

382L0434

30. 6. 82

Diario Oficial de las Comunidades Europeas

Nº L 185/1

SEGUNDA DIRECTIVA DE LA COMISIÓN**de 14 de mayo de 1982****sobre la aproximación de las legislaciones de los métodos de Estados miembros relativas a los análisis necesarios para el control de la composición de los productos cosméticos**

(82/434/CEE)

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

HA ADOPTADO LA PRESENTE DIRECTIVA:

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Económica 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⁾, modificada por la Directiva 79/661/CEE⁽²⁾ y, en particular, el apartado 1 del artículo 8,

Considerando que la Directiva 76/768/CEE prevé unos controles oficiales de los productos cosméticos tendentes a comprobar que se cumplen las condiciones previstas por las disposiciones comunitarias relativas a la composición de los productos cosméticos;

Considerando que conviene establecer, a la mayor brevedad, todos los métodos de análisis necesarios y que habiéndose realizado la primera etapa para alcanzar este objetivo mediante la fijación de determinados métodos en la Directiva 80/1335/CEE de la Comisión⁽³⁾, la fijación de los métodos de identificación de los agentes de oxidación y de determinación del peróxido de hidrógeno en los productos capilares, de identificación y de determinación semicuantitativa de determinados colorantes de oxidación en los tintes para el cabello, de identificación y de determinación de los nitritos, de identificación y de determinación del formaldehído libre, de determinación de la resorcina en los champúes y en las lociones capilares, de determinación del metanol con relación al etanol o al propanol-2, constituyen una segunda etapa;

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

Artículo 1

Los Estados miembros adoptarán todas las medidas apropiadas para que, al realizar los controles oficiales de los productos cosméticos:

- la identificación de los agentes de oxidación y la determinación del peróxido de hidrógeno en los productos capilares,
- la identificación y la determinación semicuantitativa de determinados colorantes de oxidación en los tintes para el cabello,
- la identificación y la determinación de los nitritos,
- la identificación y la determinación del formaldehído libre,
- la determinación de la resorcina en los champúes y en las lociones capilares,
- la determinación del metanol con relación al etanol y al propanol-2, se efectúen de acuerdo con los métodos descritos en el Anexo.

Artículo 2

Los Estados miembros aplicarán las disposiciones legales, reglamentarias o administrativas necesarias para cumplir las disposiciones de la presente Directiva, a más tardar el 31 de diciembre de 1983 e informarán de ello inmediatamente a la Comisión.

Artículo 3

Los destinatarios de la presente Directiva serán los Estados miembros.

Hecho en Bruselas, el 14 de mayo de 1982.

Por la Comisión

Karl-Heinz NARJES

Miembro de la Comisión

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

(2) DO nº L 192 de 31. 7. 1979, p. 35.

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

ANEXO

I. IDENTIFICACION DE LOS AGENTES DE OXIDACION Y DETERMINACION DEL PEROXIDO DE HIDROGENO EN LOS PRODUCTOS CAPILARES

OBJETO Y CAMPO DE APLICACION

La determinación yodométrica del peróxido de hidrógeno en los productos cosméticos es posible en ausencia de cualquier otro agente de oxidación que reaccione con los yoduros para formar yodo. Antes de emprender la determinación yodométrica del peróxido de hidrógeno es, por tanto, indispensable detectar e identificar los demás agentes de oxidación eventualmente presentes. Dicha identificación se efectúa en dos operaciones, la primera se refiere a los persulfatos, los bromatos y el peróxido de hidrógeno, la segunda al peróxido de bario.

A. IDENTIFICACION DE LOS PERSULFATOS, DE LOS BROMATOS Y DEL PEROXIDO DE HIDROGENO

1. PRINCIPIO

El persulfato de sodio, de potasio y de amonio, el bromato de potasio y de sodio y el peróxido de hidrógeno, provengan o no del peróxido de bario, se identifican por cromatografía descendente sobre papel con ayuda de dos disolventes de desarrollo.

2. REACTIVOS

Todos los reactivos deben ser de calidad analítica.

2.1 Soluciones acuosas de referencia al 0,5% (m/v) de los compuestos siguientes:

2.1.1. persulfato de sodio

2.1.2. persulfato de potasio

2.1.3. persulfato de amonio

2.1.4. bromato de potasio

2.1.5. bromato de sodio

2.1.6. peróxido de hidrógeno

2.2. Disolvente de desarrollo A, etanol al 80% (v/v)

2.3. Disolvente de desarrollo B, benceno-metanol-alcohol isomílico-agua (34-38-18-10, v)

2.4. Reactivo A, solución acuosa de yoduro de potasio al 10% (m/v)

2.5. Reactivo B, solución acuosa de almidón al 1% (m/v)

2.6. Reactivo C, ácido clorhídrico al 10% (m/m)

2.7. Acido clorhídrico 4 N

3. APARATOS

3.1. papel para cromatografía (Whatman nº 3 y nº 4, o equivalente)

3.2. micropipeta de un μ l

3.3. matraces aforados de 100 ml

3.4. filtros plegados

3.5. material habitual para cromatografía descendente sobre papel

4. PREPARACION DE LA MUESTRA

4.1. Productos solubles en agua

Preparar dos soluciones de la muestra disolviendo 1 y 5 g respectivamente del producto en 100 ml de agua. Para realizar la cromatografía sobre papel descrita en el punto 5, utilizar 1 μ l de cada una de estas dos soluciones.

4.2. Productos parcialmente solubles en agua

4.2.1. Pesar 1 y 5 g de la muestra, ponerlos en suspensión en 50 ml de agua, completar el volumen hasta 100 ml y mezclar. Filtrar las dos suspensiones con ayuda de un filtro plegado (punto 3.4) y utilizar 1 μ l de cada uno de los dos filtrados para realizar la cromatografía sobre papel descrita en el punto 5.

4.2.2. Preparar dos nuevas suspensiones de 1 y 5 g de la muestra en 50 ml de agua, acidificar con ácido clorhídrico diluido (punto 2.7), completar el volumen hasta 100 ml con agua y mezclar. Filtrar las suspensiones con ayuda de un filtro plegado (punto 3.4) y utilizar 1 μ l de cada uno de los dos filtrados para realizar la cromatografía sobre papel descrita en el punto 5.

4.3. CREMAS

Homogeneizar por separado 5 y 20 g del producto en 100 ml de agua y utilizar las dispersiones para realizar la cromatografía sobre papel descrita en el punto 5.

5. PROCEDIMIENTO

5.1. En dos cubetas para cromatografía descendente sobre papel, poner una cierta cantidad de los disolventes de desarrollo A (punto 2.2) y B (punto 2.3.). Saturar las cubetas con los vapores de disolvente durante al menos 24 h.

5.2. En una cinta de papel para cromatografía (Whatman n° 3 o equivalente) de 40 cm de largo y 20 cm de ancho (punto 3.1) o de otro formato apropiado, depositar en cada punto de partida 1 μ l de una de las soluciones (o suspensiones filtradas) de la muestra y de referencia preparadas en los puntos 4 y 2.1 y hacer que el disolvente se evapore al aire.

5.3. Colocar la cinta (punto 5.2) en la cubeta llena del disolvente A (punto 5.1) y cromatografiar hasta que el frente del disolvente haya recorrido 35 cm (unas 15 h).

5.4. Repetir las operaciones descritas en los puntos 5.2 y 5.3 con papel para cromatografía (Whatman n° 4 o equivalente) (punto 3.1) y el disolvente B (punto 2.3). Cromatografiar hasta que el disolvente de desarrollo haya recorrido 35 cm (unas 5 h).

5.5. Después del desarrollo, sacar las cintas de papel de las cubetas y secarlas al aire.

5.6. Detectar las manchas pulverizando:

5.6.1. el reactivo A (punto 2.4) e inmediatamente después el reactivo B (punto 2.5). En el cromatograma aparecen en primer lugar las manchas de persulfatos, seguidas por las del peróxido de hidrógeno. Marcar estas manchas por medio de un lápiz.

5.6.2. el reactivo C (punto 2.6) sobre los cromatogramas obtenidos en el punto 5.6.1. Aparecen unas manchas de color gris azulado, que indican la presencia de bromatos.

5.7. En las condiciones indicadas anteriormente para los disolventes A (punto 2.2) y B (punto 2.3), los valores R_f de las soluciones de referencia (punto 2.1) son los siguientes:

	<i>Disolvente A</i> (punto 2.2)	<i>Disolvente B</i> (punto 2.3)
Persulfato de sodio	0,40	0,10
Persulfato de potasio	0,40	0,02 + 0,05
Persulfato de amonio	0,50	0,10 + 0,20
Bromato de sodio	0,40	0,20
Bromato de potasio	0,40	0,10 + 0,20
Peróxido de hidrógeno	0,80	0,80

B. IDENTIFICACION DEL PEROXIDO DE BARIO

1. PRINCIPIO

La presencia de peróxido de bario se evidencia:

- por una parte, por formación del peróxido de hidrógeno después de la acidificación de la muestra (título A, punto 4.2),
- por otra parte, por la identificación del ión bario.

En ausencia de persulfatos (título A): se añade ácido sulfúrico diluido a una parte de la solución de muestra ácida (título B, punto 4.1), lo que provoca la formación de un precipitado blanco de sulfato de bario. La presencia de ión bario en la solución de muestra (punto 4.1) se confirma por cromatografía sobre papel como se indica en el punto 5 siguiente.

En caso de presencia simultánea de peróxido de bario y de persulfatos (título B, punto 4.2), después de fusión alcalina del residuo del disolvente y disolución en ácido clorhídrico, se establece la presencia del ión bario por cromatografía y/o por precipitación al estado de sulfato.

2. REACTIVOS

- 2.1. Metanol
- 2.2. Acido clorhídrico concentrado al 36 % (m/m)
- 2.3. Acido clorhídrico 6 N
- 2.4. Acido sulfúrico
- 2.5. Rodizonato disódico
- 2.6. Cloruro de bario ($\text{BaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
- 2.7. Carbonato de sodio anhidro
- 2.8. Solución acuosa de cloruro de bario al 1 % (m/v)
- 2.9. Disolvente de desarrollo, metanol-ácido clorhídrico concentrado al 36 % — agua (80 + 10 + 10, v)
- 2.10. Reactivo, solución acuosa de rodizonato disódico al 0,1 % (m/v); preparar la solución justo antes de su utilización.

3. APARATOS

- 3.1. Micropipeta de 5 μl
- 3.2. Crisoles de platino
- 3.3. Matraces aforados de 100 ml
- 3.4. Papel para cromatografía (Schleicher y Schüll 2043 b o equivalente). Poner durante una noche en la cubeta para cromatografía (título A, punto 3.5) que contiene el disolvente (título B, punto 2.9) y secar.
- 3.5. Filtros plegados
- 3.6. Material habitual para la cromatografía ascendente sobre papel

4. PREPARACION DE LA MUESTRA

4.1. **Productos que no contienen persulfatos**

- 4.1.1. Homogeneizar o disolver 2 g del producto en 50 ml de agua y, por medio de ácido clorhídrico (título B, punto 2.3), llevar el pH de la solución a 1 aproximadamente.

4.1.2. Trasvasar la solución (suspensión) a un matraz aforado de 100 ml. Completar hasta la señal con agua y mezclar. Utilizar esta solución para realizar la cromatografía sobre papel descrita en el punto 5 y para identificar el bario por precipitación del sulfato.

4.2. **Productos que contienen persulfatos**

4.2.1. Homogeneizar o disolver 2 g del producto en 100 ml de agua y filtrar.

4.2.2. Añadir al residuo secado 7 a 10 veces su peso de carbonato de sodio (título B, punto 2.7) mezclar y fundir la mezcla en un crisol de platino (título B, punto 3.2) durante una media hora.

4.2.3. Enfriar a la temperatura ambiente, poner en suspensión el producto de la fusión en 50 ml de agua y filtrar (título B, punto 3.5).

4.2.4. Disolver en ácido clorhídrico 6 N (título B, punto 2.3) y llevar hasta 100 ml con agua. Utilizar esta solución para realizar la cromatografía sobre papel descrita en el punto 5 y para identificar el bario por precipitación del sulfato.

5. **PROCEDIMIENTO**

5.1. En una cubeta para cromatografía ascendente sobre papel, poner una determinada cantidad de disolvente (título B, punto 2.9) y saturar la cubeta durante al menos 15 h.

5.2. Sobre una hoja de papel para cromatografía, previamente tratada como se ha indicado (título B, punto 3.4) depositar respectivamente en tres puntos de partida 5 µl de cada una de las soluciones preparadas (título B, punto 4.1.2.) y (título B, punto 4.2.4.) y de la solución de referencia (título B, punto 2.8).

5.3. Hacer evaporar el disolvente al aire y cromatografiar verticalmente hasta que el disolvente de desarrollo haya recorrido 30 cm.

5.4. Sacar el cromatograma de la cubeta y secarlo al aire.

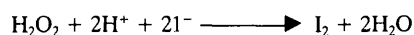
5.5. Hacer que aparezcan las manchas en el cromatograma pulverizándolo con el reactivo (título B, punto 2.10).

En presencia de bario, aparecen manchas rojas de Rf 0,10 aproximadamente.

C. DETERMINACION DEL PEROXIDO DE HIDROGENO

1. **PRINCIPIO**

La determinación yodométrica del peróxido de hidrógeno se basa en la reacción siguiente:



Se trata de una reacción lenta, pero que puede ser acelerada añadiéndole molibdato amónico. El yodo formado, determinado por procedimientos titulométricos mediante una solución de tiosulfato de sodio, permite calcular el contenido de peróxido de hidrógeno.

2. **DEFINICION**

El contenido de la muestra en peróxido de hidrógeno determinado por este método se expresa en porcentaje de masa del producto.

3. **REACTIVOS**

Todos los reactivos deben ser de calidad analítica.

3.1. Acido sulfúrico 2 N

3.2. Yoduro de potasio

3.3. Molibdato amónico

3.4. Solución de tiosulfato de sodio 0,1 N

- 3.5. Solución de yoduro de potasio al 10% (m/v). Preparar la solución extemporaneamente
- 3.6. Solución de molibdato amónico al 20% (m/v)
- 3.7. Solución de almidón al 1 % (m/v)

4. APARATOS

- 4.1. Vasos de vidrio de 100 ml
- 4.2. Bureta de 50 ml
- 4.3. Matraces aforados de 250 ml
- 4.4. Probetas graduadas de 25 y 100 ml
- 4.5. Pipetas aforadas de 10 ml
- 4.6. Matraces cónicos de 250 ml

5. PROCEDIMIENTO

- 5.1. En un vaso de 100 ml, pesar una cantidad gramos (m) del producto equivalente a 0,6 g aproximadamente de peróxido de hidrógeno; trasvasarlos cuantitativamente a un matraz aforado a 250 ml con ayuda de una pequeña cantidad de agua, completar hasta la señal con agua y mezclar.
- 5.2. Con una pipeta echar 10 ml de la solución de muestra (punto 5.1) a un matraz cónico de 250 ml (punto 4.6) y añadir sucesivamente 100 ml de ácido sulfúrico 2 N (punto 3.1), 20 ml de yoduro de potasio (punto 3.5) y tres gotas de solución de molibdato amónico (punto 3.6).
- 5.3. Titular inmediatamente el yodo formado con ayuda de la solución de tiosulfato de sodio 0,1 N (punto 3.4) y, justamente antes de alcanzar el punto de equivalencia, añadir algunos ml de solución de almidón como indicador. Anotar la cantidad en ml de tiosulfato de sodio 0,1 N utilizada (V).
- 5.4. Según el procedimiento indicado en los puntos 5.2 y 5.3, efectuar una determinación en blanco, sustituyendo los 10 ml de solución de muestra por 10 ml de agua. Anotar la cantidad en ml de tiosulfato de sodio 0,1 N utilizada (Vo).

6. CALCULO

Calcular el contenido de peróxido de hidrógeno en el producto, en porcentaje de masa (% m/m), mediante la fórmula:

$$\% \text{ de peróxido de hidrógeno} = \frac{(V - V_0) \times 1,7008 \times 250 \times 100}{m \times 10 \times 1000}$$

$$\% \text{ de peróxido de hidrógeno} = \frac{(V - V_0) \times 4,252}{m}$$

donde:

m = cantidad en g de producto examinado (punto 5.1).

V₀ = cantidad en ml de solución de tiosulfato 0,1 N utilizada en la determinación en blanco (punto 5.4).

V = cantidad en ml de solución de tiosulfato 0,1 N utilizada en la titulación de la solución de muestra (punto 5.3).

7. REPETIBILIDAD⁽¹⁾

Para un contenido de peróxido de hidrógeno del orden del 6% (m/m), la diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas sobre la misma muestra, no debe superar el 0,2%.

⁽¹⁾ Según la norma ISO 5725.

II. IDENTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN SEMICUANTITATIVA DE DETERMINADOS COLORANTES DE OXIDACION EN LOS TINTES PARA EL CABELLO

1. OBJETO Y CAMPO DE APLICACION

Este método permite la identificación y la determinación semicuantitativa de las sustancias siguientes en los tintes para el cabello en forma de crema y de líquido:

Denominación de la sustancia	Símbolo
<i>diaminobencenos</i>	
1-2 diaminobenceno (o. fenilendiamina)	(OPD)
1-3 diaminobenceno (m. fenilendiamina)	(MPD)
1-4 diaminobenceno (p. fenilendiamina)	(PPD)
<i>diaminotoluenos</i>	
3-4 diaminotolueno (o. tolulendiamina)	(OTD)
2-4 diaminotolueno (m. tolulendiamina)	(MTD)
2-5 diaminotolueno (p. tolulendiamina)	(PTD)
<i>diaminofenoles</i>	
2-4 diaminofenol	(DAP)
<i>hidroquinona</i>	
1-4 dihidroxibenceno	(H)
<i>α-naftol</i>	
	(αN)
<i>Pirogalol</i>	
1-2-3 trihidroxibenceno	(P)
<i>Resorcina</i>	
1-3 dihidroxibenceno	(R)

2. PRINCIPIO

Los colorantes de oxidación se extraen, a un pH de 10, de los tintes en forma de crema o de líquido con etanol de 96° y se identifican por cromatografía en capa fina monodimensional (punto 5) y/o bidimensional (punto 6)

A fin de efectuar la determinación semicuantitativa de las sustancias se compara la imagen cromatográfica de las muestras obtenida mediante cuatro sistemas de desarrollo con la de las soluciones de productos de referencia cromatografiadas.

3. REACTIVOS

Todos los reactivos deben ser de calidad analítica.

- 3.1. Etanol absoluto
- 3.2. Acetona
- 3.3. Etanol de 96° (v/v)
- 3.4. Amoníaco al 25 % ($d_4^{20} + 0,91$)

- 3.5. L (+) ácido ascórbico
- 3.6. Cloroformo
- 3.7. Ciclohexano
- 3.8. Nitrógeno técnico
- 3.9. Tolueno
- 3.10. Benceno
- 3.11. Butanol 1
- 3.12. Butanol 2
- 3.13. Ácido hipofosforoso al 50%
- 3.14. Reactivo diazoico: se podrá utilizar bien:
— el 4-nitro-1-bencendiazonio salificado y estabilizado por el ión clorobenceno sulfonato, por ejemplo (rojo 2 JN de francolor o equivalente), bien
— 2-cloro-4-nitro-1-bencendiazonio salificado y estabilizado por el ión naftalenoato, por ejemplo (NNCD Reagent — Ref. n° 74150 de FLUKA o equivalente).
- 3.15. Nitrato de plata
- 3.16. p-dimetilaminobenzaldehído
- 3.17. 2-5-dimetilfenol
- 3.18. Cloruro férrico 6 H₂O
- 3.19. Ácido clorhídrico al 10% (m/v)
- 3.20. **Sustancias de referencia**
Las sustancias de referencia son las indicadas en el Título 1 «Objeto y campo de aplicación». En el caso de compuestos aminados, la sustancia de referencia debe estar constituida exclusivamente por la forma clorhidrato (mono o di) o por la forma de base.
- 3.21. **Soluciones de referencia al 0,5% (m/v)**
Preparar una solución al 0,5% (m/v) de cada una de las sustancias de referencia (punto 3.20). Pesar 50 mg ± 1 mg de sustancia de referencia en un matraz aforado de 10 ml. Añadir 5 ml de etanol de 96° (punto 3.3). Añadir 250 mg de ácido ascórbico (punto 3.5). Alcalinizar mediante la solución amoniacal (punto 3.4) hasta un pH aparente de 10. Completar hasta 10 ml con etanol de 96° y mezclar.
Observaciones
Las soluciones pueden conservarse durante una semana en un sitio fresco, protegidas de la luz. En ciertos casos, cuando se añade ácido ascórbico y amoníaco, puede producirse un precipitado. En este caso, conviene dejar que se decante antes de proceder a la toma de muestras.
- 3.22. **Disolvente de desarrollo**
- 3.22.1. Acetona-cloroformo-tolueno: 35-25-40 6 (v/v)
- 3.22.2. Cloroformo-ciclohexano-etanol absoluto-amoníaco al 25% 80-10-10-1 (v/v)
- 3.22.3. Benceno-butanol secundario-agua: 50-25-25 (v/v). Agitar bien la mezcla y tomar la fase superior después de la decantación a la temperatura del laboratorio (entre 20 y 25 °C).
- 3.22.4. Butanol I-cloroformo y reactivo M: 7-70-23 (v/v). Dejar decantar cuidadosamente a 20-25° y tomar la fase inferior.

Preparación del reactivo M

NH ₄ OH al 25 % (v/v) (punto 3.4)	24 volúmenes
Acido hipofosforoso al 50 % (punto 3.13)	1 volúmen
H ₂ O	75 volúmenes

Observación

Los disolventes de desarrollo que contienen amoníaco deben agitarse bien inmediatamente antes de su empleo.

3.23. **Reveladores**3.23.1. *Reactivo diazoico*

Preparar una solución acuosa al 5 % (m/v) del reactivo (punto 3.14) elegido. Esta solución debe prepararse en el momento de su empleo.

3.23.2. *Reactivo de Ehrlich*

Disolver 2 g de p-dimetilaminobenzaldehído (punto 3.16) en 100 ml de ácido clorhídrico al 10 % (m/v) acuoso (punto 3.19).

3.23.3. *2-5 Dimetilfenol-cloruro férrico 6 H₂O**Solución 1:*

disolver 1 g de dimetilfenol (punto 3.17) en 100 ml de etanol de 96° (punto 3.3).

Solución 2:

disolver 4 g de cloruro férrico 6 H₂O (punto 3.18) en 100 ml de etanol de 96° (punto 3.3).

En el momento del revelado se pulveriza separadamente en primer lugar la solución 1, y después la solución 2.

3.23.4. *Nitrato de plata amoniacal*

A una solución acuosa al 5 % (m/v) de nitrato de plata (punto 3.15) añadir amoníaco al 25 % (punto 3.4) hasta la disolución del precipitado. Este reactivo se preparará en el momento de su utilización. No conservarlo.

4. **APARATOS**

4.1. Equipo de laboratorio para cromatografía en capa fina.

4.1.1. Recipiente de plástico o de vidrio que permita mantener la placa cromatográfica bajo nitrógeno durante el depósito y hasta el desarrollo. Esta precaución es necesaria por la gran oxidabilidad de determinados colorantes.

4.1.2. Jeringa de 10 µl, graduada de 0,2 en 0,2 µl con una aguja de sección recta o mejor «repeating dispenser». 50 µl, montado sobre soporte, a fin de poder colocar la placa bajo nitrógeno.

4.1.3. Capas finas de sílice listas para el empleo, espesor 0,25 mm. formato 20 x 20 cm (Macherey y Nagel Silice G-HR o equivalente).

4.2. Centrífuga de 4000 r.p.m.

4.3. Tubos de centrifuga de 10 ml cerrados por tapón de rosca.

5. **PROCEDIMIENTO**5.1. **Tratamiento de las muestras**

Al abrir el tubo, eliminar los 2 ó 3 primeros cm de crema.

En un tubo de centrifugar (punto 4.3), previamente purgado con nitrógeno, introducir:

— 300 mg de ácido ascórbico,

— 3 g de crema ó 3 g de líquido homogeneizado.

Añadir unas gotas de amoníaco (punto 3.4) si el pH es inferior a 10 y completar hasta 10 ml con etanol de 96° (punto 3.3).

Homogeneizar bajo nitrógeno, tapar. y centrifugar después a 4000 r.p.m. durante 10 min.

Utilizar la solución sobrenadante.

5.2. Cromatografía**5.2.1. Depósito**

Depositar bajo nitrógeno, en una placa de sílice (punto 4.1.3) y en 9 puntos de partida, 1 μ l de cada una de las 11 soluciones de referencia. Estas soluciones de referencia se distribuyen así:

1	2	3	4	5	6	7	8	9
R	P	H	PPD	DAP	PTD	OPD	OTD	MPD
MTD	α N							

Por otra parte, depositar en los puntos décimo y undécimo 2 μ l de las soluciones de muestra obtenidas en el punto 5.1.

Conservar la placa bajo nitrógeno hasta el momento en que sea cromatografiada.

5.2.2. Desarrollo

Introducir la placa en una cubeta previamente purgada con nitrógeno, saturada con uno de los disolventes adecuados (puntos 3.22) y dejar desarrollar a la temperatura ambiente (20° a 25°) y en la oscuridad hasta que el frente del disolvente haya recorrido unos 15 cm desde la línea de partida:

Sacar la placa y secarla bajo nitrógeno a la temperatura ambiente.

5.2.3. Revelado

Pulverizar inmediatamente la placa con uno de los 4 reveladores citados en el punto 3.23.

5.2.4. Identificación

Se comparan los R_f y las coloraciones obtenidas para la muestra con las de las sustancias de referencia depositadas. El cuadro I da, a título indicativo, los R_f y las coloraciones obtenidos para cada sustancia de referencia en función del disolvente de desarrollo y de los reveladores.

En caso de identificación dudosa se puede a veces obtener una confirmación añadiendo a la muestra la sustancia de referencia correspondiente.

5.2.5. Determinación semicuantitativa

Comparar visualmente la intensidad de las manchas correspondientes a cada sustancia identificada en el punto 5.2.4 con una gama patrón de concentración conocida y apropiada obtenida a partir de la sustancia de referencia correspondiente.

Cuando la concentración del componente de la muestra es demasiado elevada, diluir la solución que hay que depositar y proceder a una nueva determinación.

CUADRO 1

Valores Rf y coloraciones obtenidas inmediatamente después del revelado

Productus de referencia (3.20)	Disolventes de desarrollo				Reveladores			
	Rf				Coloraciones			
	3.22.1	3.22.2	3.22.3	3.22.4	Reactivo de diazoico (3.22.1)	Reactivo de Ehrlich (3.23.2)	Reactivo de dimetilfenol-cloruro férrico (3.23.3)	Reactivo de nitrato de plata (3.23.4)
OPD	0,62	0,60	0,30	0,57	Marrón claro	—	—	Marrón claro
MPD	0,40	0,60	0,47	0,48	Marrón violáceo (*)	Amarillo	Marrón claro	Marrón claro
PPD	0,20	0,50	0,30	0,48	Marrón	Rojo vivo (*)	Violáceo	Gris
OTP	0,60	0,60	0,53	0,60	Marrón (*)	Anaranjado claro	Marrón claro	Marrón grisáceo
MTP	0,40	0,67	0,45	0,60	Marrón rojizo (*)	Amarillo	Marrón	Negro
PTD	0,33	0,65	0,37	0,70	Marrón	Anaranjado	Violáceo (*)	Gris
DAP	0,07	—	0	0,05	Marrón (*)	Anaranjado	Violáceo	Marrón
H	0,50	0,35	0,80	0,20	—	Anaranjado	Violáceo	Negro (*)
αN	0,90	0,80	0,90	0,75	Anaranjado marrón	—	Violáceo	Negro
P	0,37	—	0,67	0,05	Marrón	Violáceo	Marrón muy claro	Marrón (*)
R	0,50	0,37	0,80	0,17	Anaranjado (*)	Violáceo	Marrón muy claro	Marrón claro

Notas: 1. La OPD se revela débilmente, por lo que el disolvente (punto 3.22.3) debe ser utilizado para separarlo netamente de la OTD.
2. (*) indica el mejor revelado.

6. EXAMEN POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA BIDIMENSIONAL

La cromatografía en capa fina bidimensional que se describe aquí, necesita el uso de los reactivos siguientes:

6.1. Sustancias y soluciones de referencia

- 6.1.1. Beta-naftol (β-N)
- 6.1.2. 2-aminofenol (OAP)
- 6.1.3. 3-aminofenol (MAP)
- 6.1.4. 4-aminofenol (PAP)
- 6.1.5. 2-nitro-p-fenilendiamina (2 NPPD)
- 6.1.6. 4-nitro-o-fenilendiamina (4 NOPD)

Preparar una solución al 0,5 % (m/v) de cada una de las sustancias de referencia suplementarias como se indica en el punto 3.2.1.

6.2. Disolvente de desarrollo

- 6.2.1. Acetato de etilo-ciclohexano-amoniaco el 25 % (65-35-0,5, v)

6.3. Revelador

Colocar un recipiente de vidrio en una cubeta de desarrollo para cromatografía en capa fina, introducir en el recipiente unos 2 g de yodo cristalizado y tapar la cubeta.

6.4. Cromatografía

- 6.4.1. Trazar como se indica en la figura 1, dos líneas en la capa absorbente de una placa para cromatografía en capa fina (punto 4.1.3).
- 6.4.2. Depositar bajo nitrógeno en el punto de partida 1 (figura 1) de 1 a 4 μ l de extracto (punto 5.1). La cantidad depende de la intensidad de las manchas obtenidas en el cromatograma (punto 5.2).
- 6.4.3. Depositar, distribuidos entre los puntos 2 y 3 (figura 1), los colorantes de oxidación identificados (o supuestamente identificados) en el punto 5.2. Distancia entre los puntos: 1,5 cm. Depositar 2 μ l de cada una de las soluciones de referencia, con la excepción del DAP, del que es necesario depositar 6 μ l. Realizar la operación bajo nitrógeno.
- 6.4.4. Volver a empezar la operación descrita en el punto 6.4.3 para los puntos de partida 4 y 5 (figura 1) y conservar la placa bajo nitrógeno hasta la cromatografía.
- 6.4.5. Purgar con nitrógeno una cubeta para cromatografía e introducir una cantidad adecuada de disolvente de desarrollo (punto 3.22.2). Colocar la placa (punto 6.4.4) en la cubeta y cromatografiar en la primera dirección de elución (figura 1) en la oscuridad. Cromatografiar hasta que el frente del disolvente haya recorrido el menos 13 cm.
- 6.4.6. Sacar la placa de la cubeta y colocarla en la cubeta (punto 4.1) purgada con nitrógeno para evaporar los restos de disolvente (durante un mínimo de 60 min.)
- 6.4.7. Introducir con una probeta graduada una cantidad adecuada de disolvente (punto 6.2.1) en una cubeta purgada con nitrógeno, colocar la placa girada 90° respecto a la primera dirección de elución (punto 6.4.6) en la cubeta y cromatografiar en la segunda dirección en la oscuridad hasta que el frente del disolvente haya alcanzado la línea trazada en la capa absorbente. Retirar la placa de la cubeta y evaporar el disolvente al aire.
- 6.4.8. Exponer la placa durante 10 min en la cubeta de cromatografiar a los vapores de yodo (punto 6.3) e interpretar el cromatograma bidimensional mediante las referencias cromatografiadas al mismo tiempo (cuadro II).

Observación

Para obtener una coloración máxima de las manchas, dejar el cromatograma al aire durante media hora después del revelado.

- 6.4.9. La presencia de los colorantes de oxidación encontrados en el punto 6.4.8 puede confirmarse sin posibilidad de error repitiendo las manipulaciones descritas en los puntos 6.4.1 a 6.4.8 incluidos, cuidando de añadir en el punto de partida 1, además de la cantidad de extracto prescrita en el punto 6.4.2, 1 μ l de las sustancias de referencia identificadas en el punto 6-4-8.

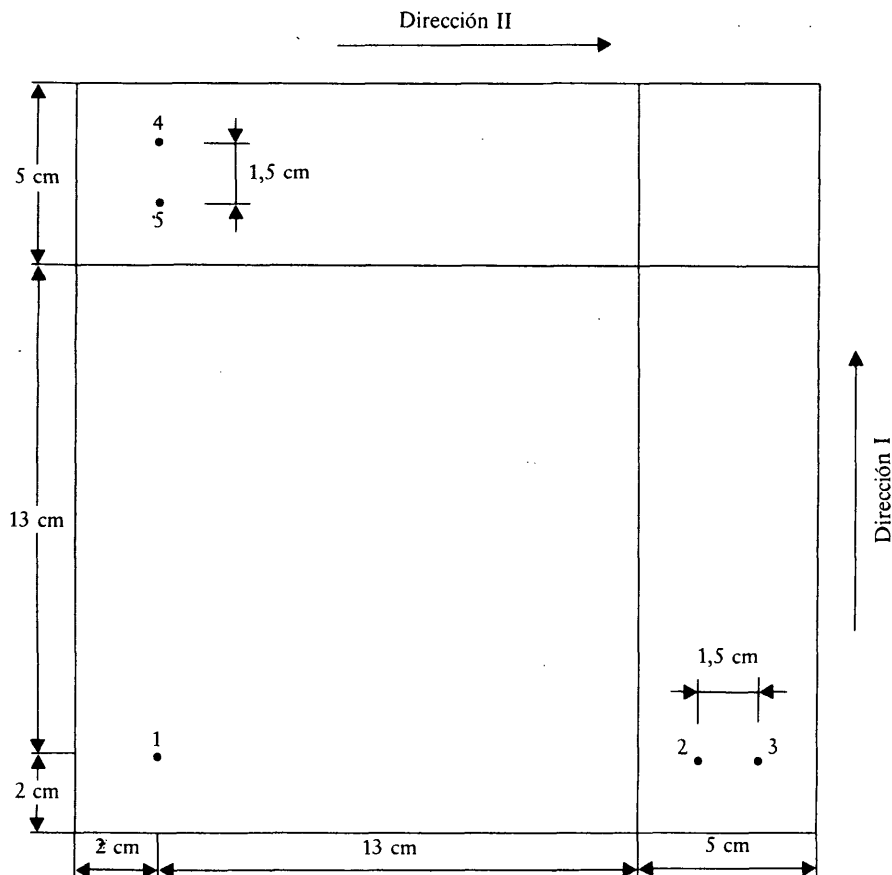
Si no se encuentra ninguna otra mancha, la interpretación del cromatograma primitivo es exacta.

CUADRO II

Color de las sustancias de referencia después de la cromatografía y del revelado con vapores de yodo

Sustancias de referencia	Color después del revelado con vapores de yodo
R	Beige
P	Marrón
alfa-N	Violáceo
beta-N	Marrón claro
H	Violáceo marrón
MPD	Amarillo marrón
PPD	Violáceo marrón
MTD	Marrón oscuro
PTD	Amarillo marrón
DAP	Marrón oscuro
AOP	Anaranjado
MAP	Amarillo marrón
PAP	Violáceo marrón
2-NPPD	Marrón
4-NOPD	Anaranjado

Figura 1



III. IDENTIFICACION Y DETERMINACION DE LOS NITRITOS

A. IDENTIFICACION

1. OBJETO Y CAMPO DE APLICACION

Este método es conveniente para la identificación de los nitritos en los productos cosméticos. Es aplicable en particular a las cremas, a los productos en pasta y a los dentífricos.

2. PRINCIPIO

La caracterización de los nitritos se realiza mediante la 2-aminobenzaldehído fenil-hidrazona.

3. REACTIVOS

Todos los reactivos deben ser de calidad analítica.

- 3.1. Acido sulfúrico diluido: diluir 2 ml de ácido sulfúrico concentrado ($d_4^{20} = 1,84$) en 11 ml de agua destilada.
- 3.2. Acido clorhídrico diluido: diluir 1 ml de ácido clorhídrico concentrado ($d_4^{20} = 1,19$) en 11 ml de agua destilada.
- 3.3. Metanol
- 3.4. Solución de 2-aminobenzaldehído-fenil-hidrazon (reactivo nitrina R) en metanol.
Pesar 2 g de Nitrina R e introducirlos en un matraz aforado de 100 ml. Añadir gota a gota 4 ml de ácido clorhídrico diluido (punto 3.2) y agitar. Completar con metanol y mezclar hasta que la solución quede totalmente límpida. Conservar la solución en un frasco de vidrio tapado (punto 4.3).

4. APARATOS

- 4.1. Vasos de 50 ml
- 4.2. Matraz aforado de 100 ml
- 4.3. Frasco de vidrio tapado de 125 ml
- 4.4. Plaquita de vidrio de 10 x 10 cm
- 4.5. Espátula de materia sintética
- 4.6. Papel de filtro de 10 x 10 cm

5. PROCEDIMIENTO

- 5.1. Extender uniformemente una parte de la muestra que vaya a examinarse sobre la placa de vidrio (punto 4.4.) Cuidar de que el espesor de la capa no supere 1 cm.
- 5.2. Empapar en agua destilada una hoja de papel de filtro (punto 4.6) y depositar sobre la muestra aplicándola convenientemente con la espátula (punto 4.5).
- 5.3. Esperar alrededor de 1 min y echar en el centro del papel de filtro:
 - 2 gotas de ácido sulfúrico diluido (punto 3.1) y luego
 - 2 gotas de la solución de nitrina (punto 3.4)
- 5.4. Después de 5 a 10 s, retirar el papel de filtro y examinarlo a la luz del día. Una coloración rojo violácea indica la presencia de nitritos.

Cuando el contenido de nitritos es poco elevado, la coloración violácea vira al amarillo en 5 a 15 s. Este viraje sólo ocurre al cabo de uno o dos minutos, en presencia de cantidades mas importantes de nitritos.

6. OBSERVACION

La intensidad de la coloración violácea, así como la duración del viraje a amarillo, puede dar una indicación del contenido del nitrito de la muestra.

B. DETERMINACIÓN

1. OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN

El método indicado a continuación está adaptado a la determinación de los nitritos en los productos cosméticos.

2. DEFINICIÓN

El contenido de nitrito de la muestra, determinado por este método, se expresa en porcentaje de la masa de nitrito de sodio.

3. PRINCIPIO

Después de dilución y clarificación de la muestra, se realiza una reacción colorimétrica con N(alfa-naftil-etilendiamina) y la intensidad de la coloración obtenida se mide a 538 nm.

4. REACTIVOS

Todos los reactivos deben ser de calidad analítica.

4.1. Reactivos de clarificación (estos reactivos no pueden ser utilizados más de una semana después de su preparación).

4.1.1. Reactivo I (Carrez I): disolver 106 g de ferrocianuro de potasio $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ en agua destilada y completar hasta 1000 ml.

4.1.2. Reactivo II (Carrez II) disolver 219,5 g de acetato de cinc $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ y 30 ml de ácido acético glacial en agua destilada y completar hasta 1000 ml.

4.2. Solución de nitrito de sodio: en un matraz aforado de 1000 ml, disolver en agua destilada 0,500 g de nitrito de sodio y completar hasta la señal. Diluir 10,0 ml de esta solución madre hasta 500 ml. 1 ml de esta última solución = $10\mu g$ de $NaNO_2$.

4.3. Solución de hidróxido de sodio normal.

4.4. Solución al 0,2% de clorhidrato de sulfanilamida: disolver 2 g de sulfanilamida en 800 ml de agua calentando. Enfriar y añadir 100 ml de HCl concentrado y agitando. Completar hasta 1000 ml.

4.5. Acido clorhídrico 5 N.

4.6. Reactivo al N-(alfa-naftil): esta solución se preparará el mismo día de su utilización.

Disolver 0,1 g de diclorhidrato de N — (alfa-naftil etilendiamina) en agua y completar hasta 100 ml.

5. APARATOS

5.1. Balanza analítica

5.2. Matraces aforados de 100, 250, 500 y 1000 ml

5.3. Pipetas aforadas

- 5.4. Probetas de 100 ml
- 5.5. Filtro plegado exento de nitrito, de 15 cm de diámetro
- 5.6. Baño de María
- 5.7. Espectrofotómetro con cubetas de 1 cm de trayecto óptico
- 5.8. Medidor de pH
- 5.9. Microbureta de 10 ml
- 5.10. Vaso de 50 ml

6. PROCEDIMIENTO

- 6.1. Pesar con una precisión de 0,1 mg aproximadamente 0,5 g (m) de la muestra homogeneizada e introducirlos en un vaso de 250 ml. Diluir hasta un volumen de aproximadamente 150 ml con agua destilada caliente. Colocar el vaso durante media hora en baño de María a 80 °C y agitar de forma intermitente.
- 6.2. Enfriar a la temperatura ambiente y añadir sucesivamente sin dejar de agitar, 2 ml del reactivo de Carraz I (punto 4.1.1) y 2 ml del reactivo de Carrez II (punto 4.1.2).
- 6.3. Ajustar el pH a 8,3 en el medidor de pH, con una solución N de hidróxido de sodio. Trasvasar cuantitativamente a un matraz aforado de 250 ml y completar hasta la señal con agua destilada.
- 6.4. Mezclar y filtrar en filtro plegado (punto 5.5).
- 6.5. Con una pipeta echar una cantidad adecuada (V ml) del filtrado claro que no supere los 25 ml en una matraz aforado de 100 ml; diluir con agua destilada hasta 60 ml.
- 6.6. Mezclar, añadir 10,0 ml de clorhidrato de sulfanilamida (punto 4.4) y después 6,0 ml de ácido clorhídrico 5 N (punto 4.5). Mezclar y dejar reposar durante 5 min. Añadir 2,0 ml del reactivo N — (alfa-naftil) (punto 4.6), mezclar y dejar reposar durante 3 min. Completar hasta 100 ml y mezclar.
- 6.7. Preparar una prueba en blanco repitiendo las operaciones efectuadas en los puntos 6.5 y 6.6 sin añadir el reactivo N (alfa-naftil) (punto 4.6).
- 6.8. Medir (punto 5.7) la densidad óptica a 538 nm de la solución de la muestra (punto 6.6) en relación con la prueba en blanco (punto 6.7).
- 6.9. Leer en la curva patrón (punto 6.10) el contenido de nitrito de sodio en μg por 100 ml de solución (m_1) correspondiente a la densidad óptica encontrada para la muestra (punto 6.8).
- 6.10. Curva patrón. Preparar con ayuda de la solución de nitrito de sodio (punto 4.2) una curva patrón en la gama de 0-20-40-60-80-100 μg de nitrito de sodio por 100 ml.

7. CALCULO

Calcular el contenido de nitrito de sodio de la muestra en porcentaje de la masa mediante la fórmula siguiente:

$$\% \text{NaNO}_2 = 20 \frac{250}{V} \times m_1 \times 10^{-6} \times \frac{100}{m} = \frac{m_1}{V \times m \times 40}$$

en donde:

m = masa en g de la muestra sometida al análisis (punto 6.1),

m₁ = contenido de nitrito de sodio en microgramos determinado de acuerdo con las indicaciones del punto 6.9,

V = número de ml de filtrado utilizado para la medida (punto 6.5).

8. REPETIBILIDAD⁽¹⁾

Para un contenido de nitrito de sodio del 0,2 %, la diferencia entre los resultados de 2 determinaciones paralelas efectuadas sobre la misma muestra, no debe superar el 0,005 %.

IV. IDENTIFICACION Y DETERMINACION DEL FORMALDEHIDO LIBRE

1. OBJETO Y CAMPO DE APLICACION

El método describe la identificación y la determinación del formaldehído libre.

Se aplica a todos los productos cosméticos e incluye tres partes:

1.1. identificación,

1.2. determinación por colorimetría con acetilacetona:

este método no se aplica cuando el formaldehído está combinado, o polimerizado en el caso de los donadores de fórmol.

Si el resultado supera la concentración máxima autorizada en el producto acabado, se utiliza el siguiente método,

1.3. determinación con bisulfito:

evita que se tenga en cuenta el formaldehído combinado o polimerizado en el caso de los donadores de fórmol.

No obstante, se determinan algunas combinaciones inestables (por ejemplo, la hexametileno tetramina). Además, en presencia de solución tampón, la medición de la alcalinidad es difícil.

2. DEFINICION

El contenido de la muestra en formaldehído libre, determinado de acuerdo con este método, se expresa en porcentaje de la masa de formaldehído.

3. PRINCIPIO

3.1. Parte I

El formaldehído en medio sulfúrico da una coloración rosa o malva en presencia del reactivo de Schiff.

3.2. Parte II

El formaldehído reacciona con la acetilacetona en presencia de acetato de amonio para formar la 3-5-diacetil-1-4-dihidrolutidina. Esta se extrae con el butanol-I. La densidad óptica del extracto se mide a 410 nm.

⁽¹⁾ Según la norma ISO 5725.

- 3.3. **Parte III**
El formaldehído reacciona con el sulfito en medio ácido a 0 °C para formar un compuesto de adición. Los protones sobrantes son titulados con hidróxido de sodio. Los protones consumidos constituyen la base de cálculo para determinar la cantidad de formaldehído. Un ensayo en blanco sin sulfito permite medir la alcalinidad o acidez del medio.
4. **REACTIVOS**
Todos los reactivos deben ser de calidad analítica.
- 4.1. Acido acético concentrado
- 4.2. Acetato de amonio anhidro
- 4.3. Butanol-I
- 4.4. Acido sulfúrico aproximadamente 2 N
- 4.5. Solución de sulfito de sodio 0,1 M recién preparada
- 4.6. Reactivo de Schiff
En un vaso, pesar 100 mg de fucsina; disolverlos en 75 ml de agua a 80 °C. Después de enfriar, añadir 2,5 g de sulfito de sodio hidratado con 7 H₂O y 1,5 ml de ácido clorhídrico concentrado ($d_4^{20} = 1,19$). Completar hasta 100 ml (tiempo de conservación; dos semanas).
- 4.7. Reactivo de acetilacetona
En un matraz aforado de 1000 ml, disolver:
150 g de acetato de amonio,
2 ml de acetilacetona recientemente destilada a presión reducida y que no debe presentar ninguna absorción a 410 nm,
3 ml de ácido acético concentrado.
Completar hasta 1 000 ml con agua (pH de la solución aproximadamente 6,4).
Este reactivo debe estar recién preparado.
- 4.8. Solución titulada de ácido sulfúrico 0,1 N
- 4.9. Solución titulada de hidróxido de sodio 0,1 N
- 4.10. Solución titulada de yodo 0,1 N
- 4.11. Solución titulada de tiosulfato de sodio 0,1 N
- 4.12. Formaldehído patrón: solución madre
En un matraz aforado de 1 000 ml, introducir 5 g de formaldehído con un título del 37 al 40 % y completar hasta 1 000 ml.
Determinación del título de la solución madre.
Extraer 10,00 ml, añadir 25,00 ml de solución titulada de yodo 0,1 N y 10 ml de solución de hidróxido de sodio N.
Dejar reposar durante 5 min.
Acidificar con 11 ml de HCl N y determinar el yodo en exceso con una solución titulada de tiosulfato de sodio 0,1 N en presencia de engrudo de almidón como indicador.
1 ml de solución como de yodo 0,1 N consumida, corresponde a 1,5 mg de formaldehído.
- 4.13. Formaldehído patrón: solución diluida
Realizar sucesivamente una dilución a 1/20 y después una dilución a 1/100 de la solución madre en agua desmineralizada.
1 ml de esta solución contiene aproximadamente 1 µg de formaldehído.
Calcular su contenido exacto.
- 4.14. Solución de timolftaleina
0,1 g por 100 ml de etanol al 50 % v/v.
- 4.15. Reactivo (punto 4.7) sin acetilacetona

5. APARATOS

- 5.1. Material habitual de laboratorio
- 5.2. Filtro «separador de fases» ref. Whatman 1 PS (o equivalente)
- 5.3. Centrifuga
- 5.4. Espectrofotómetro
- 5.5. Cubetas de vidrio de 1 cm de recorrido óptico
- 5.6. Potenciógrafo
- 5.7. Electrodo vidrio/calomelano (se recomienda utilizar electrodos especiales para baja temperatura).

6. PROCEDIMIENTO

6.1. **Identificación**

- 6.1.1. En un vaso de 10 ml introducir aproximadamente 2 g de muestra.
- 6.1.2. Añadir 2 gotas de H_2SO_4 2N (punto 4.4) y 2 ml de reactivo de Schiff (punto 4.6). (Este reactivo debe estar rigurosamente incoloro en el momento de su empleo). Agitar, dejar en contacto durante 5 min.
- 6.1.3. Si en un plazo de 5 min se observa una coloración rosa o malva, la cantidad de formaldehído presente es superior al 0,01 %. Proceder luego a la determinación siguiendo el procedimiento del punto 6.2 y, si es necesario, el del punto 6.3.

6.2. **Determinación colorimétrica con acetilacetona**

6.2.1. *Solución de muestra*

- 6.2.1.1. En un matraz aforado de 100 ml, pesar con una precisión de 0,001 g aproximadamente, una masa de muestra para ensayo (en g) correspondiente a una cantidad supuesta de formaldehído de unos 150 μg .
- 6.2.1.2. Completar hasta 100 ml con agua y mezclar (solución S).
- 6.2.1.3. En un matraz cónico de 50 ml añadir:
10,00 ml de solución S,
5,00 ml de reactivo de acetilacetona (punto 4.7) y
agua desmineralizada para obtener un volumen de 30 ml.

6.2.2. *Solución testigo*

La interferencia eventual de una coloración de fondo en la muestra para ensayo se elimina de la manera siguiente:

en un matraz cónico de 50 ml añadir:
10,0 ml de solución S,
5,0 ml del reactivo (punto 4.15) y
agua desmineralizada para obtener un volumen de 30 ml.

6.2.3. *Ensayo en blanco*

En un matraz cónico de 50 ml añadir:

5,0 ml de reactivo de acetilacetona (punto 4.7) y
agua desmineralizada para obtener un volumen de 30 ml.

6.2.4. *Determinación*

6.2.4.1. Agitar las mezclas preparadas en los puntos 6.2.1.3, 6.2.2 y 6.2.3.
Sumergir los matraces cónicos en un baño de María a 60 °C durante 10 min. exactamente.

Enfriar durante 2 min. en un baño de agua helada.

6.2.4.2. Trasvasar a una ampolla de decantación de 50 ml que contenga 10 ml de butanol-I (punto 4.3).
Enjuagar con 3 a 5 ml de agua.

Agitar enérgicamente la mezcla durante 30 s exactamente. Dejar decantar.

6.2.4.3. Filtrar en filtro «separador de fases» (punto 5.2) en las cubetas de medida.
Se puede realizar también una centrifugación (5 000 r.p.m. durante 5 min).

6.2.4.4. Medir la densidad óptica A_1 a 410 nm del extracto de la solución de muestra obtenida en el punto
6.2.1.3 contra el extracto de la solución testigo del punto 6.2.2.

6.2.4.5. De la misma manera, medir el extracto del ensayo en blanco obtenido en el punto 6.2.3 contra
butanol-I (A_2).

NB: Todas estas operaciones deben ejecutarse en un plazo de 25 min a partir del momento en
que el matraz cónico se coloca en el baño de María a 60 °C.

6.2.5. *Curva patrón*

6.2.5.1. En un matraz cónico de 50 ml introducir:
5,00 ml de solución patrón diluida (punto 4.13),
5,00 ml de reactivo de acetilacetona (punto 4.7) y
agua desmineralizada para obtener un volumen final de 30 ml.

6.2.5.2. Continuar según las indicaciones del punto 6.2.4.5. y medir la densidad óptica con relación al
butanol-I (punto 4.3).

6.2.5.3. Repetir el proceso con 10, 15, 20, 25 ml de solución patrón diluida (punto 4.13)

6.2.5.4. Para obtener el valor del punto O (que corresponde a la coloración de los reactivos) proceder co-
mo en el punto 6.2.4.5.

6.2.5.5. Construir la curva patrón después de restar el valor del punto O de cada una de las densidades
ópticas obtenidas en los puntos 6.2.5.1 y 6.2.5.3.

La ley de Beer se respeta hasta 30 µg de formaldehído.

6.3. **Determinación con bisulfito**

6.3.1. *Toma de ensayo*

6.3.1.1. Para el ensayo:

en un vaso tarado, pesar con una precisión de 0,001 g, una masa de muestra (gramos m) corres-
pondiente a una cantidad supuesta de formaldehído comprendida entre 3 y 20 mg.

6.3.1.2. Para el ensayo testigo:

en un vaso tarado pesar con una precisión de 0,001 g, una cantidad equivalente de la muestra
(gramos m').

6.3.2. *Determinación*

6.3.2.1. Colocar 50,00 ml de Na_2SO_3 0,1 M (punto 4.5) en un vaso de 100 ml y añadir 10,00 ml de H_2SO_4 0,1 N (punto 4.8). Agitar.

6.3.2.2. Sumergir el vaso en una mezcla de hielo y sal a fin de llevar la temperatura de la solución del punto 6.3.2.1 a $+ 2^\circ \text{C}$. Introducir cuantitativamente la toma en ensayo m (punto 6.3.1.1).

6.3.2.3. Titular rápidamente por potenciometría con NaOH 0,1 N (punto 4.9) agitando continuamente y manteniendo la temperatura entre $+ 2$ y $+ 4^\circ \text{C}$ (la zona de neutralización se sitúa entre los pH 9 y 11).

Sea V_1 el volúmen de NaOH 0,1 N (punto 4.9) utilizado.

6.3.3. *Ensayo en blanco*

Titular la solución del punto 6.3.2.1 en las condiciones descritas en el punto 6.3.2. Sea V_2 el volúmen de NaOH 0,1 N (punto 4.9) utilizado.

6.3.4. *Ensayo testigo*

Determinar la acidez o la alcalinidad de la muestra por titulación potenciométrica con NaOH 0,1 N (punto 4.9) o H_2SO_4 0,1 N (punto 4.8) en la toma de ensayo m' (punto 6.3.1.2).

Sea v' el volúmen de NaOH 0,1 N o de H_2SO_4 0,1 N utilizado. v' puede ser igual a 0.

6.3.5. *NB:*

Es importante respetar estrictamente las condiciones del procedimiento.

Se puede efectuar la determinación en presencia de timolftaleína (punto 4.14) como indicador.

7. CALCULOS

7.1. **Determinación colorimétrica con acetilacetona**

7.1.1. Restar A_2 de A_1 y leer en la curva patrón (punto 6.2.5.5) la cantidad C expresada en microgramos de formaldehído contenida en la solución del punto 6.2.1.1.

7.1.2. El contenido de formaldehído de la muestra (% m/m) se calcula mediante la fórmula:

$$\% \text{ de formaldehído} = \frac{C}{10^3 \times m}$$

7.2. **Determinación con bisulfito**

Añadir a la masa m el volumen de NaOH 0,1 N y de H_2SO_4 0,1 N utilizado en el ensayo testigo (punto 6.3.4) según la fórmula:

$$v = \frac{v' \times m}{m'}$$

Para productos neutros $V = 0$.

7.2.1. Caso de un producto ácido:

$$\% \text{ HCHO} = \frac{0,30 (V_2 - V_1 + v)}{m}$$

7.2.2. Caso de un producto alcalino:

$$\% \text{ HCHO} = \frac{0,30 (V_2 - V_1 - v)}{m}$$

7.3. Si hay divergencia entre los resultados de los 2 métodos, sólo se tomará en consideración el resultado menor.

8. REPETIBILIDAD⁽¹⁾

Para un contenido en formaldehído del 0,2 %, la diferencia entre los resultados de 2 determinaciones paralelas efectuadas sobre la misma muestra no debe superar el 0,005 % para la determinación colorimétrica con acetilacetona ni el 0,05 % para la determinación con bisulfito.

**V. DETERMINACION DE LA RESORCINA EN LOS CHAMPUES
Y EN LAS LOCIONES CAPILARES**

1. OBJETO Y CAMPO DE APLICACION

Este método describe la determinación de la resorcina en los champúes y lociones capilares por cromatografía en fase gaseosa. Se aplica a concentraciones del 0,1 al 2,0 % de la masa del producto.

2. DEFINICION

El contenido en resorcina determinado según este método se expresa en porcentaje de la masa de resorcinol.

3. PRINCIPIO

La resorcina y el 3,5-dihidroxitolueno utilizado como patrón interno, se aíslan de la muestra por cromatografía en capa fina. Los dos compuestos se aíslan mediante raspado de la placa de capa fina y extracción con metanol. A continuación se secan los residuos, se sililan y se determinan por cromatografía en fase gaseosa.

4. REACTIVOS

Todos los reactivos deben ser de calidad analítica:

4.1. Acido clorhídrico al 25 % (m/m)

4.2. Metanol

4.3. Etanol al 96 % (v/v)

4.4. Placas de sílice sobre soporte plástico o aluminio, con indicador fluorescente listas para el empleo y desactivadas.

Preparar como sigue: vaporizar agua sobre las placas de sílice hasta que queden brillantes. Secarlas a temperatura ambiente durante 1 a 3 horas.

NB:

Si las placas no son desactivadas, puede haber pérdidas de resorcina por adsorción irreversible sobre la sílice.

4.5. Disolvente de desarrollo: acetona — cloroformo — ácido acético (20 — 75 — 5 v).

4.6. Solución patrón de resorcina; disolver 400 mg de resorcina en 100 ml de etanol al 96 % (1 ml corresponde a 4000 µg de resorcina).

4.7. Solución de patrón interno; disolver 400 mg de 3,5-dihidroxitolueno (DHT) en 100 ml de etanol al 96 % (1 ml corresponde a 4000 µg de DHT):

4.8. Mezcla patrón: mezclar 10 ml de solución del punto 4.6 y 10 ml de solución del punto 4.7 en un matraz aforado de 100 ml, completar hasta volumen con etanol al 96 % y mezclar (1 ml corresponde a 400 µg de resorcina y 400 µg de DHT).

⁽¹⁾ Según la norma ISO 5725.

- 4.9. Reactivos de sililación:
- 4.9.1. N, O-bis-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA)
- 4.9.2. Hexametildisilazano (HMDS)
- 4.9.3. Trimetilclorosilano (TMCS)
5. APARATOS
- 5.1. Equipo habitual de cromatografía en capa fina y en fase gaseosa
- 5.2. Instrumental de vidrio de laboratorio
6. PROCEDIMIENTO
- 6.1. **Preparación de la muestra**
- 6.1.1. Pesar con precisión en un vaso de 150 ml una toma de ensayo del producto (gramos m) que contenga de 20 a 50 mg aproximadamente de resorcina.
- 6.1.2. Acidificar con ácido clorhídrico (punto 4.1) (aproximadamente 2 a 4 ml). Añadir 10 ml (40 mg de DHT) de solución interna (punto 4.7) y mezclar. Trasvasar a un matraz aforado de 100 ml con ayuda de etanol. Completar hasta volumen con etanol (punto 4.3) y mezclar.
- 6.1.3. Depositar 250 μ l de la solución del punto 6.1.2 en una placa de sílice desactivada (punto 4.4) en una línea continua de aproximadamente 8 cm de longitud. Tratar de conseguir una banda lo más fina posible.
- 6.1.4. Depositar de la misma manera (punto 6.1.3), en la misma placa, 250 μ l de mezcla patrón (punto 4.8).
- 6.1.5. En la línea de partida, depositar 2 puntos de 5 μ l de cada solución de los puntos 4.6 y 4.7 para facilitar la localización después del revelado de la placa.
- 6.1.6. En una cubeta no saturada, desarrollar la placa con el disolvente de desarrollo (punto 4.5) hasta que haya recorrido 12 cm desde la línea de partida (45 min). Secar la placa al aire y localizar la zona resorcina/DHT bajo luz UV a 254 nm. Ambos compuestos tienen aproximadamente el mismo valor de R_f. Retirar las bandas así localizadas, reunir el adsorbente de cada una de ellas en un matraz de 10 ml.
- 6.1.7. Extraer el adsorbente que contiene la muestra y el que contiene la mezcla patrón de la muestra siguiente:
Añadir 2 ml de metanol (punto 4.2) y extraer durante 1 hora agitando de manera continua. Filtrar la mezcla y repetir la extracción durante 15 min con 2 ml de metanol (punto 4.2).
- 6.1.8. Evaporar el disolvente de la totalidad de los extractos colocándolos durante la noche en un desecador en vacío, lleno de un desecante adecuado. No evaporar en caliente.
- 6.1.9. Sililar los residuos (punto 6.1.8) como se indica en 6.1.9.1 o en el punto 6.1.9.2.
- 6.1.9.1. Añadir 200 μ l de BSTFA (punto 4.9.1) y dejar la mezcla en un recipiente tapado a temperatura ambiente, durante 12 horas.
- 6.1.9.2. Añadir sucesivamente 200 μ l de HMDS (punto 4.9.2) y 100 μ l de TMCS (punto 4.9.3) y calentar la mezcla durante 30 min a 60 °C en un recipiente tapado. Enfriar.
- 6.2. **Cromatografía en fase gaseosa**
- 6.2.1. *Condiciones para la cromatografía*
La fase estacionaria debe dar un grado de resolución igual o superior a 1,5.

$$R = 2 \frac{d' R_2 - d' R_1}{W_1 + W_2}$$

en donde

R_1 y R_2 = tiempo de retención expresado en min de 2 picos,

W_1 y W_2 = anchura de los mismos picos a media altura,

d' = velocidad de avance del papel en mm/min.

Las condiciones operativas siguientes, permiten obtener este resultado:

columna: acero inoxidable,
 longitud: 200 cm,
 diámetro: ~ 3 (1/8"),
 llenado: 10 % OV 17 en chromosorb WAW 100 — 120 mallas.

detector de ionización de llama

temperaturas:

columna: 185 °C (isotermo)

inyector: 250 °C

detector: 250 °C

gas vector: nitrógeno,

caudal 45: ml/min.

para ajustar el caudal de hidrógeno y de aire seguir las instrucciones del fabricante.

- 6.2.2. Inyectar 1 a 3 μ l de las soluciones obtenidas en el punto 6.1.9. Realizar 5 inyecciones para cada solución. Medir la superficie de los picos de manera precisa y calcular la relación de las superficies:

S = superficie del pico de resorcina/superficie del pico del DHT.

7. CALCULO

La concentración en resorcina de la muestra, expresada en porcentaje de masa (% m/m), viene dada por:

$$\% \text{ de resorcina} = \frac{4}{M} \times \frac{S \text{ muestra}}{S \text{ mezcla patrón}}$$

donde:

M = toma de ensayo en gramos (punto 6.1.1),

S muestra = relación media obtenida para los picos de la solución muestra,

S mezcla patrón = relación media obtenida para los picos de la mezcla patrón según el punto 6.2.2.

8. REPETIBILIDAD⁽¹⁾

Para un contenido de resorcina del 0,5 % la diferencia entre los resultados de 2 determinaciones paralelas efectuadas sobre la misma muestra, no debe superar el 0,025 %.

VI. DETERMINACION DEL METANOL CON RELACION AL ETANOL O AL PROPANOL-2

1. OBJETO Y CAMPO DE APLICACION

Este método describe la determinación del metanol por cromatografía en fase gaseosa en todos los tipos de productos cosméticos (incluidos los aerosoles). Se aplica a concentraciones relativas del 0 al 10 %.

2. DEFINICION

El contenido en metanol determinado de acuerdo con este método se expresa en porcentaje de masa de metanol con relación a la masa de etanol o de propanol-2.

3. PRINCIPIO

La determinación se efectúa por cromatografía en fase gaseosa.

⁽¹⁾ Según la norma ISO 5725.

4. REACTIVOS

Todos los reactivos deben ser de calidad analítica.

4.1. Metanol

4.2. Etanol absoluto

4.3. Propanol-2

4.4. Cloroformo, enjuagado con agua para eliminar los alcoholes

5. APARATOS

5.1. Cromatógrafo en fase gaseosa con detector catarmétrico (para las muestras de productos en aerosoles).
Cromatógrafo en fase gaseosa con detector de ionización de llama (para las muestras de otros productos).

5.2. Matraces aforados de 100 ml

5.3. Pipetas graduadas (2 ml, 20 ml, 0-1 ml)

5.4. Microjeringas de 0 a 100 μ l y 0 a 5 μ l

Para las muestras de productos en aerosol solamente, jeringa de gas especial con válvula deslizando (figura 5 del método de muestreo)(¹)

6. PROCEDIMIENTO

6.1. Preparación de las muestras

6.1.1. Los productos en aerosol se tratan como se indica en el Capítulo II del Anexo de la Directiva de la Comisión 80/1335/CEE de 22 de diciembre de 1980(¹) y después se analizan por cromatografía en fase gaseosa en las condiciones prescritas en el punto 6.2.1.

6.1.2. Los demás productos tratados como se indica en el Capítulo II antes mencionado se diluyen en agua hasta una concentración del 1 al 2 % de etanol o de propanol-2, después se analizan por cromatografía en fase gaseosa en las condiciones prescritas en el punto 6.2.2.

6.2. Condiciones de la cromatografía en fase gaseosa

6.2.1. Para las muestras de productos en aerosol

6.2.1.1. Se utilizará una columna llena con un 10 % de Hallcomid M 18 en chromosorb W de 100 — 120 mallas y un detector catarmétrico.

6.2.1.2. La fase estacionaria debe dar un grado de resolución igual o superior a 1,5:

$$R = 2 \frac{d' R_2 - d' R_1}{W_1 + W_2}$$

en donde:

R_1 y R_2 = tiempo de retención expresado en min de 2 picos,

W_1 y W_2 = anchura de los mismos picos a media altura,

d' = velocidad de avance del papael en mm/min.

6.2.1.3. Las condiciones siguientes permiten obtener estos resultados:

Tipo de la columna: acero inoxidable

longitud: 3,5 m

diámetro: 3 mm

(¹) DO n° L 383 de 31. 12. 1980, p. 27.

Corriente del detector
 catarmétrico: 150 mA
 Gas vector: Helio — presión: 2,5 bares; caudal: 45 ml/min.
 Temperaturas:
 inyector: 150 °C
 detector: 150 °C
 columna: 65 °C

6.2.2. Para las muestras de otros productos:

6.2.2.1. Se utilizará una columna llena de chromosorb 105 o de porapak QS y un detector de ionización de llama.

6.2.2.2. La fase estacionaria debe tener un grado de resolución igual o superior a 1,5:

$$R = 2 \frac{d' R_2 - d' R_1}{W_1 + W_2}$$

en donde

R_1 y R_2 = tiempo de retención expresado en min de 2 picos,

W_1 y W_2 = anchura de los mismos picos a media altura,

d' = velocidad de avance del papel en mm/min.

6.2.2.3. Las condiciones siguientes permiten obtener estos resultados

Tipo de columna: acero inoxidable
 longitud: 2 m
 diámetro: 3 mm
 electrómetro: sensibilidad de $8 \cdot 10^{-10}$ A
 gas vector: nitrógeno — presión: 2,1 bares; caudal: 40 ml/min
 auxiliar: hidrógeno — presión: 1,5 bares; caudal: 20 ml/min
 Temperaturas:
 inyector: 150 °C
 detector: 230 °C
 columna: 120 °C ó 130 °C

7. CURVAS PATRON

7.1. En las condiciones prescritas en el punto 6.2.1. (columna Hallcomid M 18) utilizar las mezclas patrón que se definen a continuación. Preparar estas mezclas por medida volumétrica, pero determinar la cantidad exacta pesando inmediatamente después de cada adición.

Concentración relativa % m/m	Metanol ml	Etanol ml (o propanol-2)	Cloroformo hasta un volumen de
2,5 % aproximadamente	0,5	20	100 ml
5,0 % aproximadamente	1,0	20	100 ml
7,5 % aproximadamente	1,5	20	100 ml
10,0 % aproximadamente	2,0	20	100 ml

Inyectar de 2 a 3 μ l en el cromatógrafo de acuerdo con las condiciones prescritas en el punto 6.2.1. Calcular la relación de las superficies de los picos (metanol/etanol) o (metanol/propanol-2) de cada mezcla. Trazar la curva patrón utilizando:

como eje de las abscisas: el porcentaje de metanol en relación al etanol o al propanol-2,

como eje de las ordenadas: la relación de las superficies de los picos (metanol/etanol) o (metanol/propanol-2).

- 7.2 En las condiciones prescritas en el punto 6.2.2 (Porapak QS o Chromosorb 105) utilizar las mezclas patrón que se definen a continuación. Preparar estas mezclas por medida volumétrica, pero determinar la cantidad exacta pesando inmediatamente después de cada adición.

Concentración relativa % m/m	Metanol μ l	Etanol ml (o propanol-2)	Agua hasta un volumen de
2,5 % aproximadamente	50	2	100 ml
5,0 % aproximadamente	100	2	100 ml
7,5 % aproximadamente	150	2	100 ml
10,0 % aproximadamente	200	2	100 ml

Inyectar 2 a 3 μ l en el cromatógrafo de acuerdo con las condiciones prescritas en el punto 6.2.2. Calcular la relación de las superficies de los picos (metanol/etanol) o (metanol/propanol-2) de cada mezcla. Trazar la curva patrón utilizando:

como eje de las abscisas: el porcentaje de metanol en relación al etanol o al propanol-2,
como eje de las ordenadas: la relación de las superficies de los picos (metanol/etanol) o (metanol/propanol-2).

- 7.3. En ambos casos la curva patrón deberá ser una recta.

8. REPETIBILIDAD⁽¹⁾

Para los contenidos en metanol del 5 % en relación al etanol o al propanol-2, la diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas sobre la misma muestra no deberá sobrepasar el 0,25 %.

⁽¹⁾ Según la norma ISO 5725.