inyectar 10 μl de la disolución de referencia (3.10) y registrar el cromatograma. Inyectar varias veces hasta que se obtenga un área de pico constante.

Determinar el factor respuesta: FR_i .

$$FR_i = \frac{p_i}{c_i}$$

Donde:

p_i = área del pico para hidroquinona, hidroquinona monometiléter, hidroquinona monoetiléter o hidroquinona monobenciléter,

c_i = concentración (g/50 ml) en la disolución de referencia (3.10) de hidroquinona, hidroquinona monometiléter, hidroquinona monoetiléter o hidroquinona monobenciléter.

Comprobar si los cromatogramas obtenidos para las disoluciones de referencia y de muestra, cumplen los siguientes requisitos:

- la separación entre los picos en el par de picos menos separado, será al menos de 0,90. (Para la definición de la separación entre picos véase la figura 1.).

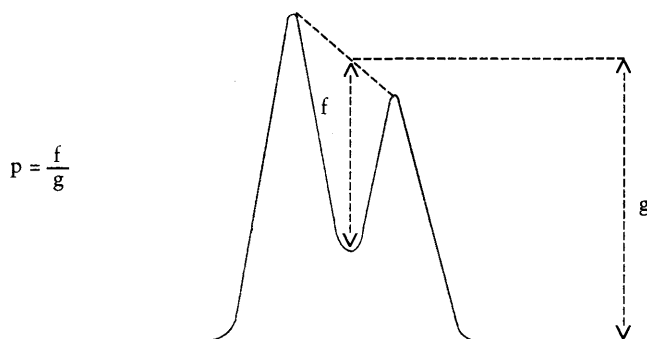


Figura 1: Separación entre picos

Si no se obtiene la separación requerida, habrá de emplearse una columna más eficaz, o bien deberá ajustarse la composición de la fase móvil hasta que se cumplan los requisitos;

- el factor de asimetría A_s de todos los picos obtenidos, deberá encontrarse en el rango de 0,9 a 1,5. (Para la definición del factor de asimetría de los picos, véase la figura 2). En el registro del cromatograma para determinar el factor de asimetría, se recomienda una velocidad de papel de 2 cm/min como mínimo;

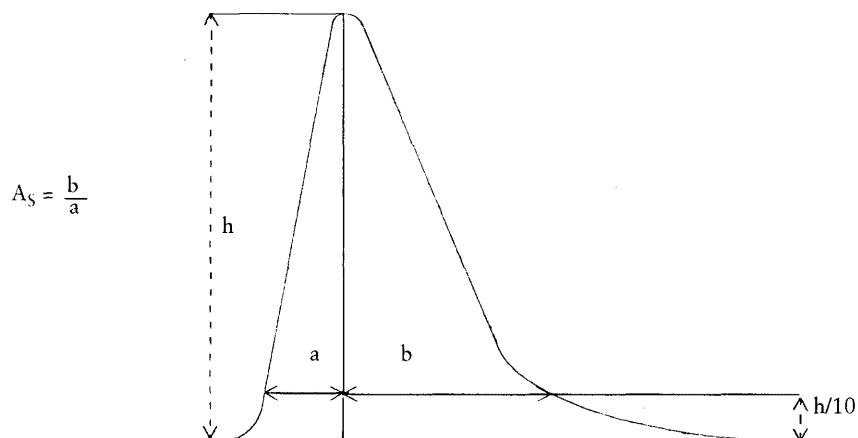


Figura 2: Factor de asimetría de los picos

- deberá obtenerse una línea base estable.

6. Cálculo

Utilizar las áreas de los picos correspondientes a los analitos para calcular su concentración o concentraciones en la muestra. Calcular la concentración del analito en la muestra, como porcentaje en masa por medio de la fórmula:

$$x_i \% (m/m) = \frac{b_i \cdot 100}{FR_i \cdot a}$$

Donde:

a = masa de la muestra en gramos,

b_i = área del pico del analito i en la muestra.

FR_i = factor respuesta por 5.2.3

7. Repetibilidad ⁽¹⁾

- 7.1. Para un contenido de hidroquinona del 2,0 %, la diferencia entre los resultados de dos determinaciones, realizadas paralelamente sobre la misma muestra, no debería exceder un valor absoluto del 0,13 %.
- 7.2. Para un contenido de hidroquinona monometiléter del 1,0 % la diferencia entre los resultados de dos determinaciones realizadas paralelamente sobre la misma muestra, no debería exceder un valor absoluto del 0,1 %.
- 7.3. Para un contenido de hidroquinona monoetiléter del 1,0 %, la diferencia entre los resultados de dos determinaciones, realizadas paralelamente sobre la misma muestra, no debería exceder un valor absoluto del 0,11 %.
- 7.4. Para un contenido de hidroquinona monobenciléter del 1,0 %, la diferencia entre los resultados de dos determinaciones realizadas paralelamente sobre la misma muestra, no debería exceder un valor absoluto de 0,11 %.

8. Reproducibilidad ⁽¹⁾

- 8.1. Para un contenido de hidroquinona del 2,0 %, la diferencia entre los resultados de dos determinaciones, realizadas sobre la misma muestra en condiciones diferentes (varios laboratorios, distintos operadores, diversos aparatos y/o tiempos diferentes), no debería exceder un valor absoluto del 0,37 %.

⁽¹⁾ ISO 5725.

- 8.2. Para un contenido de hidroquinona monometiléter del 1,0 %, la diferencia entre los resultados de dos determinaciones, realizadas sobre la misma muestra en condiciones diferentes (varios laboratorios, distintos operadores, diversos aparatos y/o tiempos diferentes), no debería exceder un valor absoluto del 0,21 %.
- 8.3. Para un contenido de hidroquinona monoetiléter del 1,0 %, la diferencia entre los resultados de dos determinaciones, realizadas sobre la misma muestra en condiciones diferentes (varios laboratorios, distintos operadores, diversos aparatos y/o tiempos diferentes), no debería exceder un valor absoluto del 0,19 %.
- 8.4. Para un contenido de hidroquinona monobenciléter del 1,0 %, la diferencia entre los resultados de dos determinaciones, realizadas sobre la misma muestra en condiciones diferentes (varios laboratorios, distintos operadores, diversos aparatos y/o tiempos diferentes), no debería exceder un valor absoluto del 0,11 %.

9. Observaciones

- 9.1. Cuando se encuentre un contenido de hidroquinona considerablemente superior al 2 %, y se necesite una valoración exacta del contenido del extracto de la muestra (5.1), deberá diluirse hasta alcanzar una concentración similar a la que se obtendría de una muestra que contuviera un 2 % de hidroquinona, y deberá repetirse el análisis.

(En algunos instrumentos la absorbencia puede quedar fuera de la escala lineal del detector, para concentraciones elevadas de hidroquinona).

9.2. Interferencias

El método anteriormente descrito permite la detección de hidroquinona y de sus éteres, en un solo barrido isocrático. La utilización de la columna de fenilo asegura una retención suficiente para la hidroquinona, que no puede garantizarse cuando se emplea una columna C18 con la fase móvil descrita.

No obstante, este método es propenso a las interferencias con derivados del parabeno. En tal caso, la determinación debería repetirse utilizando un sistema diferente de fase móvil/fase estacionaria. En las notas a pie de página ⁽¹⁾ y ⁽²⁾ pueden hallarse métodos apropiados, a saber:

Columna: Zorbax ODS; 4,6 mm × 25 cm, o equivalente

Temperatura: 36 °C

Flujo: 1,5 ml/min

Fase móvil:

— para la hidroquinona: metanol/agua 5/95 (V/V)

— para la hidroquinona monometiléter: metanol/agua 30/70 (V/V)

— para la hidroquinona monobenciléter: metanol/agua 80/20 (V/V) ⁽¹⁾

Columna: Spherisorb S5-ODS, o equivalente

Fase móvil: agua/metanol 90/10 (V/V)

Flujo: 1,5 ml/min

Estas condiciones son apropiadas para la hidroquinona ⁽²⁾

⁽¹⁾ M. Herpol-Borremans and M.O. Masse, Identification et dosage de l'hydroquinone et ses éthers méthylque et benzylique dans les produits cosmétiques pour blanchir la peau, Int. J. Cosmet. Sci 8 — 203-214 (1986).

⁽²⁾ J. Firth and I. Rix, Determination of Hydroquinone in skin toning creams, Analyst (1986), 111, p. 129.