



# UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

## TRABAJO FIN DE ESTUDIOS

Título

Desarrollo y validación de un método para fragancias  
alergénicas en productos de limpieza y cosméticos

Autor/es

Naiara Lopez Fernandez

Director/es

MARÍA TERESA TENA VÁZQUEZ DE LA TORRE y MARÍA PILAR MARTÍNEZ  
MORAL

Facultad

Facultad de Ciencia y Tecnología

Titulación

Grado en Química

Departamento

QUÍMICA

Curso académico

2021-22



***Desarrollo y validación de un método para fragancias alergénicas en productos de limpieza y cosméticos***

, de Naiara Lopez Fernandez

(publicada por la Universidad de La Rioja) se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported.

Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.

© El autor, 2022

© Universidad de La Rioja, 2022

[publicaciones.unirioja.es](http://publicaciones.unirioja.es)

E-mail: [publicaciones@unirioja.es](mailto:publicaciones@unirioja.es)



# UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

Facultad de Ciencia y Tecnología

## TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA FRAGANCIAS ALERGÉNICAS  
EN PRODUCTOS DE LIMPIEZA Y COSMÉTICOS

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A METHOD FOR ALLERGENIC FRAGRANCES  
IN CLEANING PRODUCTS AND COSMETICS

Realizado por:

Naiara López Fernández

Tutelado por:

MARÍA TERESA TENA VÁZQUEZ DE LA TORRE

MARÍA PILAR MARTÍNEZ MORAL

**Logroño, 20 de junio del 2022**

# Contenido

<b>Abreviaciones</b> .....	3
<b>Resumen</b> .....	4
<b>Abstract</b> .....	5
<b>1. Objetivos</b> .....	6
<b>2. Introducción</b> .....	7
2.1. Legislación.....	8
2.2. Productos que contienen fragancias alergénicas.....	8
2.3. Métodos analíticos para determinar fragancias en productos de cuidado personal y cosméticos.....	10
<b>3. Experimental</b> .....	12
3.1. Materiales e instrumentos.....	12
3.2. Análisis GC-MS.....	13
<b>4. Resultados y discusión</b> .....	16
4.1. Desarrollo del método.....	16
4.1.1. Estudio de la influencia del disolvente y el filtro.....	16
4.1.2. Condiciones de separación cromatográfica.....	19
4.1.3. Condiciones de detección MS.....	22
4.2. Validación del método.....	31
4.2.1. Linealidad.....	32
4.2.2. Sensibilidad.....	33
4.2.3. Precisión.....	36
4.2.4. Estudio del efecto matriz para cuatro muestras.....	37
4.2.5. Exactitud.....	40
4.3. Análisis de muestras.....	42
<b>5. Conclusiones</b> .....	46
<b>6. Bibliografía</b> .....	47

## Abreviaciones

DAD:	Detector de fila de diodos
DER:	Desviación estándar relativa
EI	Ionización electrónica
ET:	Eau de toilette / agua de tocador
FID:	Detector de ionización en llama
GC:	Cromatografía de gases
HPLC:	Cromatografía líquida de alta presión
HS:	Espacio de cabeza
IC:	Intervalo de confianza
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
m/z	Relación carga-masa
MeOH:	Metanol
MS:	Espectrometría de masas
MSPD:	Dispersión de matriz en fase sólida
NIST	Instituto Nacional de Estándares y Tecnología
PLE:	Extracción con líquidos presurizados
QMS:	Espectrómetro de masas de cuadrupolo
QQQ:	Triple cuadrupolo
SEC:	Cromatografía de exclusión por tamaños
SIM	Espectrometría de monitorización de iones
SPME:	Micro-extracción en fase sólida
TIC	Corriente iónica total
TOFMS:	Espectrometría de masas de tiempo de vuelo
USAEME:	Micro extracción por emulsificación asistida por ultrasonidos seguida de la
VME	Voltaje del multiplicador de electrones

# Resumen

Este trabajo se ha centrado en la determinación de fragancias alergénicas que están presentes en la vida cotidiana de las personas ya que se emplean en productos de limpieza, cosméticos y productos de cuidado personal. Algunas de las fragancias utilizadas son sospechosas de provocar irritaciones, alergias u otras afecciones cutáneas, por lo que en la Unión Europea se ha establecido una legislación con la que se obliga a indicar en el etiquetado la presencia de dichas fragancias cuando sobrepasan un cierto porcentaje.

Durante este trabajo, se ha desarrollado un nuevo método analítico basado en la dilución de la muestra seguida de cromatografía de gases y detección por espectrometría de masas (GC-MS), para la determinación de doce fragancias sospechosas de provocar reacciones cutáneas en productos de cuidado personal y cosméticos. En primer lugar, se realizó un estudio de campo para seleccionar las fragancias más abundantes, y un estudio bibliográfico que recoge los métodos empleados para su determinación. En el desarrollo del método, los efectos del filtro y el disolvente se han evaluado mediante un estudio ANOVA y un estudio de la *t* de student. Se utilizó una columna capilar de 5% difenil-95% dimetilpolisiloxano. Las condiciones óptimas para la separación cromatográfica implicaron un volumen de inyección de 2  $\mu$ l y a un caudal de Helio de 1,0 ml/min. El gradiente de temperatura del horno cromatográfico se programó desde 50°C hasta 250°C. La temperatura del inyector se mantuvo a 350 °C y la de la línea de transferencia a 275°C. La ionización de las fragancias se realizó por impacto electrónico.

Para validar el método desarrollado, se han estudiado las propiedades del método, mostrando una buena linealidad ( $R \geq 0,99$ ) así como una buena precisión ( $DER < 15\%$ ). Los límites de detección oscilaron entre 0,5 ng/ml y 2 ng/ml, valores muy por debajo de las restricciones establecidas. La exactitud se demostró a través de las recuperaciones cuantitativas de todos los compuestos estudiados y la ausencia de efectos de matriz permitió la cuantificación de los compuestos por calibración con soluciones estándar de doce fragancias alergénicas.

## Abstract

The main objective of this work is the determination of allergenic fragrances that are present in people's daily activities since they are used in cleaning products, cosmetics and personal care products. Some of those fragrances are suspected of causing irritations, allergies or other skin conditions. For that reason, the European Union has established legislation that requires the presence of these fragrances to be indicated on the label when they exceed a certain percentage.

In this work, a new analytical method based on sample dilution followed by gas chromatography and mass spectrometry detection (GC-MS) has been developed for the determination of twelve fragrances suspected of causing skin reactions in cosmetic and personal care products. At the beginning of this work, a field study to select the most abundant fragrances, and a bibliographic study that collects the methods used for their determination were carried out. Along the method development, the effects of the filter and the solvent have been evaluated using an ANOVA study and a student's t-test. GC separation was accomplished in a capillary column with 5% diphenyl-95% dimethylpolysiloxane phase. Optimal conditions for chromatographic separation were an injection volume of 2  $\mu$ l and Helium flow rate of 1.0 ml/min. The temperature gradient of the chromatographic oven was programmed from 50°C to 250°C. The injector temperature was maintained at 350°C and the transfer line temperature at 275°C. The ionization of the fragrances was carried out by electronic impact.

Method validation was accomplished through its characterization, showing good linearity ( $R \geq 0.99$ ) as well as good precision ( $DER < 15\%$ ). Detection limits ranged between 0.5 ng/ml and 2 ng/ml, values well below the established restrictions. Accuracy was calculated through the quantitative recoveries of all the compounds studied, and the absence of matrix effects allowed the quantification of the compounds by calibration with standard solutions of twelve allergenic fragrances.

# 1. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es el desarrollo de un método analítico basado en GC-MS que permita la determinación de fragancias alergénicas en cosméticos, productos de higiene personal y productos de limpieza; así como su aplicación en prácticas de laboratorio de una asignatura que se imparte en el Máster de Química y Biotecnología impartido por la Universidad de la Rioja.

Los objetivos propuestos en la asignación del tema son los siguientes:

- Realizar un estudio de campo para recoger la información de productos que contienen fragancias alergénicas, y llevar a cabo una búsqueda bibliográfica de los distintos métodos empleados para la determinación de los analitos.
- Identificar las señales obtenidas del análisis GC-MS mediante la comparación de espectros de masas experimentales con referencias extraídas de librerías espectrales.
- Optimizar el método GC-MS para la determinación de fragancias alergénicas. Las diferentes variables a estudiar son: rampa de temperatura del horno cromatográfico, temperatura de inyección, temperatura de la línea de transferencia, dilución de la muestra, disolvente empleado para la extracción de los analitos y el material del filtro utilizado.
- Validar el método mediante estudio de linealidad, sensibilidad (límites de detección y cuantificación), precisión (repetibilidad y precisión intermedia), estudio del efecto matriz en diferentes muestras y exactitud (recuperación).
- Analizar muestras que contengan las fragancias alergénicas estudiadas, cuantificando la concentración de los analitos en el producto, y comprobar que cumplen la legislación vigente en la Unión Europea.

## 2. Introducción

En la Unión Europea las restricciones legales limitan el uso de 24 fragancias ya que son sospechosas de provocar reacciones en la piel y, por ello deben de estar indicadas en la etiqueta en caso de superar un determinado porcentaje que varía en función de si es un producto que se aclara o no. Las fragancias son componentes que se encuentran presentes en muchos productos de nuestra vida cotidiana, como cosméticos, productos del hogar, productos para la ropa, perfumes... etc. En la actualidad se emplean gran variedad de fragancias, y generalmente son inocuas para la salud, sin embargo, hay ciertos compuestos que pueden provocar en ocasiones irritación de la piel y/o alergias. Por este motivo es importante el desarrollo de métodos de análisis rutinarios para la determinación de estos compuestos y garantizar que los productos cumplan con la legislación.

Los posibles efectos negativos y la legislación vigente han conducido a la inclusión del término “sin perfume” en varios productos cosméticos como avance positivo.

En la siguiente tabla se muestran las 24 fragancias alergénicas reguladas y los parámetros para su identificación como su número CAS (número de identificación internacional), número CE (número de identificación europeo), masa molar y punto de ebullición.

*Tabla 1: Listado de las 24 fragancias alergénicas*

Nombre común	Nombre químico	Nº CAS	Nº CE	Masa molar (g/mol)	Punto de ebullición (°C)
Alfa-isometil ionona	3-Metil-4-(2,6,6-trimetil-2-ciclohexen-1-il)-3-buten-2-ona	127-51-5	204-846-3	206.32	76
Amil cinamal	2-Bencilidenheptanal	122-40-7	204-541-5	202.29	284
Alcohol amilcinámico	2-Pentil-3-fenilprop-2-en-1-ol	101-85-9	202-982-8	204.30	
Alcohol anísico	Alcohol 4-metoxibencílico	105-13-5	203-273-6	138.10	259
Alcohol bencílico	Alcohol bencílico	100-51-6	202-859-9	108.14	205
Benzoato de bencilo	Benzoato de bencilo	120-51-4	204-402-9	212.24	324
Cinamato de bencilo	Éster fenilmetílico del ácido 2-propenoico	103-41-3	203-109-3	238.28	350
Salicilato de bencilo	Salicilato de bencilo	118-58-1	204-262-9	228.24	320
Lilial	2-(4-tert-Butilbencil) propionaldehído	80-54-6	201-289-8	204.31	280
Cinamal	3-Fenil-2-propenal	104-55-2	203-213-9	132.16	246
Cinamil alcohol	Alcohol cinámico	104-54-1	203-212-3	134.17	250
Citral	3,7-Dimetil-2,6-octadienal	5392-40-5	226-394-6	152.23	228
Citronelol	(±)-3,7-Dimetil-6-en-1-ol	106-22-9 26489-01-0	203-375-0 247-737-6	156.26	224
Cumarina	2H-1-Benzopiran-2-ona	91-64-5	202-086-7	146.14	301
Eugenol	2-Metoxi-4-(2-propenil) fenol	97-53-0	202-589-1	164.20	254
Farnesol	3,7,11-Trimetil-2,6,10-dodecatrien-1-ol	4602-84-0	225-004-1	222.37	110
Geraniol	(2E)-3,7-Dimetil-2,6-octadien-1-ol	106-24-1	203-377-1	154.25	230
Hexil cinamal	2-Bencilidenoctanal	101-86-0	202-983-3	216.32	308
Hidroxicitronelal	7-hidroxi-3,7-dimetil-2-octanal	107-75-5	203-518-7	172.26	241
Hidroxiisohexil 3-ciclohexano	3 y 4-(4-Hidroxi-4-metilpentil) ciclohex3-en-1-carbaldehído	51414-25-6 31906-04-4	257-187-9 250-863-4	210.31	
Isoeugenol	2-Metoxi-4-(1-propenil) fenol	97-54-1	202-590-7	164.20	266
D-limoneno	(4R)-1-Metil-4-(1-metiletenil) ciclohexeno	5989-27-5	227-813-5	136.23	176
Linalol	3,7-Dimetil-1,6-octadien-3-ol	78-70-6	201-134-4	154.25	198
Foliona	2-octionato de metilo	111-12-6	203-836-6	154.21	219

## 2.1. Legislación

Los servicios de la Comisión están evaluando el etiquetado de las fragancias alergénicas en productos cosméticos y de cuidado personal.

De acuerdo con lo indicado en el Artículo 19 (1) del Reglamento No. 1223/ (reglamento de cosméticos), deben estar indicados los ingredientes en el etiquetado de productos cosméticos. Sin embargo, las denominaciones "perfume" o "aroma" se pueden emplear para composiciones aromáticas y sus materias primas. Con excepción de esta terminología, actualmente, existen 26 fragancias alergénicas que están sujetas a un etiquetado individual (anexo III del reglamento de cosméticos).

El etiquetado individual de las fragancias alergénicas en cosméticos y productos de limpieza establece que para artículos que no se aclaran han de indicarse en la etiqueta en caso de sobrepasar el 0,001% (10 µg/ml); mientras que para artículos que se aclaran han de indicarse si superan el 0,01% (100 µg/ml).

En respuesta a esta solicitud de los servicios de la Comisión, el Comité científico sobre seguridad de los consumidores (SCCS) publicó un dictamen sobre las fragancias alergénicas en productos cosméticos (SCCS/1459/11) en junio de 2012. En él, se declara debe informarse a los consumidores sobre fragancias adicionales en dichos productos, además de los 26 compuestos sujetos a etiquetado individual.

Más recientemente, en 2020 se publicó un estudio sobre el etiquetado de alérgenos de fragancias en productos cosméticos encargado por la Comisión Europea. [2] [3]

## 2.2. Productos que contienen fragancias alergénicas

Debido a que la lista de fragancias alergénicas es amplia, se llevó a cabo un estudio de campo para determinar cuáles nos parecían las más importantes para incluir en este trabajo. Nuestro criterio de selección consistió en elegir aquellos compuestos que fueran más abundantes en la vida cotidiana del consumidor, por lo que nos centramos en productos que están al alcance.

Decidimos que los supermercados son muy habituales en la rutina de las personas y, por tanto, nos centramos en ellos para localizar información sobre la abundancia de estas fragancias en productos habituales de un hogar.

En primer lugar, se reunieron 100 etiquetas de distintos cosméticos y productos de limpieza de varios supermercados locales, y se recogieron las apariciones de cada compuesto en las etiquetas. Finalmente se representó su abundancia respecto a los 100 productos. (Figura 1)

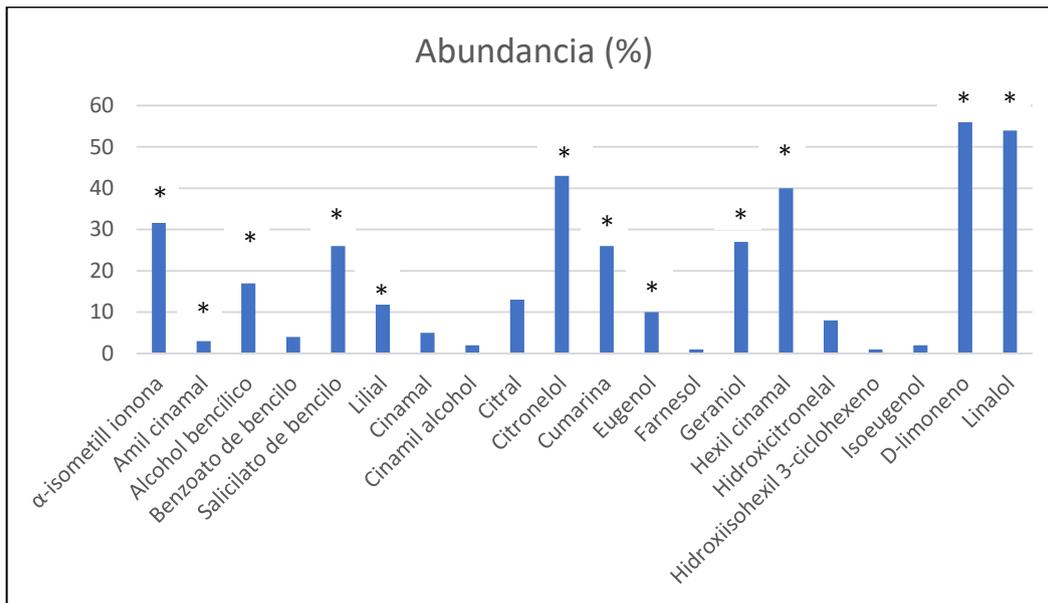


Figura 1: Apariciones de cada compuesto en 100 productos seleccionados

Los compuestos alcohol amilcinámico, alcohol anísico, cinamato de bencilo y 2-octionato de metilo no se incluyeron en la Figura 1 debido a que no estaban presentes en ningún producto. Aquellos compuestos marcados con un asterisco (\*) fueron los seleccionados para este trabajo. Se partieron de nueve fragancias disponibles en el laboratorio, D-limoneno, linalol, citronelol, eugenol, geraniol, alfa-isometil ionona, hexil cinamal, amil cinamal, y lilial. Observando los datos de la Figura 1, se seleccionaron tres fragancias más debido a su alta abundancia, cumarina, alcohol bencílico y salicilato de bencilo. Además, casi todos de los seleccionados estaban presentes en más de una clase de producto.

Además, como las 100 etiquetas seleccionadas implicaban diferentes clases de productos, se representó en la siguiente figura cada compuesto en función de su abundancia (%) respecto al tipo de producto. Decidimos dividir las clases en productos para el hogar (PH), productos de cuidado personal (PCP) y productos para la ropa (PR).

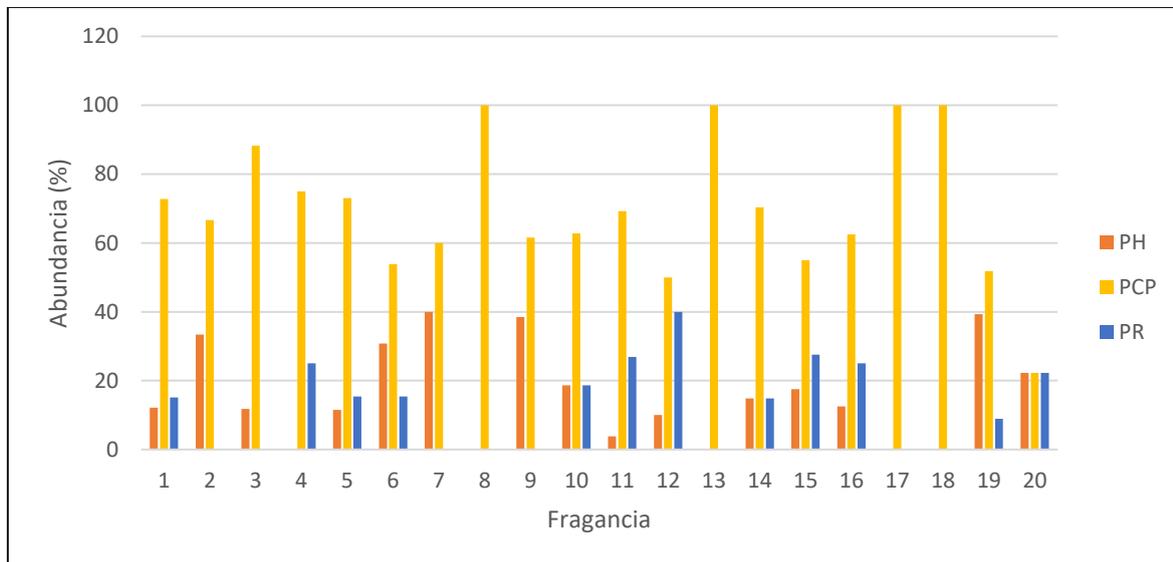


Figura 2: Abundancia de los compuestos en función del tipo de producto

- |  |                    |                                    |
|--|--------------------|------------------------------------|
| 1- Alfa-isometil ionona                | 8- Cinamil alcohol | 15- Hexil cinamal                  |
| 2- Amil cinamal                        | 9- Citral          | 16- Hidroxicitronelal              |
| 3- Alcohol bencílico                   | 10- Citronelol     | 17- Hidroxiisohexil -3-ciclohexeno |
| 4- Benzoato de bencilo                 | 11- Cumarina       | 18- Isoeugenol                     |
| 5- Salicilato de bencilo               | 12- Eugenol        | 19- D-limoneno                     |
| 6- Butilphenil metilpropional (Lilial) | 13- Farnesol       | 20- Linalol                        |
| 7- Cinamal                             | 14- Geraniol       |                                    |

Los compuestos alcohol amilcinámico, alcohol anísico, cinamato de bencilo y metil 2-octionato no se incluyeron en la Figura 2 debido a que no se encontraron en ningún producto.

Algunas de las características de estas doce fragancias se pueden clasificar en su aroma y su color. Por ejemplo, el D-limoneno tiene un olor cítrico y es incoloro. El alcohol bencílico es un líquido incoloro, con un olor aromático débil. El lialil presenta un aroma floral y es incoloro. El Hexil cinamal es un líquido amarillo pálido, de olor a Jazmín. De la misma forma, el amil cinamal es un aroma floral a Jazmín, y es amarillo pálido. El citronelol naturalmente se encuentra en el aceite de rosa y geranio, y proporciona un aroma a flores rosas. El salicilato de bencilo aporta un aroma balsámico y es incoloro. EL eugenol es de color amarillo pálido y aporta un aroma a especias. El geraniol es un aceite esencial con olor rosáceo. En el caso del linalol es incoloro con aroma floral. La cumarina incolora con olor que se asemeja a heno. Por último, la alfa-isometil ionona es incolora y proporciona un aroma a violetas.

### 2.3. Métodos analíticos para determinar fragancias en productos de cuidado personal y cosméticos

La variedad de muestras en las que deben analizarse las fragancias alergénicas es muy amplia e incluye matrices muy complejas. Además, el rango de concentración de los analitos en estas matrices puede fluctuar desde pocos microgramos por gramo hasta miligramos por gramo.

Mayoritariamente la preparación de muestras líquidas precisa un solo paso de dilución y permite la determinación de las fragancias alergénicas. Las interferencias ocasionales en la muestra pueden solucionarse empleando columnas selectivas, gradientes de temperatura óptimos y seleccionando iones específicos.

Por el contrario, el análisis directo de otras muestras cosméticas, como cremas y lociones que exigen un esfuerzo mayor, pueden provocar mayores interferencias con los picos estudiados y, por ello, se emplean otros tratamientos como la dispersión en matriz de fase sólida. Además, el análisis de estas matrices complejas es bastante problemático ya que después de algunas inyecciones puede producirse contaminación de la entrada cromatográfica y la columna.

Por lo tanto, se realizó un estudio bibliográfico de los métodos de análisis que se utilizan para determinar estas fragancias alergénicas y la información más relevante que se obtuvo se encuentra en la Tabla 2.

Tabla 2: Métodos analíticos para fragancias encontrados en la bibliografía

Muestras	Tratamiento	Cromatografía (tipo de inyección)	Columna cromatográfica	Detector	Referencia
Perfumes	Dilución 1:10 y 1:20 EtOH:H <sub>2</sub> O	GC (split)	Watercol™ 1460	QQQ MS	[4]
Perfumes y aguas de baño	USAEME	HPLC	XDB-C18 <sup>(1)</sup>	DAD	[5]
Perfumes	Dilución 1:100 Acetona	GC	DB-5	TOFMS	[6]
Perfumes		GC (splitless)	SLB-5ms y SLB-35	QMS	[7]
Champú y agua para la piel	SPME	GC (splitless)	OV1701	FID	[8]
Toallitas de bebé	PLE	GC (splitless)	SLB-5ms	QMS	[9]
Cremas, geles y lociones	Extracción líquida (Hexano)	HS-GC (splitless)	VF-5 ms	QMS	[10]
Champú, pasta de dientes, gel	MSPD y derivatización	GC (splitless)	SLB-5ms	QQQ MS	[11]
Perfumes, cremas, toallitas	PLE, MSPD y derivatización	GC (splitless)	HP5-MS	MS	[12]
Perfumes	Dilución 1:10 Acetona	GC (split)	DB-Wax polar y Rtx-5	MS	[13]
Cremas, lociones, geles	MSPD	GC (splitless)	HP5	QMS	[14]
Perfumes y ET	Dilución 1:10 Acetato de etilo	GC (splitless)	HP5 y VF-1701ms	MS	[15]
Cremas, lociones	PLE	GC (splitless)	HP5	MS	[16]
Cremas, lociones, aceites	SEC	GC (splitless)	DB-35	MS	[17]
Ambientador	Dilución 1:10 hexano	GC (splitless)	BPX5	FID	[18]

(1) Fase móvil H<sub>2</sub>O-CH<sub>3</sub>CN

Como se puede observar, lo más empleado es la cromatografía de gases, aunque también se ha empleado HPLC en muestras de agua de baño, agua de piscina, leche corporal y colonias.

En aquellos casos en los que se emplearon cromatografía de gases, mayoritariamente la inyección fue splitless (sin división) donde la totalidad de la muestra es introducida en la columna. Como excepción se encontraron trabajos con inyección de espacio de cabeza e inyecciones en modo split donde parte del analito se desecha antes de llegar a la columna. De manera general, se emplea un gradiente de temperatura durante el análisis.

Por otro lado, en el caso del tratamiento de muestra, aquellos que presentan matrices líquidas y poco complejas (como perfumes), realizan una dilución en distintos disolventes de 1:10 o 1:20. Sin embargo, para productos con matriz más densa y compleja como cremas y lociones, se utilizaron métodos como la dispersión de la matriz en fase sólida y extracción con líquidos presurizados. Por último, el principal detector ha sido el espectrómetro de masas, aunque también se han empleado como excepción FID y DAD (en el caso de HPLC).

## 3. Experimental

### 3.1. Materiales e instrumentos

En este trabajo se ha empleado un cromatógrafo de gases de la marca Agilent, modelo 8890 GC System, acoplado a un espectrómetro de masas de un cuadrupolo modelo 5977B GC/MSD, también de la marca Agilent. La inyección se llevó a cabo con un inyector automático de la misma marca y modelo 7693 autosampler.

La columna capilar analítica empleada fue una HP-5MS obtenida a través del proveedor Agilent y cuyas dimensiones son 30 m x 250  $\mu\text{m}$  de diámetro interior y 0,25  $\mu\text{m}$  de espesor, de fase estacionaria 5% difenil-95% dimetilpolisiloxano.

Los disolventes orgánicos que se emplearon fueron de la marca Scharlau grado de HPLC y los filtros de jeringa Nylon 0,20 $\mu\text{m}$  y PTFE 0,22 $\mu\text{m}$ .

Para la agitación de las muestras se usó un vortex (*Advanced Vortex Mixer ZX3 de Velp científica*).

Las muestras empleadas para el análisis fueron: un suavizante de ropa marca Eroski, un desinfectante de manos marca Deliplus, un champú de pelo marca Deliplus y un limpiador facial marca Cien, se compraron en supermercados locales y se almacenaron a temperatura ambiente hasta su determinación.

Las disoluciones de patrón concentradas se prepararon en 25,0 ml de acetato de etilo, pesando entre 0,0500 y 0,100 g (concentraciones de 4000-2000  $\mu\text{g/ml}$ ).

Estas disoluciones se diluyeron hasta ~40  $\mu\text{g/ml}$  en matraces aforados de 10,0 ml. Además, se preparó una mezcla con todos los patrones a la misma concentración (40  $\mu\text{g/ml}$ ).

Durante este estudio se prepararon varias mezclas patrón de concentraciones de 40,0 ; 10,0 ; 1,00 y 0,500  $\mu\text{g/ml}$ . Todas las disoluciones se almacenaron en viales dentro del frigorífico.

Los compuestos de referencia empleados y su pureza o calidad se indican en la Tabla 3.

Tabla 3: Patrones empleados en este trabajo

Compuesto	Pureza (%) / Calidad
D-limoneno	97
Alcohol bencílico	Estándar analítico
Linalol	97
Citronelol	95, mezcla de isómeros
Geraniol	98
Eugenol	99
Cumarina	Material de referencia
Alfa-Isometil ionona	Estándar analítico
Lilial	Estándar analítico
Amil cinamal	97
Hexil cinamal	85
Salicilato de bencilo	Estándar analítico

Todos los compuestos de referencias fueron adquiridos a través del proveedor Sigma-Aldrich.

Para el tratamiento de datos y elaboración de las figuras se usó el programa Excel. Se utilizó el programa IBM SPSS para el análisis estadístico de ANOVA.

### 3.2. Análisis GC-MS

Mediante diferentes pruebas, variando los valores de los parámetros del cromatógrafo de gases y detector de espectrometría de masas, se consiguieron las condiciones óptimas para el análisis de las fragancias alergénicas. En primer lugar, el volumen de inyección se estableció en 2  $\mu\text{l}$  y se empleó helio como gas portador a un flujo de columna constante de 1,0 ml/min. El gradiente de temperatura del horno de la cromatografía se programó desde 50 °C (mantenida 0,1 min) hasta 75 °C aumentando 5 °C/min; después hasta 100 °C subiendo 10 °C/min y una rampa final hasta 250 °C (mantenida 0,9 min) incrementando 30 °C/min, para la inyección se utilizó el modo sin división (mantenido 0,05 min) y después de eso, el flujo de división se fijó en 250 ml/min. La temperatura del inyector se mantuvo a 350 °C y la de la línea de transferencia a 275°C.

El sistema GC-MS se controló con el software GC/MSD MassHunter WorkStation de la compañía Agilent y los cromatogramas fueron integrados con el software MS Quantitative Analysis (Quant-My-Way) y Qualitative Analysis 10.0 de la misma compañía.

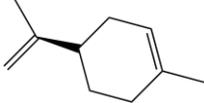
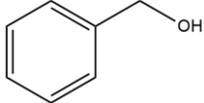
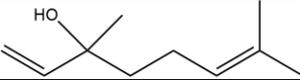
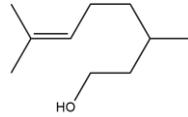
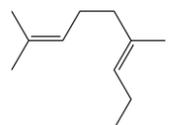
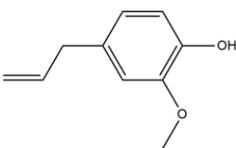
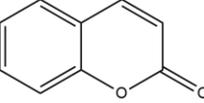
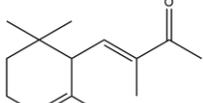
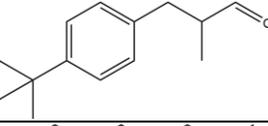
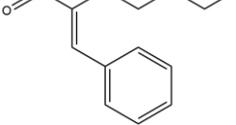
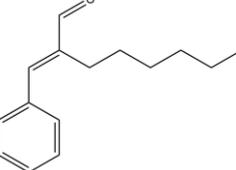
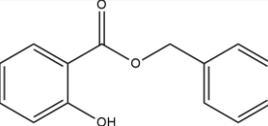
La ionización de las fragancias se llevó a cabo mediante ionización electrónica de 1126 eV. En el modo de escaneo (scan), el rango de masa se varió de 50 a 250 m/z con una frecuencia de escaneo de 3,6 s<sup>-1</sup>. Se suele establecer un retraso del disolvente denominado 'solvent delay' para impedir que el disolvente llegue al detector y así evitar que este pueda verse deteriorado. En nuestro caso se estableció el retraso del disolvente en tres minutos, es decir, el detector de espectrometría de masas se mantuvo inactivo hasta alcanzar los tres minutos tras la inyección.

Los picos se identificaron por su tiempo de retención mediante inyección individual en el cromatógrafo. Sus espectros de masas se determinaron por comparación con los espectros de la librería NIST. El software empleado para la dicha identificación fue Unknowns Analysis (Quant-My-Way) de la compañía Agilent.

Se empleó el modo SIM para la cuantificación, este modo consiste en una monitorización selectiva de iones característicos de los compuestos presentes en la muestra. En este modo el detector de espectroscopía de masas es muy sensible y selectivo, es la manera de determinar trazas de compuestos conocidos de forma cuantitativa.

De este modo se mantuvieron las mismas condiciones empleadas para scan, que se han indicado anteriormente, y se fijaron los iones de cuantificación e identificación recogidos en la Tabla 4 junto a la estructura de cada compuesto:

Tabla 4: Iones seleccionados por la detección MS en modo SIM

Compuesto	t <sub>R</sub> (min)	m/z (T)	m/z (Q)	Estructura
D-limoneno	7,73	93	136	
Alcohol bencílico	7,80	79	108	
Linalol	8,69	93	154	
Citronelol	9,87	95	156	
Geraniol	10,07	69	154	
Eugenol	10,75	164	149	
Cumarina	11,25	118	146	
Alfa-Isometil ionona	11,40	135	206	
Lilial	11,61	189	204	
Amil cinamal	12,13	129	202	
Hexil cinamal	12,52	129	216	
Salicilato de bencilo	13,03	91	228	

t<sub>R</sub> tiempo de retención; T, ion de cuantificación (*Target*); Q ion de identificación (*Qualifier*)

Los iones de cuantificación se seleccionaron por su abundancia en el espectro de masas ( $m/z$ ) de cada compuesto. En el caso de los iones de cualificación se seleccionó el  $m/z$  correspondiente al ion molecular.

Como excepción, para el eugenol se seleccionó el ion molecular para cuantificar, y el más abundante como ion identificador debido a que el primero era más intenso que el fragmento. Esto puede deberse a la energía de ionización empleada.

En modo SIM y scan el cromatograma utilizado se denomina TIC, se trata del cromatograma correspondiente a la suma de la señal (corriente) que producen todos los iones. La Figura 3 muestra un cromatograma TIC para el modo scan y la Figura 4 representa un cromatograma TIC para el modo SIM, ambas figuras se obtuvieron por inyección de los compuestos de referencia:

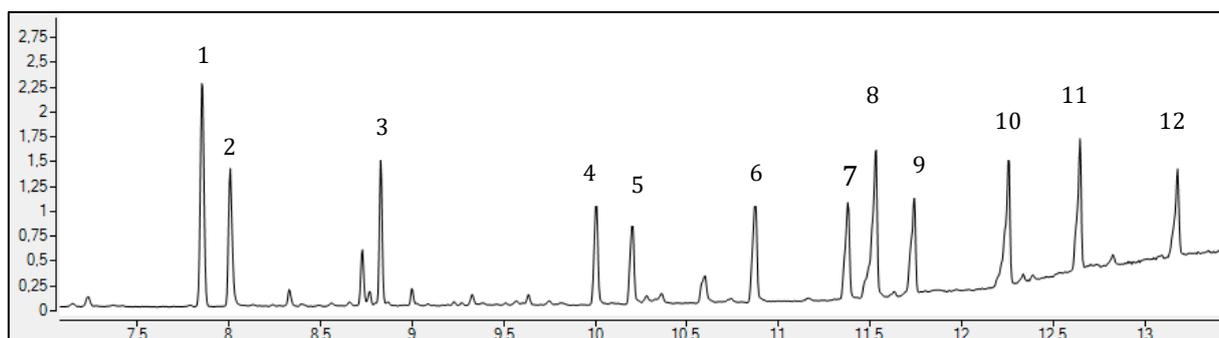


Figura 3: Cromatograma TIC del modo scan para una concentración de 1  $\mu\text{g/ml}$ . Identificación de los picos: 1) D-limoneno, 2) alcohol bencílico, 3) linalol, 4) citronelol, 5) geraniol, 6) eugenol, 7) cumarina, 8) alfa-isometil ionona, 9) lillial, 10) amil cinamal, 11) Hexil cinamal y 12) salicilato de bencilo.

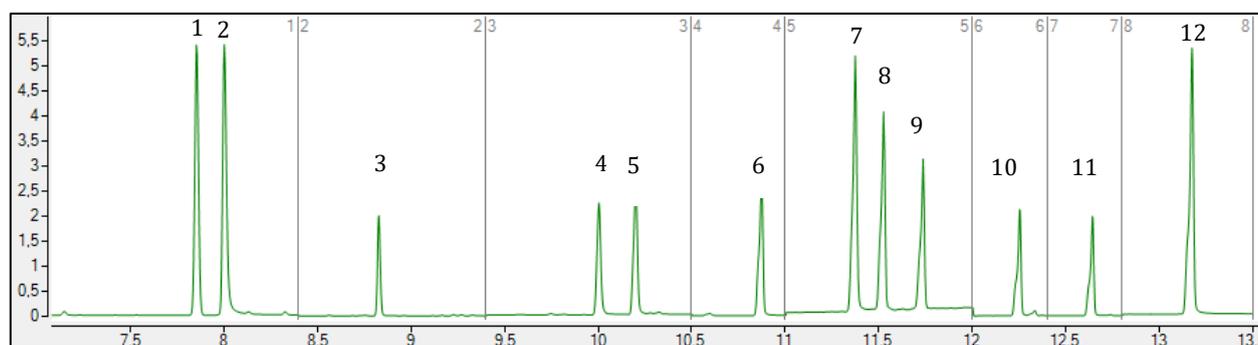


Figura 4: Cromatograma TIC del modo SIM de una concentración de 1  $\mu\text{g/ml}$ . Identificación de los picos: 1) D-limoneno, 2) alcohol bencílico, 3) linalol, 4) citronelol, 5) geraniol, 6) eugenol, 7) cumarina, 8) alfa-isometil ionona, 9) lillial, 10) amil cinamal, 11) Hexil cinamal y 12) salicilato de bencilo.

Como podemos observar, en el modo SIM se incrementa la sensibilidad porque aumenta la relación señal/ruido al llegar menos iones al detector, y resulta ser más selectivo puesto que muchos de los compuestos que coelúan procedentes del fondo o la matriz desaparecen al no llegar al detector. Además, se emplea este modo para la cuantificación de las muestras porque proporciona una mejor reproducibilidad cuantitativa que el modo scan, sin embargo, este último permite obtener el espectro para identificar mientras que en SIM no es posible.

## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Desarrollo del método

En primer lugar, se optimizaron las condiciones de separación del cromatógrafo para obtener picos simétricos y separados (sin solapamiento de compuestos) usando una mezcla patrón.

Las condiciones iniciales para los estudios preliminares consistieron en diluir 0,1g de muestra en 10,0 ml de disolvente, filtrarlo y analizarlo por GC-MS. En primer lugar, se realizó un estudio del efecto del disolvente en las señales de las fragancias alergénicas. También se estudió el material del filtro empleado.

Por último, se mejoró la detección seleccionando los iones más abundantes del espectro.

#### 4.1.1. Estudio de la influencia del disolvente y el filtro

La influencia del disolvente utilizado para diluir las muestras se estudió para establecer con qué disolvente se disolvían mejor las fragancias y seleccionar el que proporcionaba las mejores señales.

Se emplearon cuatro disolventes: metanol, hexano, acetato de etilo y acetona. Se utilizó una mezcla de fragancias disponibles en el laboratorio (un total de nueve analitos) con una concentración de 1000 µg/ml en metanol, y se diluyó con cada disolvente en matraces aforados a una concentración de 10,0 µg/ml. Estas diluciones se inyectaron por triplicado, y se recogieron los datos en la siguiente figura donde se representa la media de las áreas con las correspondientes barras de error representando  $\pm 2s$  (dos veces la desviación estándar).

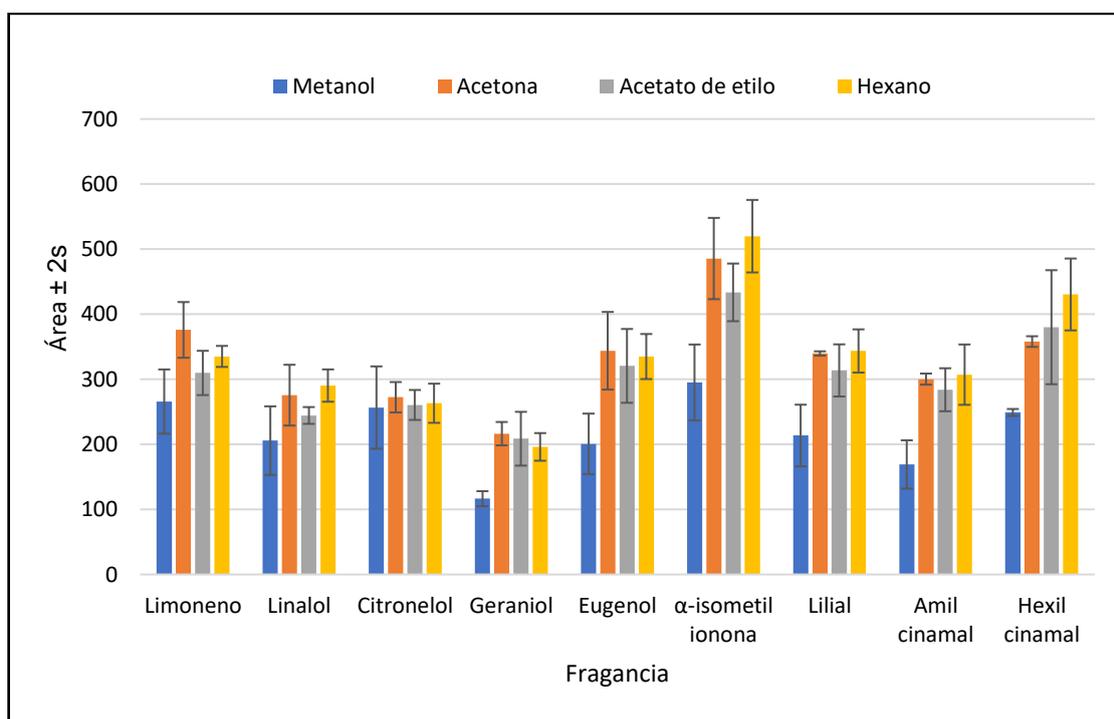


Figura 5: Influencia del disolvente en la señal para disoluciones patrón

Como podemos observar en la Figura 5, las barras de error del acetato de etilo, acetona y hexano solapan en casi todos los compuestos, por lo que se podría afirmar que no hay diferencias significativas entre esos tres disolventes.

A continuación, se estudió el efecto del disolvente en la disolución de una muestra compuesta por tres productos (detergente Ariel, suavizante Mimosin y detergente Norit diario), se preparó una mezcla con aproximadamente 3 gramos de cada muestra. Después, se pesaron aproximadamente 0,1 g de la mezcla y se llevaron a matraces aforados de 10,0 ml con los cuatro disolventes estudiados, se agitaron 30 segundos en vortex para asegurar su homogeneización. Finalmente, las disoluciones se filtraron con dos tipos de filtros, Nylon 0,20  $\mu\text{m}$  y PTFE 0,22  $\mu\text{m}$ , para estudiar la influencia del factor de retención en el filtro.

Se analizaron las fragancias presentes en las muestras comerciales, con un total de ocho analitos, ya que ninguna de las muestras presentaba lialil. Se valoró la adición de este, pero afectaría a la matriz de la muestra y se decidió llevar a cabo el estudio sin lialil.

Con los datos obtenidos se calcularon las medias de las tres inyecciones y la desviación estándar (s). Los resultados se muestran en las Figuras 4 y 5. Las barras de error representan  $\pm 2s$  (dos veces la desviación estándar).

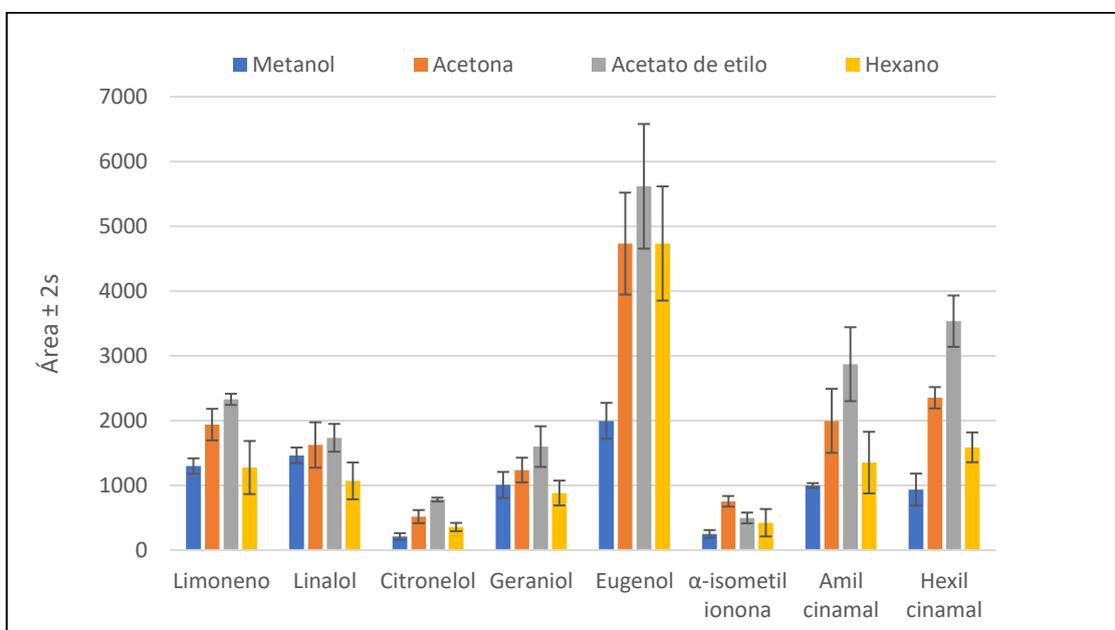


Figura 6: Influencia del disolvente para una mezcla de muestras comerciales usando un filtro de Nylon 0,20  $\mu\text{m}$

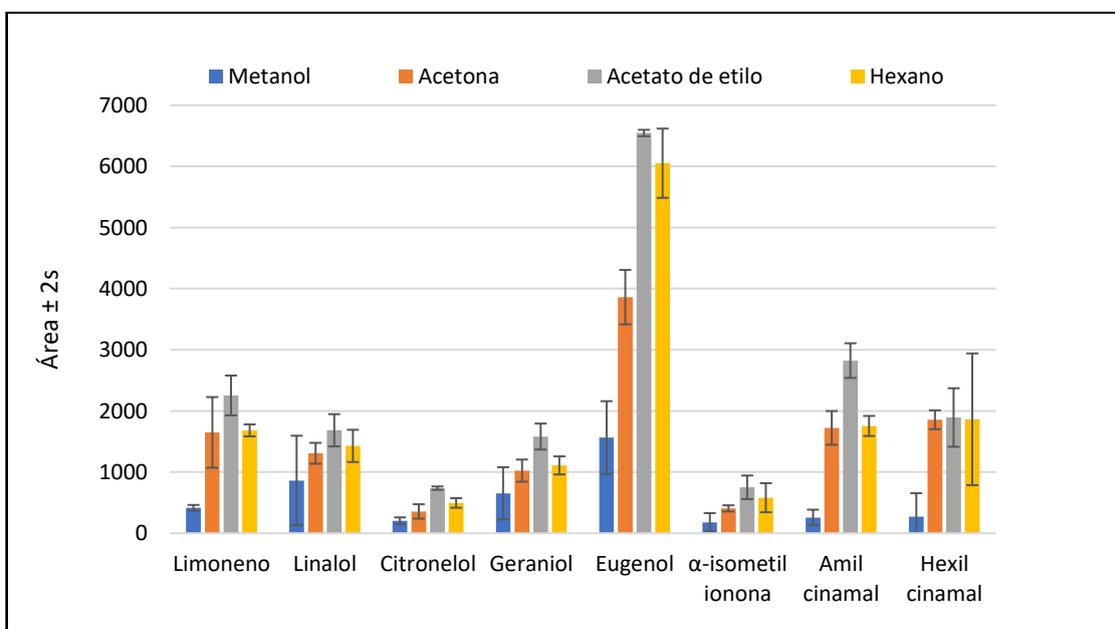


Figura 7: Influencia del disolvente para una mezcla de muestras comerciales usando un filtro de PTFE 0,22  $\mu\text{m}$

Con estos datos se llevó a cabo un estudio ANOVA. Primero, se estudió la homogeneidad de las varianzas con la prueba de Levene donde todos los p-valor fueron mayores a 0,05 ; lo que significa que las varianzas de las señales son homogéneas, por lo que se puede aplicar ANOVA.

En el estudio ANOVA se obtuvieron p-Valores inferiores al 0,05 (en torno al 0,01) en casi todos los disolventes en cada compuesto, lo cual significa que los disolventes presentan diferencias significativas. Como excepción, el acetato de etilo daba resultados similares a la acetona para el linalol, y similares al hexano para el D-limoneno, geraniol y amil cinamal.

Estas conclusiones fueron iguales para ambos filtros, ya que presentaban p-Valores similares en casi todos los casos, por lo que se decidió que el disolvente óptimo para este estudio sería el acetato de etilo.

Por último, se realizó un estudio de la t-student para valorar la influencia del filtro. Se obtuvieron los siguientes p-valores, donde se indican en rojo aquellos que presentan diferencias significativas entre los filtros, y marcados con un asterisco (\*) aquellos que presentaron varianzas desiguales (Prueba F).

*Tabla 5: p-Valores obtenidos en la comparación de filtros usando el ensayo de la t de student.*

Test de la t de student (p-valor) (95%)				
Compuesto	MeOH	Acetato de etilo	Acetona	Hexano
D-Limoneno	0,0003	0,49	0,19	0,029
Linalol	0,11*	0,64	0,049	0,032
Citronelol	0,48	0,023	0,023	0,0089
Geraniol	0,060	0,88	0,048	0,031
Eugenol	0,067	0,079*	0,029	0,00023
Alfa-Isometil ionona	0,21	0,013	0,0011	0,16
Amil cinamal	0,00022	0,81	0,17	0,050
Hexil cinamal	0,017	0,00079	0,0016	0,48*

Centrándonos en el acetato de etilo, ya que hemos decidido que era el disolvente óptimo para el estudio, se observa que, para el citronelol, eugenol, alfa-isometil ionona y hexil cinamal hay diferencias significativas entre los filtros.

Se representaron los valores medios de área de pico de cada compuesto para los cuatro disolventes con sus correspondientes barras de error que representan  $\pm 2s$  (dos veces la desviación estándar). A continuación, se muestra una de las representaciones que corresponde al análisis con acetato de etilo (Figura 8)

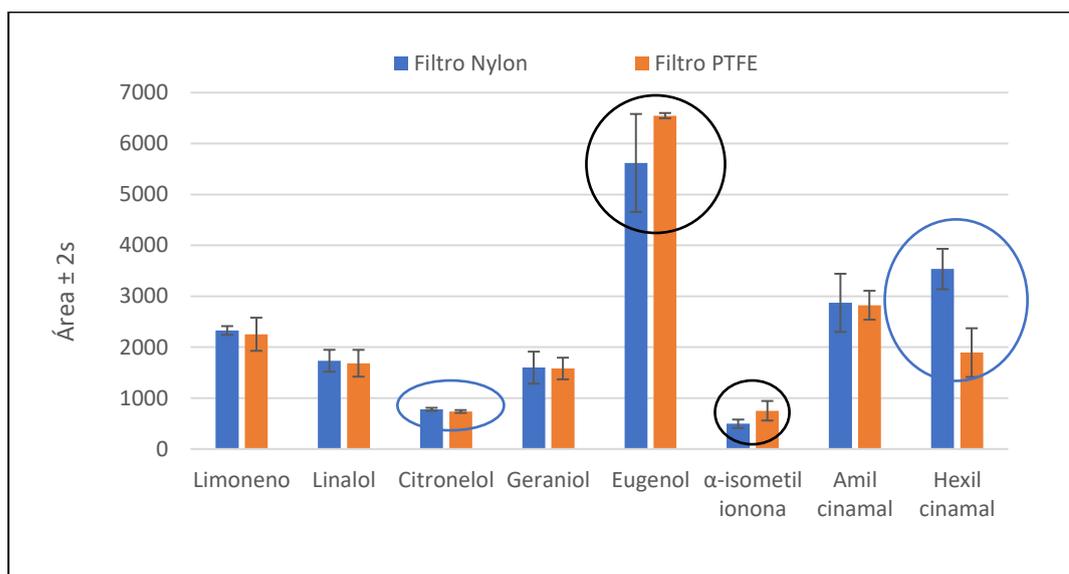


Figura 8: valores medios de área de pico con los dos filtros en acetato de etilo

La Figura 8 muestra los valores medios de área para cada compuesto con ambos filtros y en acetato de etilo. Observando esta figura podemos afirmar que los compuestos citronelol y hexil cinamal presentan diferencias significativas y se obtienen mejores resultados con el filtro de Nylon. Sin embargo, para alfa-isometil ionona y eugenol se obtienen diferencias significativa entre ambos filtros, pero presenta mejores señales con el filtro PTFE.

Debido a que la diferencia entre los valores medios de área de pico para los dos filtros es más significativa en el caso del hexil cinamal, se decidió establecer como filtro óptimo el de Nylon 0,20  $\mu\text{m}$  ya que daba mejores resultados para este compuesto.

#### 4.1.2. Condiciones de separación cromatográfica

En nuestro trabajo la extracción de las fragancias alergénicas se realiza mediante una dilución de las muestras en acetato de etilo. Incluso en el extracto diluido puede haber numerosos componentes que pueden coeluir y dificultar la cuantificación de los componentes estudiados dando lugar a errores.

En los experimentos iniciales se probó una temperatura de inyección a 275°C, la línea de transferencia se mantuvo a 275°C. El gradiente de temperatura del horno de la cromatografía se programó desde 50 °C (mantenida 0,1 min) hasta 100 °C aumentando 25 °C/min y una rampa final a 250 °C (mantenida 4,9 min) incrementando 30 °C/min. Para la inyección se usó el modo sin división (mantenido 0,02 min) después de eso, el flujo de la válvula de división se fijó en 60 ml/min.

A continuación, en la Figura 9, se muestra la representación de la rampa de temperatura dentro del horno cromatográfico durante la separación con las condiciones iniciales.

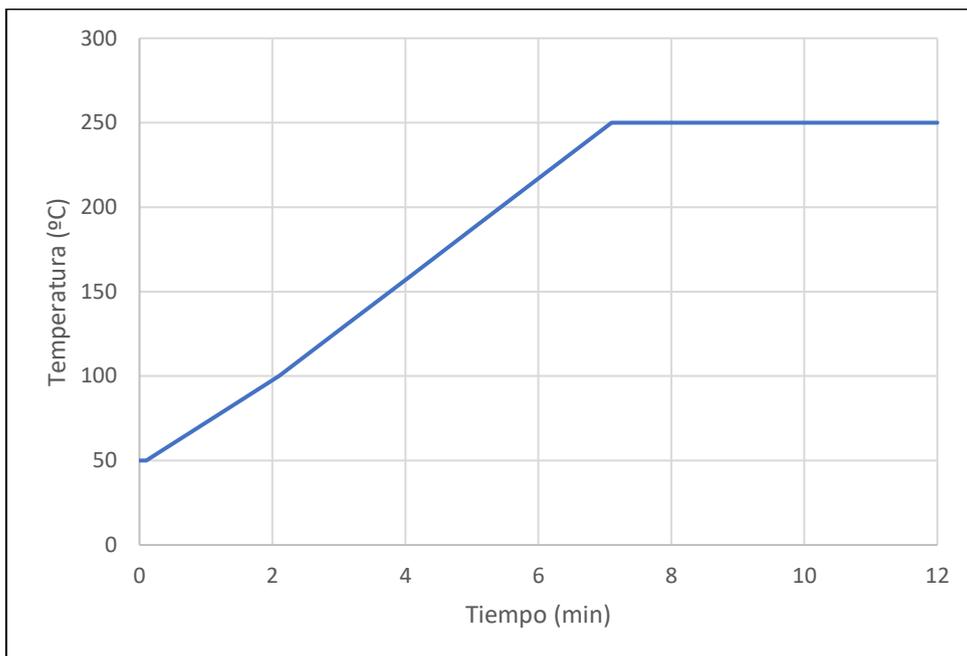


Figura 9: Gradiente de temperatura del horno cromatográfico en las condiciones iniciales.

En primer lugar, se variaron los valores del gradiente de temperatura de tal forma que se probó a disminuir la temperatura inicial de 50°C a 45°C sin mejoras en los resultados. También se introdujo otra rampa entre los 50°C y los 100°C, en este caso sí se obtuvieron mejoras en el cromatograma. Por último, para poder separar considerablemente el pico del alcohol bencílico, ya que presentaba un gran solapamiento con el D-limoneno, se fueron variando los tiempos en los que se mantenía cada rampa de temperatura.

Finalmente se llegó a la rampa óptima para separar todas las fragancias sin solapamiento y mostrando picos gaussianos.

La rampa óptima comenzó en 50 °C (mantenida 0,1 min) hasta 75 °C, aumentando 5 °C/min ; luego hasta 100 °C subiendo a 10 °C/min y con una rampa final hasta 250 °C (mantenida 0,9 min) incrementando 30 °C /min. La representación de este gradiente de temperatura se muestra en la Figura 10:

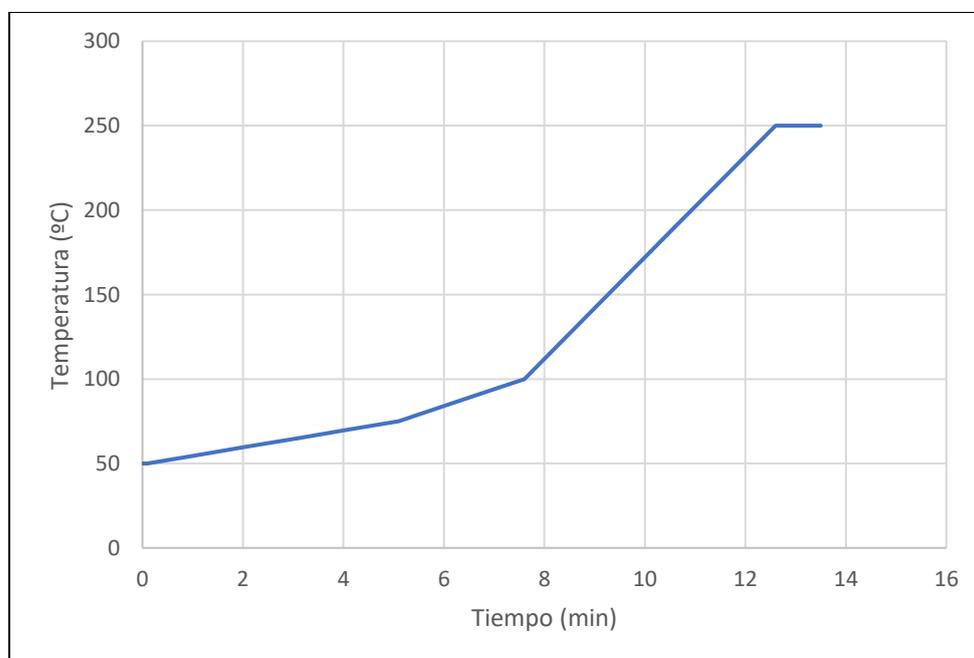


Figura 10: Gradiente de temperatura del horno cromatográfico en las condiciones óptimas.

Como se ha indicado al comienzo del apartado, la temperatura de inyección inicial estaba fijada en 275°C y posteriormente, al añadir al estudio las tres fragancias (alcohol bencílico, cumarina y salicilato de bencilo) se aumentó esta temperatura hasta 350°C. El incremento de este parámetro de inyección se debió a que el salicilato de bencilo presenta una temperatura de ebullición de 320°C y, para asegurarnos su volatilización la inyección debe ocurrir al menos 30°C por encima del punto de ebullición más alto.

En una de las pruebas modificamos el valor de la temperatura de la línea de transferencia, aumentándola de 275°C a 300°C, sin embargo, los resultados obtenidos no fueron satisfactorios, por ello la mantuvimos como temperatura óptima de este parámetro a 275°C.

Por otro lado, se probaron volúmenes de 1, 2 y 3 µl de inyección, dando mejores resultados con un volumen de 2 µl. Además, se probó a variar el tiempo de sin división entre 0,02; 0,05; 1,0 min, obteniendo los resultados óptimos en un valor de 0,05 min.

Por último, se modificó el flujo de la válvula de división aumentándolo de 60 ml/min a 250 ml/min, los resultados obtenidos fueron satisfactorios y, por tanto, este parámetro se fijó en 250 ml/min.

Cada serie de muestras se acompañaron de un control en blanco para detectar cualquier contaminación cruzada.

A continuación, se muestran dos cromatogramas obtenidos con ambas condiciones (las iniciales y las óptimas), donde se puede observar la mejoría de los picos tras haber modificado los parámetros que acabamos de comentar en este apartado.

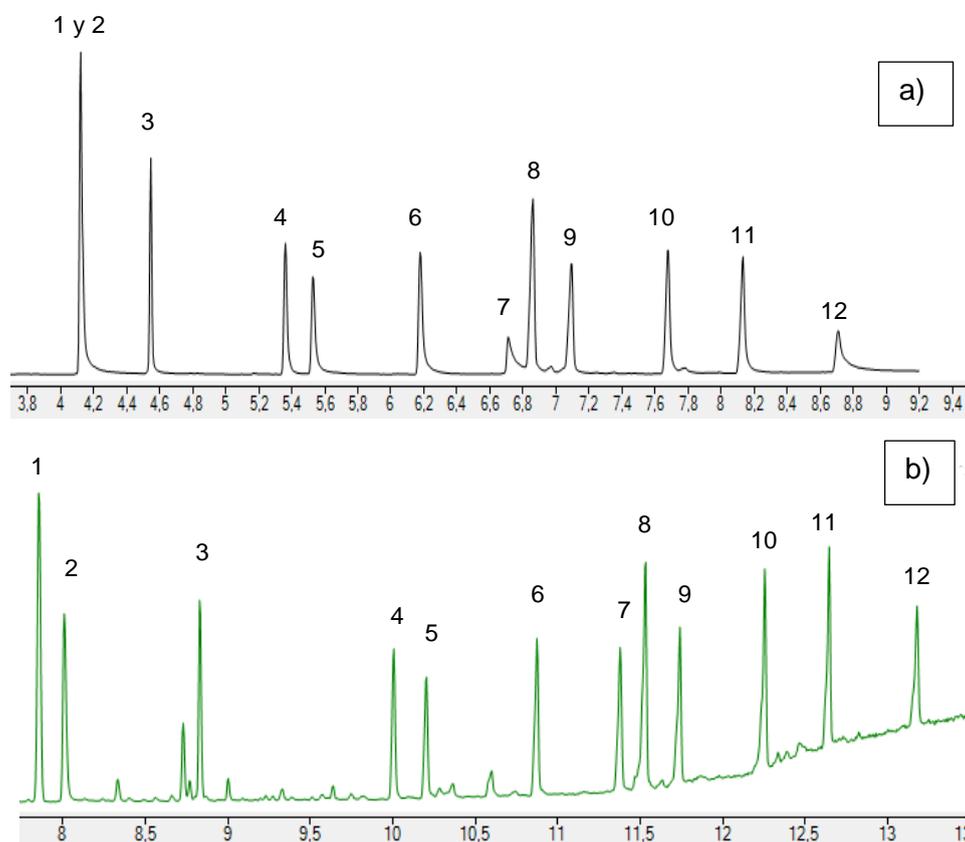


Figura 11: Cromatogramas obtenidos con diferentes condiciones, a) condiciones iniciales con una concentración de 10 µg/ml, b) condiciones finales con una concentración de 1 µg/ml. Identificación de los picos: 1) D-limoneno, 2) alcohol bencílico, 3) linalol, 4) citronelol, 5) geraniol, 6) eugenol, 7) Cumarina, 8) alfa-isometil ionona, 9) liliál, 10) amil cinamal, 11) hexil cinamal y 12) salicilato de bencilo.

Como se observa en la Figura 11, la optimización de los parámetros dio resultados satisfactorios consiguiendo picos gaussianos, simétricos, sin cola y completamente resueltos. Los compuestos 1 y 2 (D-limoneno y alcohol bencílico) se han separado considerablemente con las nuevas condiciones permitiendo su cuantificación individual.

Finalmente, se han recogido los parámetros óptimos para la separación de las fragancias alergénicas estudiadas en la siguiente tabla, salvo la rampa de temperatura del horno cromatográfico que se ha representado anteriormente en la Figura 10.

*Tabla 6: Condiciones óptimas de la separación cromatográfica*

Temperatura de línea de transferencia	275°C
Volumen de inyección	2µl
Temperatura de inyección	350°C
Caudal de la válvula de división (después de 0,05 min sin división)	250 µl/min

#### 4.1.3. Condiciones de detección MS

Durante este trabajo la detección de las fragancias alergénicas presentes en las muestras se ha llevado a cabo mediante el uso de un detector de espectrometría de masas acoplado al cromatógrafo de gases. Al igual que en el caso de la cromatografía, la detección también precisa de una optimización para asegurar la sensibilidad y selectividad de la detección de los compuestos estudiados.

La fuente de ionización empleada es una ionización electrónica (EI) mantenida a 1126 eV, es decir, consiste en la interacción de los electrones excitados con las moléculas en fase gaseosa para producir iones. Esta fuente de ionización se considera dura (alta fragmentación) ya que emplea electrones altamente excitados, además, es la primera que se desarrolló y de las más empleadas actualmente. En el modo escaneo el rango de masas va desde 50 m/z hasta 250 m/z con una frecuencia de escaneo de 3,6 s<sup>-1</sup>.

Como se ha comentado antes, para la detección en modo SIM es necesario establecer un ion de cuantificación para cada compuesto, y de manera opcional se puede añadir otro fragmento para asegurar la identificación. Este último sirve como identificador del compuesto analizado y se han elegido los iones moleculares, mientras que, para la cuantificación se han seleccionado aquellos fragmentos más intensos y de mayor masa/carga de cada uno de los compuestos. Sin embargo y siendo una excepción, para el eugenol se ha seleccionado su ion molecular como cuantificador y el fragmento más abundante como cualificador tal y como se explicará más adelante.

Para cada compuesto se obtiene un espectro de masas (m/z) diferente, ya que depende de la fragmentación de la molécula. Para comprobar que el espectro obtenido es el que corresponde a la fragancia estudiada, este se compara con una librería espectral que en nuestro caso es la biblioteca NIST.

Todos los iones y fragmentos seleccionados en función del compuesto se han recogido en la Tabla 4 del apartado 2.2.

Por tanto, para las doce fragancias alergénicas que estudiamos en este trabajo tenemos también doce comparaciones con la librería espectral, y estas se muestran a continuación en orden del tiempo de retención. Además, se han indicado con un círculo rojo el ion de identificación (cualificador) y con un círculo verde el fragmento de cuantificación.

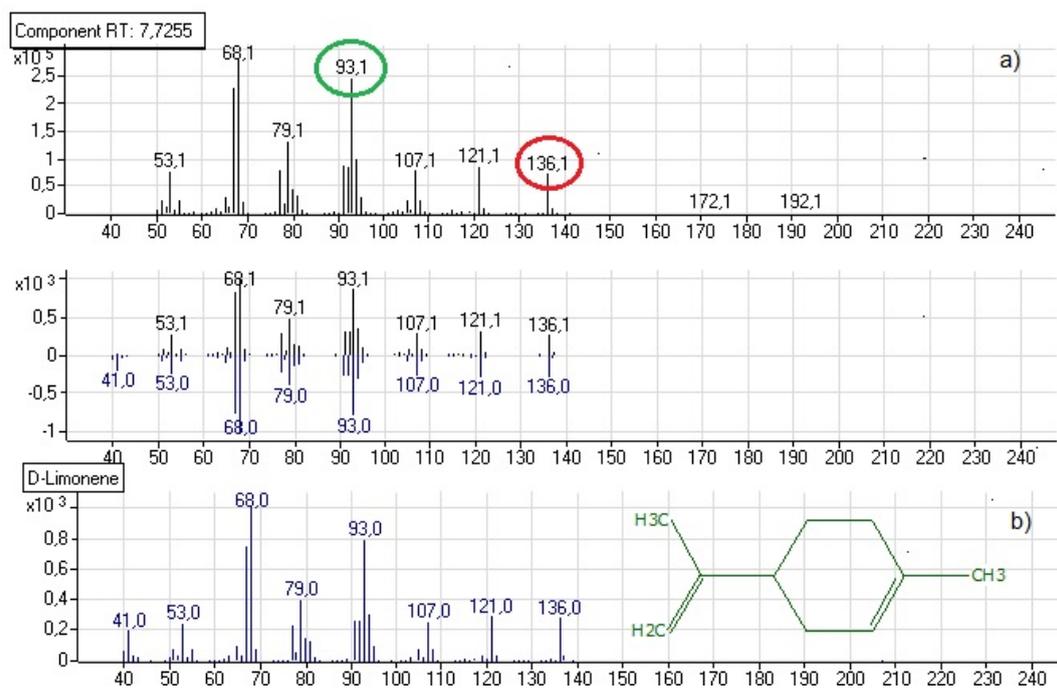


Figura 12: Espectros de masa del D-limoneno, a) espectro experimental al tiempo de retención 7,73 minutos, b) espectro de la librería NIST.

En la Figura 12, se muestra en la parte superior el espectro del D-limoneno obtenido tras inyectar en el cromatógrafo de gases una disolución patrón individual de D-limoneno (pico cromatográfico a un tiempo de retención de 7,73 minutos), en la parte inferior el espectro corresponde al D-Limoneno de la librería NIST, y en el centro la comparación de ambos. En este caso obtuvimos un 99,65% de coincidencia.

Como hemos indicado antes, el ion de cuantificación seleccionado se eligió por su abundancia en el espectro de masas (m/z). Para el D-limoneno se seleccionó el ion m/z 93, ya que como se muestra en la Figura 12 es el más abundante junto al m/z 68. La intensidad de ambos iones es similar, pero se escogió el de mayor m/z para evitar que coincidiera con iones de otros componentes que coeluyan con él procedentes del fondo o de la matriz.

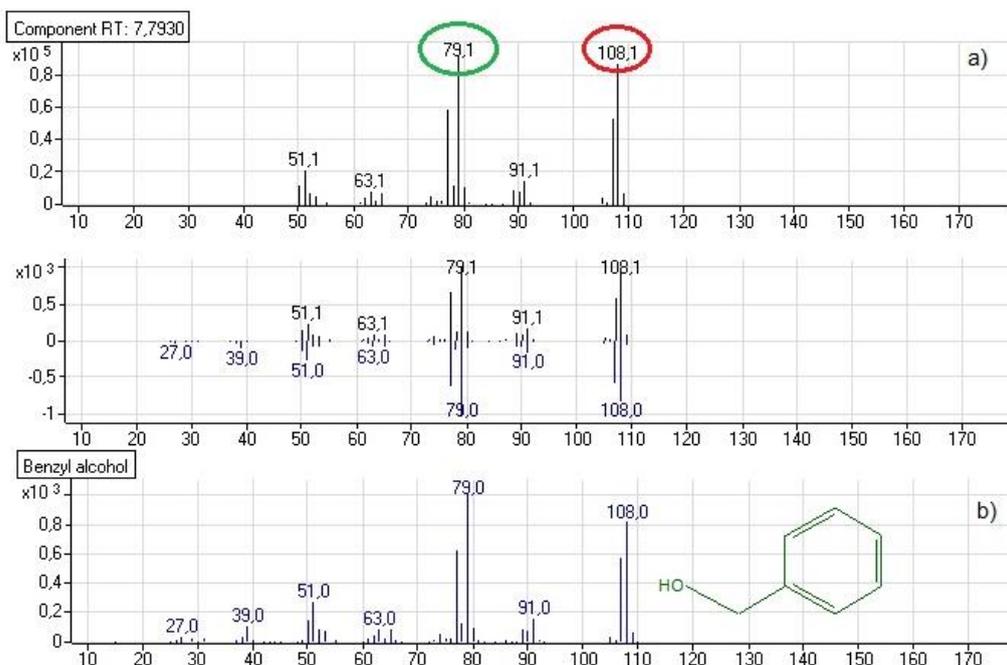


Figura 13: Espectros de masa del alcohol bencílico, a) espectro experimental al tiempo de retención 7,93 minutos (alcohol bencílico), b) espectro obtenido de la librería NIST.

En la Figura 13, se representa en la parte superior el espectro del alcohol bencílico obtenido tras inyectar en el cromatógrafo de gases una disolución patrón individual del alcohol bencílico (pico cromatográfico a un tiempo de retención de 7,93 minutos), en la parte inferior el espectro corresponde al alcohol bencílico de la librería NIST, y en el centro la comparación de ambos espectros. En este caso obtuvimos un 99,68% de coincidencia.

En este caso, el ion de cuantificación seleccionado se eligió por su abundancia en el espectro de masas ( $m/z$ ). Para el alcohol bencílico se seleccionó el ion  $m/z$  79, ya que como se muestra en la Figura 13 es el más abundante.

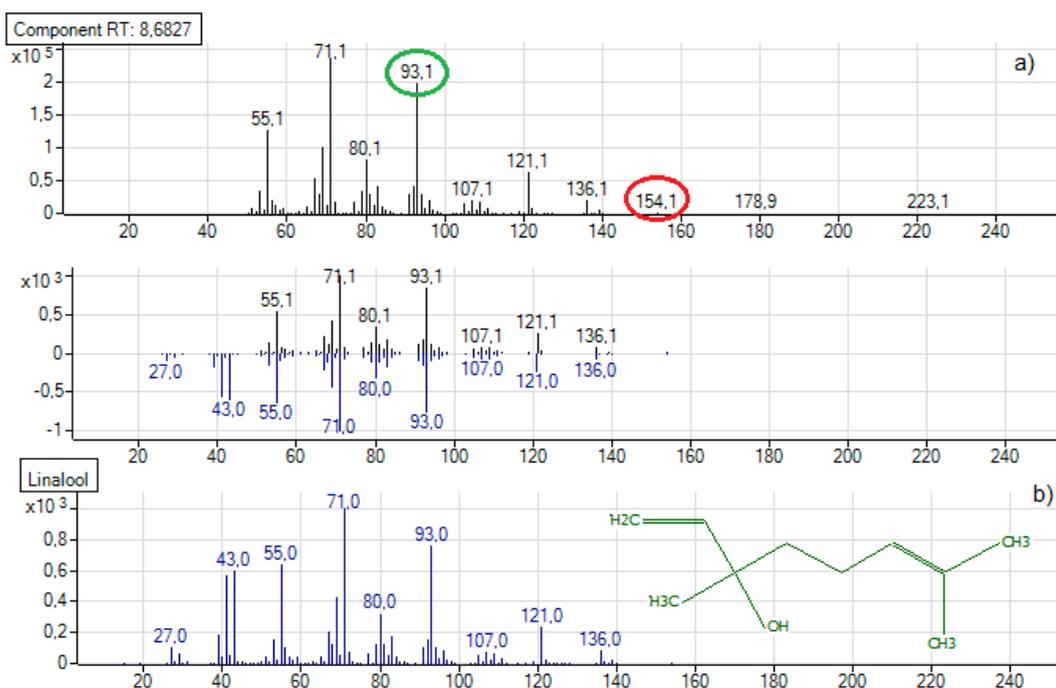


Figura 14: Espectros de masa del linalol, a) espectro experimental al tiempo de retención 8,68 minutos (linalol), b) espectro obtenido de la librería NIST.

En este caso, la Figura 14 representa en la parte superior el espectro de masas ( $m/z$ ) correspondiente al linalol obtenido tras inyectar en el cromatógrafo de gases una disolución patrón individual del linalol (pico cromatográfico a un tiempo de retención de 8,68 minutos), en la parte inferior se encuentra el espectro del linalol de la librería espectral NIST, y en el centro la comparación de ambos. En este caso se obtuvo una coincidencia de 99,66%.

Como hemos indicado en la Tabla 4, el ion de cuantificación seleccionado es el  $m/z$  93, para este compuesto no es el más abundante porque se realizaron pruebas mediante inyección en cromatografía y seleccionando el fragmento  $m/z$  71, pero los resultados no fueron satisfactorios.

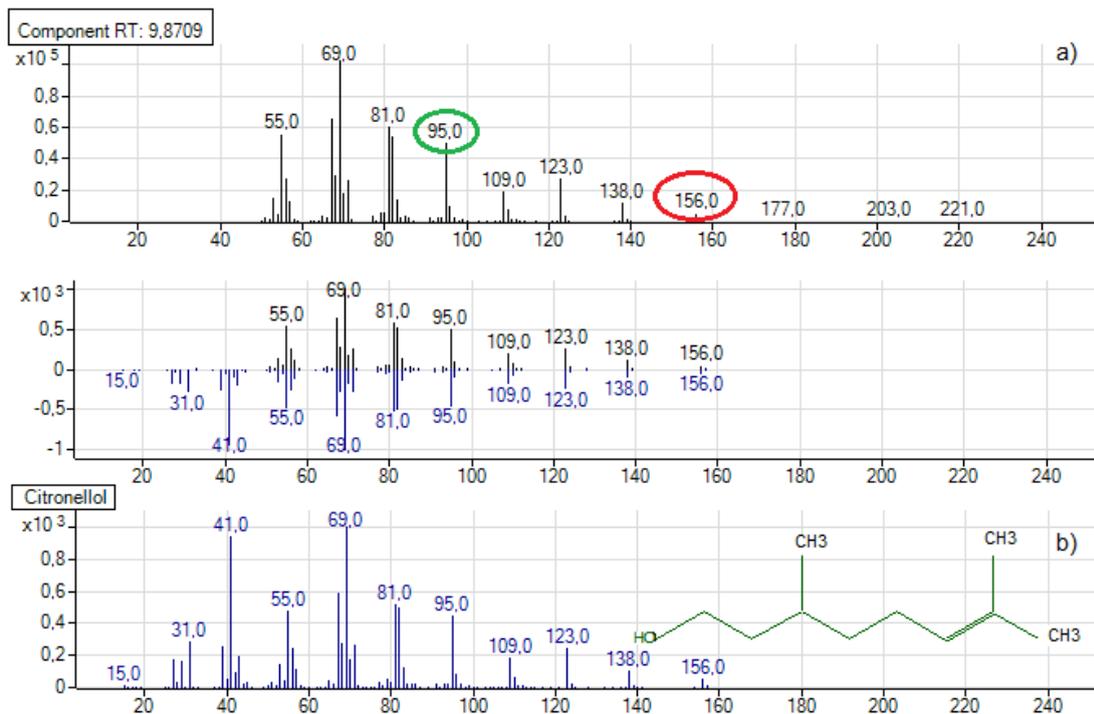


Figura 15: Espectros de masa del citronelol, a) espectro experimental al tiempo de retención 9,87 minutos (citronelol), b) espectro obtenido de la librería NIST.

En la Figura 15, se representa en la parte superior el espectro del citronelol obtenido tras inyectar en el cromatógrafo de gases una disolución patrón individual del citronelol (pico cromatográfico a un tiempo de retención de 9,87 minutos), en la parte inferior el espectro corresponde al citronelol de la librería NIST, y en el centro la comparación de ambos espectros. En este caso obtuvimos un 99,62% de coincidencia.

Como hemos indicado antes, el ion de cuantificación seleccionado se eligió por su abundancia en el espectro de masas ( $m/z$ ). Para el citronelol se seleccionó el ion  $m/z$  95, en este caso se hicieron pruebas con el ion  $m/z$  81, pero los resultados no fueron satisfactorios. El ion  $m/z$  69 se descartó ya que era de menor peso, aunque más abundante.

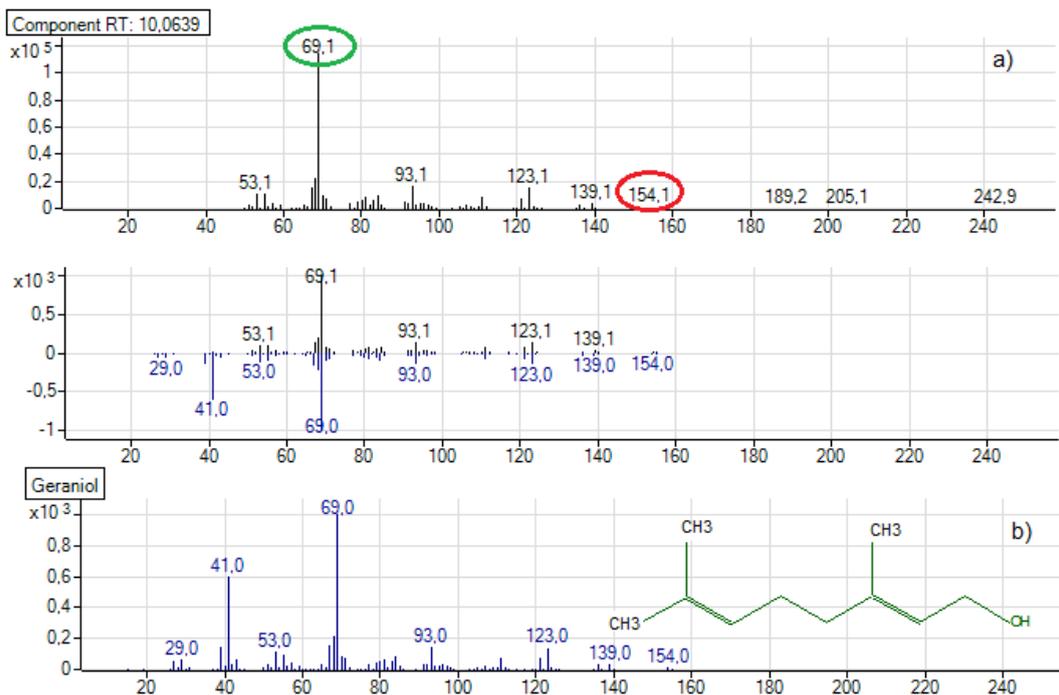


Figura 16: Espectros de masa del geraniol, a) espectro experimental al tiempo de retención 10,06 minutos (geraniol), b) espectro obtenido de la librería NIST.

En este caso, la Figura 16 representa en la parte superior el espectro de masas ( $m/z$ ) correspondiente al geraniol obtenido tras inyectar en el cromatógrafo de gases una disolución patrón individual del geraniol (pico cromatográfico a un tiempo de retención de 10,06 minutos), en la parte inferior se encuentra el espectro del geraniol de la librería espectral NIST, y en el centro la comparación de ambos. En este caso se obtuvo una coincidencia de 99,20%.

Como hemos indicado en la Tabla 4, el ion de cuantificación seleccionado para el geraniol fue el ion 69  $m/z$ , ya que como se muestra en la Figura 16 es el más abundante.

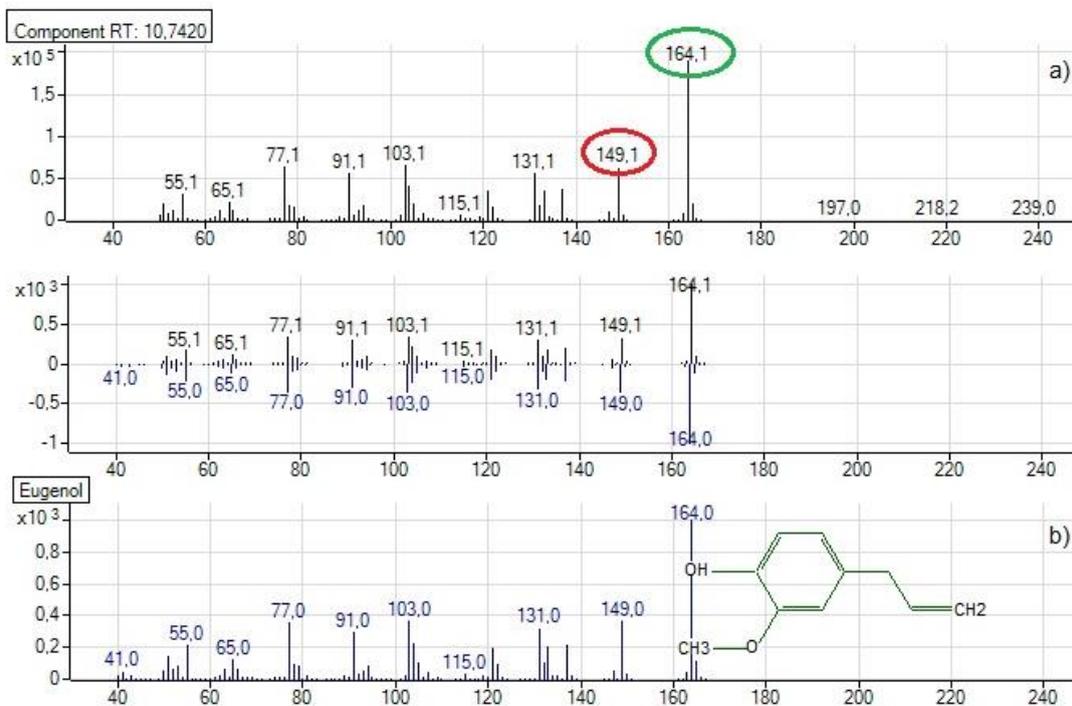


Figura 17: Espectros de masa del eugenol, a) espectro experimental al tiempo de retención 10,74 minutos (eugenol), b) espectro obtenido de la librería NIST.

En este caso, la Figura 17 muestra en la parte superior el espectro experimental de masas (m/z) del pico cromatográfico a un tiempo de retención de 10,74 minutos (eugenol), y en la inferior el espectro de la librería espectral NIST. En el centro ambos espectros se comparan, y en este caso se obtuvo un 99,63% de coincidencia.

Como se ha comentado anteriormente, en el eugenol se escogió el ion m/z 164 para la cuantificación, ya que el ion molecular (M+) es el más abundante del espectro, esto puede deberse a que la energía de ionización empleada no es suficiente para alcanzar un alto grado de fragmentación.

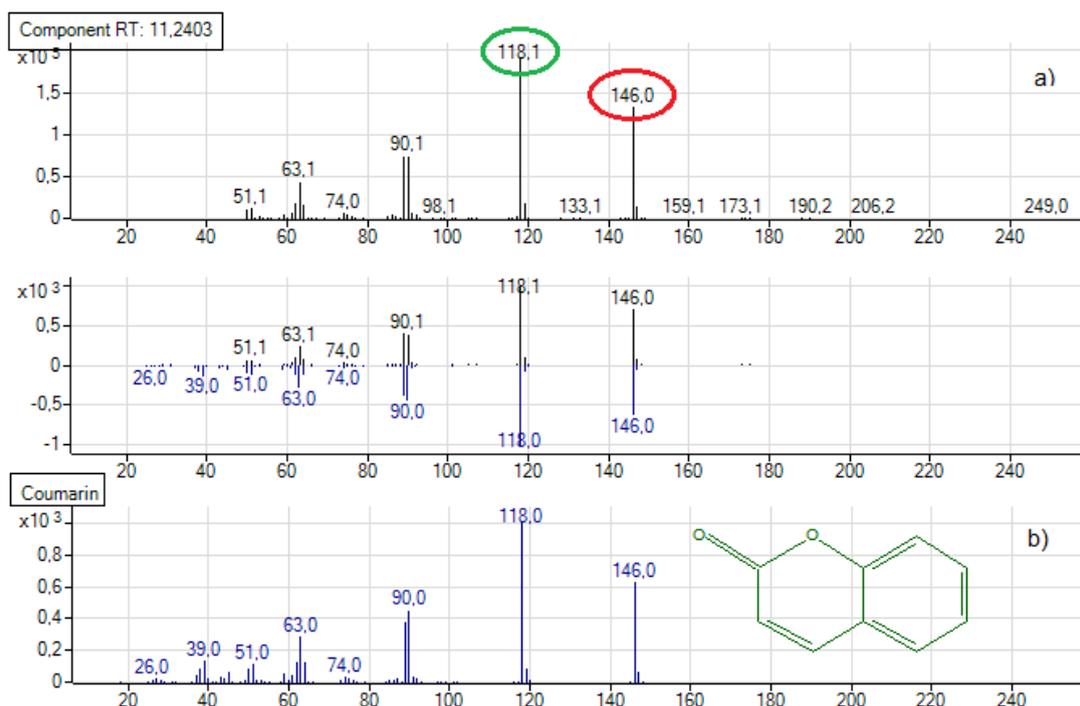


Figura 18: Espectros de masa del Coumarina, a) espectro experimental al tiempo de retención 11,24 minutos (Coumarina), b) espectro obtenido de la librería NIST.

En la Figura 18, se representa en la parte superior el espectro de la Coumarina obtenido tras inyectar en el cromatógrafo de gases una disolución patrón individual de este compuesto (pico cromatográfico a un tiempo de retención de 11,24 minutos), en la parte inferior el espectro corresponde a la Coumarina de la librería NIST, y en el centro la comparación de ambos. En este caso obtuvimos un 98,07% de coincidencia.

Para la Coumarina el ion de cuantificación seleccionado por su abundancia en el espectro de masas (m/z) fue m/z 118.

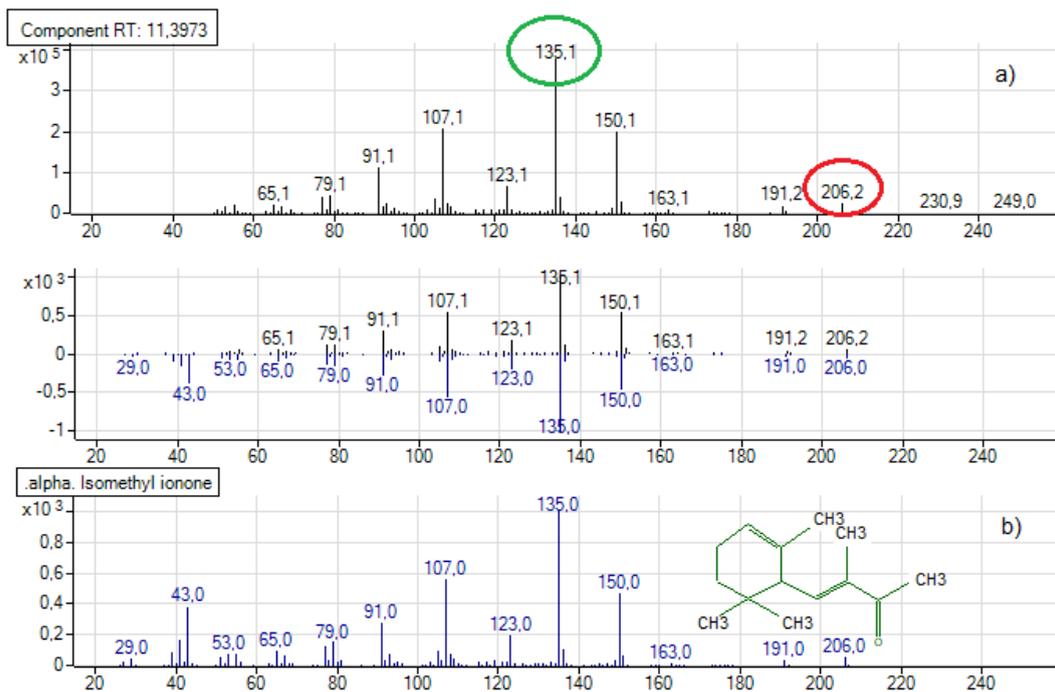


Figura 19: Espectros de masa de la fragancia alfa-isometil ionona, a) espectro experimental al tiempo de retención 11,40 minutos (alfa-isometil ionona), b) espectro obtenido de la librería NIST.

La Figura 19 muestra en la parte superior el espectro de la fragancia alfa-isometil ionona obtenido tras inyectar en el cromatógrafo de gases una disolución patrón individual de esta (pico cromatográfico a un tiempo de retención de 11,40 minutos), en la parte inferior el espectro corresponde a la fragancia alfa-isometil ionona de la librería NIST, y en el centro la comparación de ambos. En este caso obtuvimos un 97,59% de coincidencia.

El ion de cuantificación seleccionado para la alfa-isometil ionona fue el  $m/z$  135, ya que como se muestra en la Figura 19 es el más abundante.

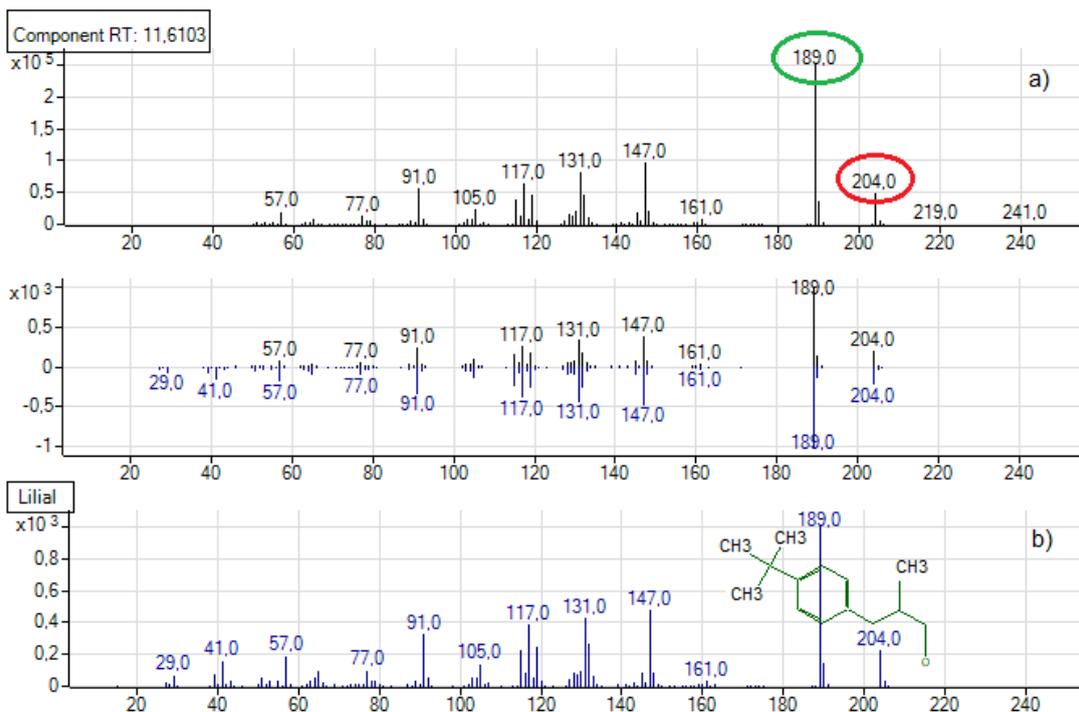


Figura 20: Espectros de masa del lilial, a) espectro experimental al tiempo de retención 11,61 minutos (lilial), b) espectro obtenido de la librería NIST.

La Figura 20 representa en la parte superior el espectro de masas ( $m/z$ ) correspondiente al lialil obtenido tras inyectar en el cromatógrafo de gases una disolución patrón individual de este compuesto (pico cromatográfico a un tiempo de retención de 11,61 minutos), en la parte inferior se encuentra el espectro del lialil extraído de la librería espectral NIST, y en el centro la comparación de ambos. En este caso se obtuvo una coincidencia de 98,30%.

Como hemos comentado en el resto de los compuestos, el ion de cuantificación se eligió por su abundancia en el espectro de masas ( $m/z$ ). Para el lialil se seleccionó el fragmento  $m/z$  189, ya que como se muestra en la Figura 20 es el más abundante.

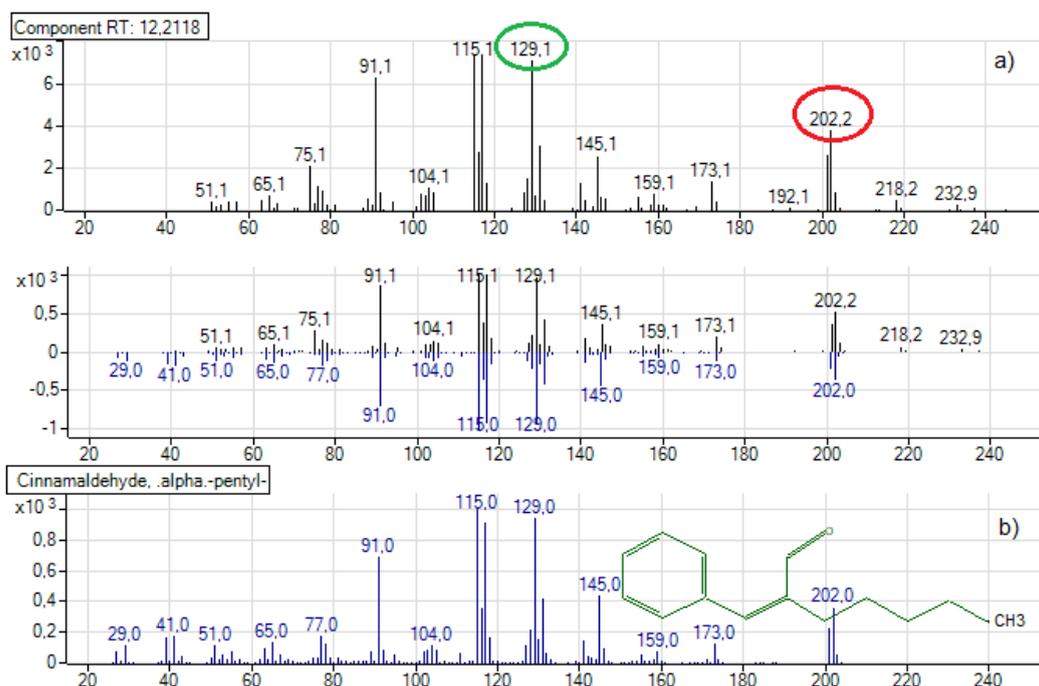


Figura 21: Espectros de masa del amil cinamal, a) espectro experimental al tiempo de retención 12,21 minutos (amil cinamal), b) espectro obtenido de la librería NIST.

La Figura 21 muestra en la parte superior el espectro del amil cinamal obtenido tras inyectar en el cromatógrafo de gases una disolución patrón individual de esta fragancia (pico cromatográfico a un tiempo de retención de 12,21 minutos), en la parte inferior el espectro corresponde al amil cinamal extraído de la librería NIST, y en el centro la comparación de ambos. En este caso obtuvimos un 92,03% de coincidencia.

Al igual que en los casos anteriores, el ion de cuantificación se eligió por su abundancia en el espectro de masas ( $m/z$ ). Para el amil cinamal se seleccionó el fragmento  $m/z$  129, aunque presenta otros iones con misma abundancia, se optó por el indicado con círculo rojo porque era el de mayor valor de  $m/z$ .

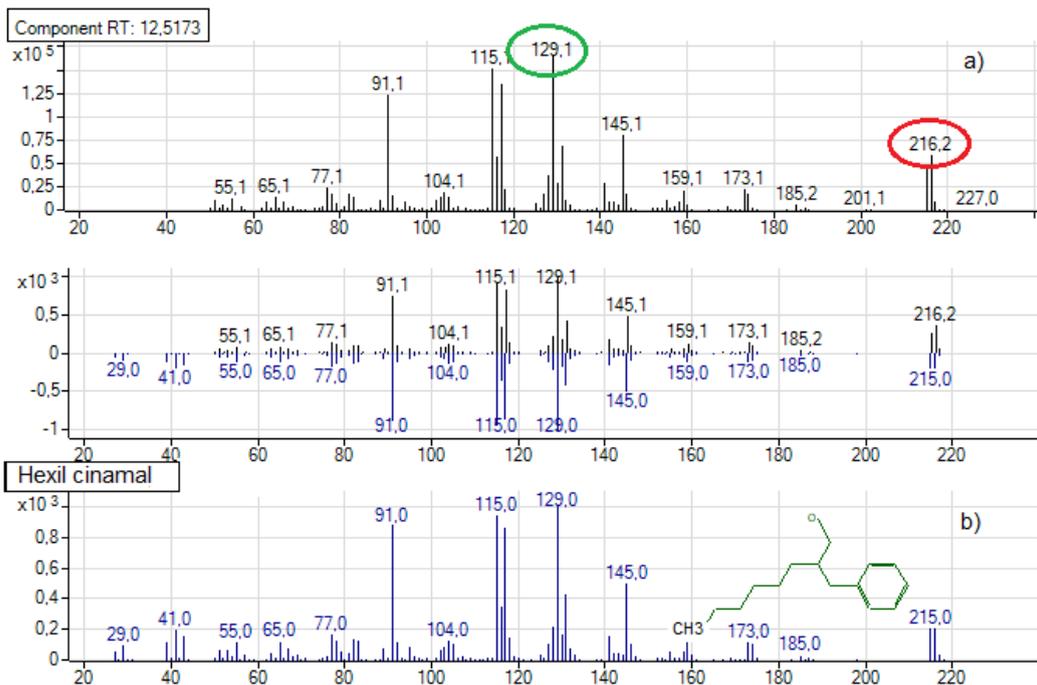


Figura 22: Espectros de masa del hexil cinamal, a) especto experimental al tiempo de retención 12,52 minutos (hexil cinamal), b) espectro obtenido de la librería NIST.

De la misma manera que el resto de los compuestos la Figura 22 muestra en la parte superior el espectro del hexil cinamal obtenido tras inyectar en el cromatógrafo de gases una disolución patrón individual del hexil cinamal (pico cromatográfico a un tiempo de retención de 12,52 minutos), en la parte inferior el espectro corresponde al hexil cinamal de la librería NIST, y en el centro la comparación de ambos. En este caso obtuvimos un 99,03% de coincidencia.

El ion de cuantificación se eligió por su abundancia en el espectro de masas ( $m/z$ ). Para el hexil cinamal se seleccionó el fragmento  $m/z$  129 por ser el más abundante.

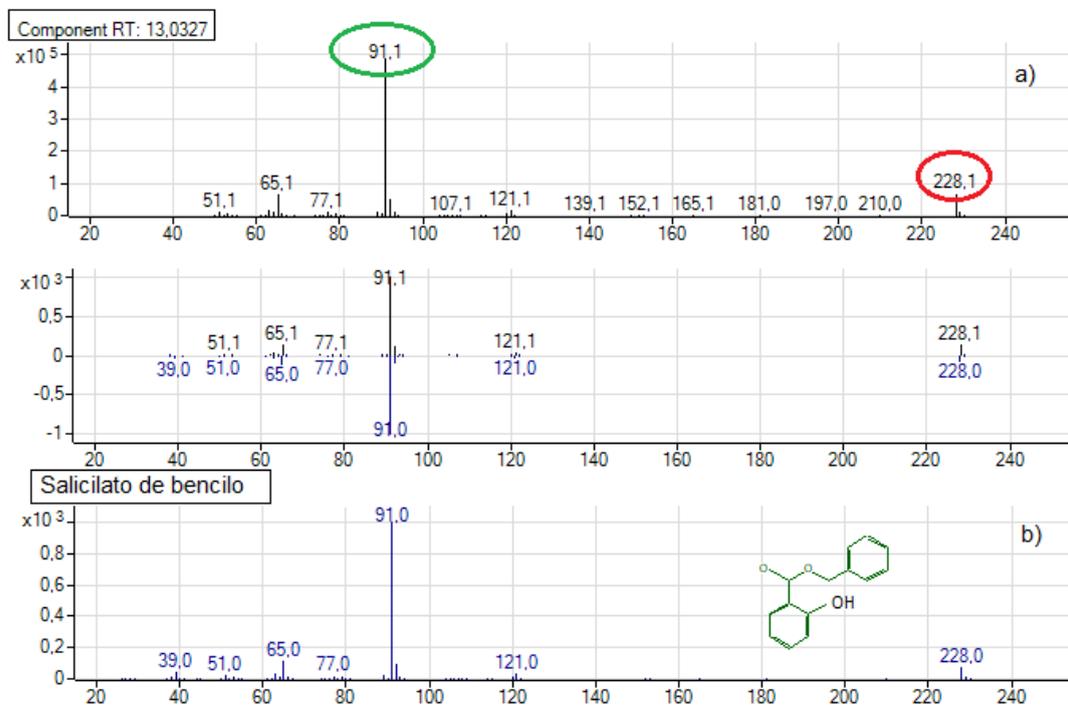


Figura 23: Espectros de masa del salicilato de bencilo, a) especto experimental al tiempo de retención 13,03 minutos (salicilato de bencilo), b) espectro obtenido de la librería NIST

Por último, la Figura 23 muestra en la parte superior el espectro del salicilato de bencilo obtenido tras inyectar en el cromatógrafo de gases una disolución patrón individual de este compuesto (pico cromatográfico a un tiempo de retención de 13,03 minutos), en la parte inferior el espectro corresponde al salicilato de bencilo de la librería NIST, y en el centro la comparación de ambos. En este caso obtuvimos un 97,99% de coincidencia.

El ion de cuantificación seleccionado se eligió por su abundancia en el espectro de masas (m/z). Para el salicilato de bencilo se seleccionó el fragmento 91 m/z por ser el más abundante.

Para concluir, los porcentajes de coincidencia entre el espectro obtenido experimentalmente y el extraído de la librería NIST para cada compuesto se han recogido en la siguiente tabla:

*Tabla 7: Coincidencia del espectro experimental y el espectro de la librería NIST para cada compuesto*

Compuesto	Coincidencia (relación entre los espectros experimentales y bibliográficos) (%)
D-limoneno	99,65
Alcohol bencílico	99,68
Linalol	99,66
Citronelol	99,62
Geraniol	99,20
Eugenol	99,63
Cumarina	98,07
Alfa-Isometil ionona	97,59
Lilial	98,30
Amil cinamal	92,03
Hexil cinamal	99,03
Salicilato de bencilo	97,99

## 4.2. Validación del método

Una vez establecidas las condiciones óptimas para la cuantificación de los compuestos estudiados, se procedió a la validación del método. Para ello se realizaron estudios de linealidad (rectas de calibrado), exactitud (recuperación), precisión (repetibilidad y precisión intermedia) y sensibilidad (límite de linealidad, detección y cuantificación).

#### 4.2.1. Linealidad

La linealidad es la capacidad que tiene el método analítico para ofrecer resultados proporcionales a la concentración del analito estudiado dentro de un rango definido. Su determinación se realiza mediante un tratamiento matemático de los resultados (señales) obtenidos en el análisis del analito en distintas concentraciones.

En nuestro trabajo se estudió la linealidad hasta una concentración de 20 µg/ml, observando que el comportamiento lineal se limitaba en una concentración aproximada de 15 µg/ml para todos los analitos estudiados. Sin embargo, las calibraciones empleadas fueron a concentraciones más bajas, esto se debe a que, como se ha comentado anteriormente, las fragancias alergénicas provocan efectos secundarios negativos y por ello en los productos comerciales se emplean en bajas concentraciones. Además, siempre que sea posible se procurará trabajar con muestras diluidas para reducir las posibles interferencias de la matriz de la muestra. De tal forma que nuestra calibración se estableció en un rango que comienza en el límite de cuantificación del analito y llega hasta una concentración de 100 ng/ml.

Los parámetros de linealidad a bajas concentraciones se han recogido en la siguiente tabla en función del analito utilizado.

*Tabla 8: Parámetros de linealidad a bajas concentraciones*

Compuesto	Rango lineal (ng/ml)	$(m \pm s_m) / 10^2$ MCA/(µg·ml <sup>-1</sup> )	$(b \pm s_b)$ MCA	R
D-limoneno	0,5-100	249 ± 6	43 ± 33	0,9990
Alcohol bencílico	0,5-100	228 ± 3	42 ± 15	0,9995
Linalol	0,5-100	105 ± 4	-20 ± 20	0,994
Citronelol	2-100	54 ± 1	-8 ± 8	0,996
Geraniol	5-100	169 ± 5	-30 ± 29	0,998
Eugenol	3-100	147 ± 3	-5 ± 17	0,998
Cumarina	3-100	308 ± 5	23 ± 35	0,998
Alfa-Isometil ionona	10-100	349 ± 10	14 ± 25	0,996
Lilial	3-100	237 ± 5	32 ± 25	0,998
Amil cinamal	3-100	131 ± 3	11 ± 14	0,998
Hexil cinamal	5-100	120 ± 3	15 ± 17	0,996
Salicilato de bencilo	6-100	425 ± 11	17 ± 60	0,997

m: pendiente de la regresión lineal,  $s_m$ : desviación estándar de la pendiente, b: ordenada en el origen de la regresión lineal,  $s_b$ : desviación estándar de la ordenada en el origen, MCA: mil unidades de área, R: Coeficiente de regresión lineal.

Cada regresión lineal está acompañada de la correspondiente representación gráfica, a continuación, se adjunta un ejemplo que pertenece al calibrado del alcohol bencílico (Figura 24).

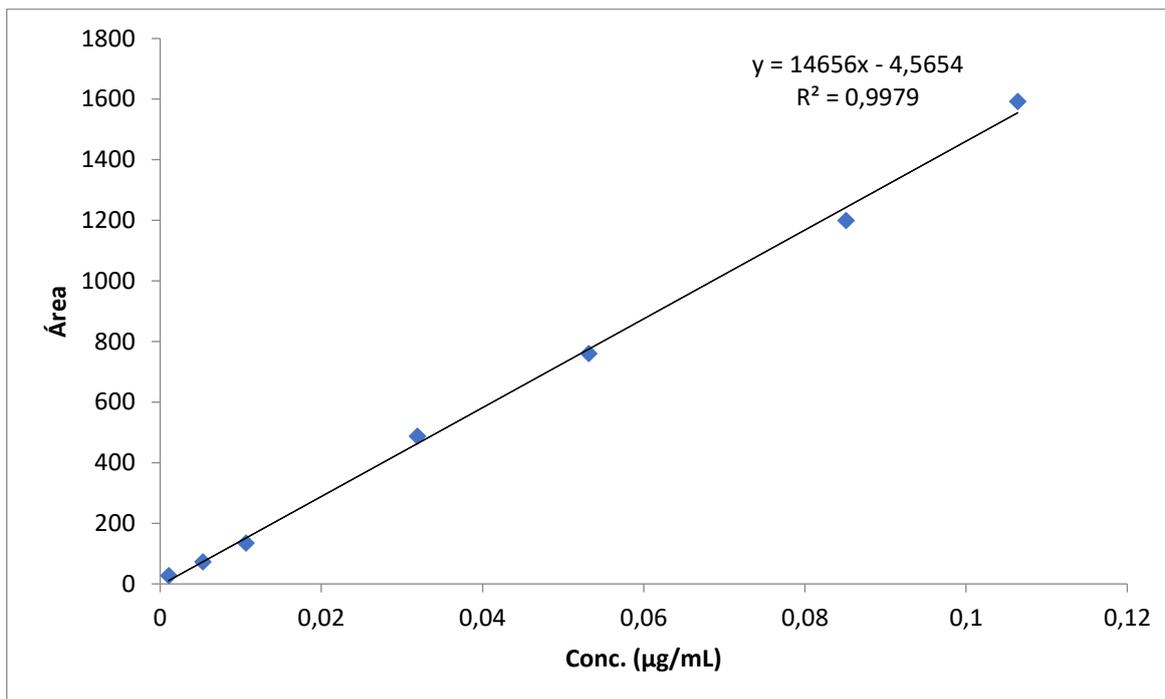


Figura 24: Calibrado de bajas concentraciones del eugenol.

La linealidad determina la región de la curva de cuantificación en la que la relación entre la señal instrumental con la concentración del analito es directa, un método es lineal cuando el coeficiente de regresión lineal R es mayor de 0,99 y los residuales se distribuyen aleatoriamente por encima y por debajo del cero sin mostrar tendencia. En nuestro método, como se indica en la Tabla 8, todos los valores de este coeficiente superan el 0,99 y, por tanto, podemos afirmar que el método analítico desarrollado es lineal.

Además, en la Tabla 8, se puede apreciar que las pendiente de la rectas son altas lo que indica también una buena sensibilidad del método, esto significa que el método es capaz de distinguir (con un intervalo de confianza) dos concentraciones que se encuentran próximas entre sí.

#### 4.2.2. Sensibilidad

Para establecer la sensibilidad del método se determinaron los límites de detección y de cuantificación. El límite de detección (LOD) es la cantidad más pequeña que puede ser detectada. En los casos donde el LOD se determina mediante la recta de calibrado se define como la concentración de analito que produce una respuesta significativamente distinta del blanco ( $s_b$ ). De tal forma que la ecuación empleada sería la siguiente:

$$\text{LOD} = 3,3 \cdot s_b / m$$

Donde m es la pendiente de regresión lineal,  $s_b$  la desviación estándar de la ordenada en el origen y el valor 3,3 es el factor propuesto por la IUPAC para que el error  $\beta$  sea menor del 5%.

Por otro lado, el límite de cuantificación (LOQ) es la concentración más pequeña de analítico que puede ser determinada con un nivel de incertidumbre aceptable. De igual forma que en el LOD, al utilizar una recta de calibrado se emplea la desviación estándar de la ordenada en el origen como estimación de la desviación estándar del blanco. En este caso la ecuación viene dada de la siguiente manera:

$$\text{LOQ} = 10 \cdot s_b / m$$

Donde m es la pendiente de la regresión lineal,  $s_b$  la desviación estándar de la ordenada en el origen.

Por tanto, para la determinación de estos parámetros se emplearon rectas de calibrado en un rango de 0,001-0,008 µg/ml y se recogieron las lecturas de área. Como ejemplo se muestra en la Figura 25 la regresión lineal utilizada para la determinación de los límites del citronelol. La Tabla 9 recoge los datos obtenidos para los límites de detección y cuantificación de cada compuesto.

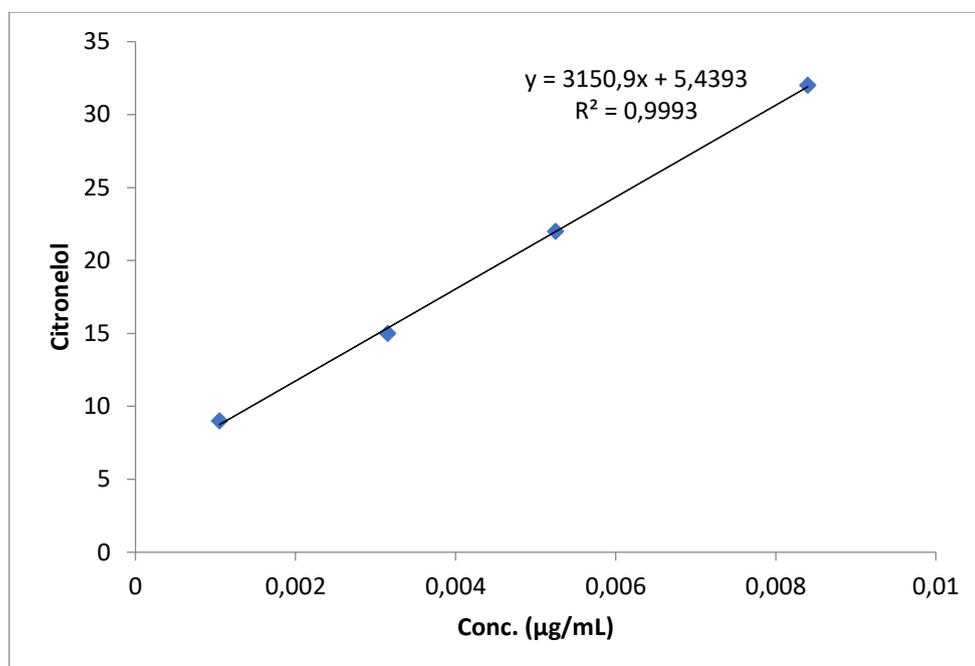


Figura 25: Recta de regresión lineal a muy bajas concentraciones empleada para la determinación de los límites de detección y cuantificación del citronelol.

Tabla 9: Límites de cuantificación y detección.

Compuesto	LOD <sup>1</sup> (ng/ml)	LOQ <sup>2</sup> (ng/ml)
D-Limoneno *	3 (0,5)	6
Alcohol bencílico *	1 (0,5)	4
Linalol *	4 (0,5)	20
Citronelol	1	2
Geraniol	2	5
Eugenol	1	3
Cumarina	0,9	3
Alfa-Isometil ionona	2	10
Lilial	1	3
Amil cinamal	1	3
Hexil cinamal	2	5
Salicilato de bencilo	2	6

<sup>1</sup>LOD= 3,3\*s<sub>b</sub>/m

<sup>2</sup>LOQ= 10\*s<sub>b</sub>/m

Los límites obtenidos son muy bajos y, por tanto, podemos afirmar que nuestro método es muy sensible.

Para tres compuestos marcados con asterisco (\*) se obtuvieron valores de LOD más altos de lo que realmente se podía medir. Por eso se comprobaron inyectando disoluciones más diluidas. Los valores entre paréntesis corresponden a los LOD estimados para una relación señal/ruido (S/R) en torno a 3

Para los compuestos D-limoneno, linalol y alcohol bencílico se realizó un análisis a 0,5 y 0,2 ng/ml, ya que el límite de detección calculado con las ecuaciones anteriores era más alto que el observado en los cromatogramas obtenidos. Estos valores (0,2 ng/ml y 0,5 ng/ml) se eligieron porque el pico cromatográfico de cada uno de ellos era aproximadamente 5 veces la señal-ruido en una concentración de 1 ng/ml.

A continuación, se muestran dos cromatogramas del D-limoneno donde la Figura 26 es el correspondiente a 1 ng/ml y la Figura 27 es el obtenido a una concentración de 0,5 ng/ml.

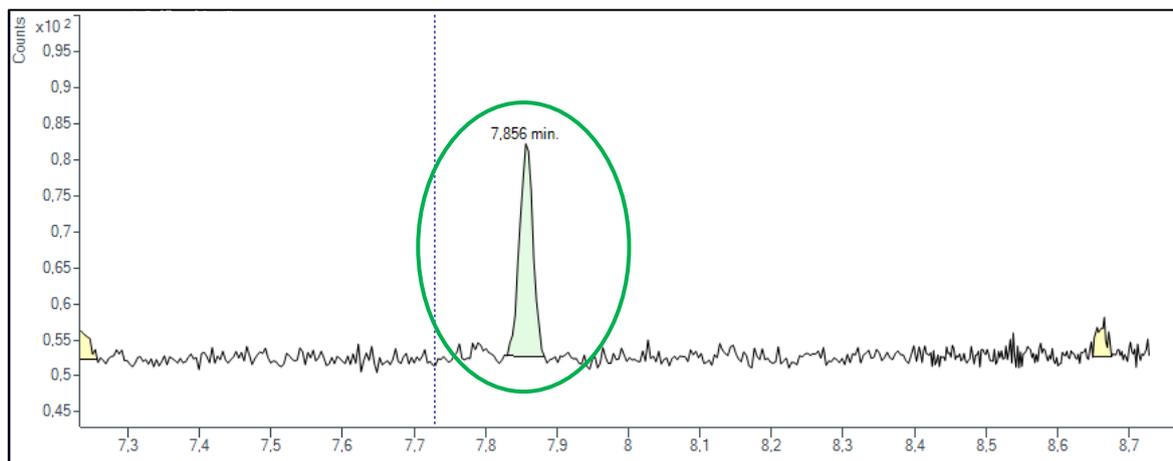


Figura 26: Cromatograma experimental obtenido por inyección en GC-MS del D-limoneno a una concentración de 1 ng/ml

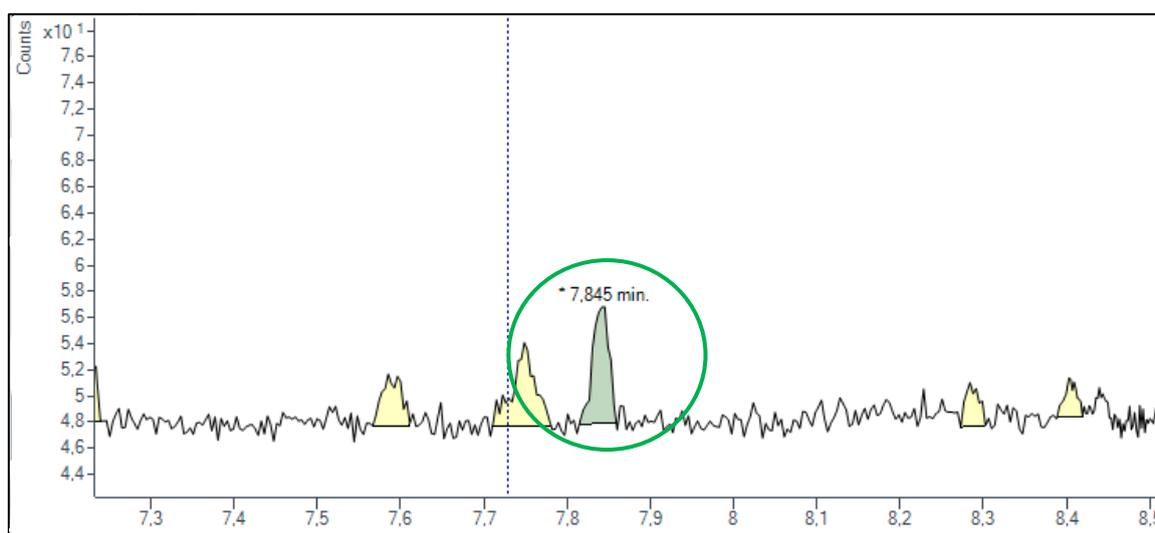


Figura 27: Cromatograma experimental obtenido por inyección en GC-MS del D-limoneno a una concentración de 0,5 ng/ml

Como se puede observar al comparar las Figuras 26 y 27, en una concentración de 1 ng/ml el pico del D-limoneno (marcado con un círculo verde) es aproximadamente 5 o 6 veces la señal del ruido. Por esta razón se decidió probar con 0,2 ng/ml y la mitad de la concentración, en los tres casos (D-limoneno, linalol y alcohol bencílico) se observó que el pico cromatográfico a una concentración de 0,5 ng/ml era aproximadamente  $\geq 3$  veces la señal del blanco. El límite de detección se define como 3 veces la relación señal/ruido como se indica en las ecuaciones anteriores, y, por tanto, establecemos el LOD de estos tres compuestos en 0,5 ng/ml.

### 4.2.3. Precisión

La precisión del método proporciona la variación o dispersión producida por los errores aleatorios a lo largo del análisis. Se inyectaron once réplicas de una disolución patrón a una concentración determinada a tres niveles de 0,01 µg/ml a 0,05 µg/ml y 0,1 µg/ml en el mismo análisis para calcular la repetibilidad como la desviación estándar relativa porcentual.

La desviación estándar relativa (DER) es un cálculo estadístico que indica la dispersión de un conjunto de datos respecto a su media. Este parámetro se determina dividiendo la desviación estándar de los datos entre su promedio. Por tanto, se recogieron las señales analíticas de las once réplicas y se trataron para obtener su media, y su desviación estándar. La desviación estándar relativa se calculó con la siguiente ecuación:

$$DER(\%) = \frac{s}{\bar{X}} \cdot 100$$

Donde  $s$  es la desviación estándar y  $\bar{X}$  el promedio de las señales. Este estudio se determinó la precisión para tres niveles, alto, medio y bajo, donde se variaron la concentración de los analitos de 0,01 µg/ml a 0,05 µg/ml y 0,1 µg/ml. Los resultados de la desviación estándar relativa se han recogido en la Tabla 10 en función del compuesto y de la concentración.

Tabla 10: Desviación estándar relativa a 3 niveles.

DER (%) <sup>1</sup>			
Compuesto	0,01 µg/ml	0,05 µg/ml	0,1 µg/ml
D-Limoneno	10,3	1,9	3,9
Alcohol bencílico	7,3	3,7	5,2
Linalol	6,8	2,3	4,4
Citronelol	6,3	2,0	5,8
Geraniol	7,6	3,5	6,8
Eugenol	7,0	3,0	8,0
Cumarina	4,9	3,7	8,3
Alfa-Isometil ionona	8,3	2,6	5,7
Lilial	5,5	3,2	7,2
Amil cinamal	5,7	4,7	8,7
Hexil cinamal	7,6	5,9	4,6
Salicilato de bencilo	9,3	6,1	5,7

<sup>1</sup>DER; desviación estándar relativa (%) =  $\frac{s}{\bar{X}} \cdot 100$ ; N=11

Los resultados obtenidos son satisfactorios ya que son inferiores al 10% en casi todos los casos y, por tanto, podemos decir que el método es repetible para las doce fragancias alergénicas estudiadas.

Por otro lado, la precisión del método se puede determinar mediante la técnica de análisis de varianza (ANOVA), consiste en valorar si la media de los datos obtenidos cada día es igual o al menos una de ellas presenta diferencias significativas.

En el estudio de ANOVA se inyectaron 5 réplicas de una misma concentración de analito (0,05 µg/ml) durante 3 días. Mediante esta técnica se llevó a cabo la determinación de la precisión intermedia y la repetibilidad, donde la primera es la correspondiente al tratamiento de datos inter-días, es decir, en diferentes días, mientras que la segunda consiste en la dispersión de los resultados por procesos analíticos independientes, pero empleando el mismo método a alícuotas de una misma muestra y dentro de un mismo día (intra-días).

Los cálculos consisten en obtener las desviaciones estándar relativas porcentuales a partir de las varianzas intra-días ( $CM_{intra}$ ) e inter-días ( $CM_{inter}$ ) y el promedio de todos los datos. Para el cálculo de estos parámetros se emplean las siguientes ecuaciones:

$$\text{Repetibilidad}(\%) = \frac{\sqrt{CM_{intra}}}{\bar{X}} * 100$$

$$\text{Precisión intermedia}(\%) = \frac{\sqrt{CM_{inter}}}{\bar{X}} * 100$$

Donde  $CM_{intra}$  es la varianza intra-días,  $CM_{inter}$  corresponde a la varianza inter-días y  $\bar{X}$  es el promedio de los datos.

Tras analizar los datos se recogieron en la Tabla 11 los valores de la repetibilidad porcentual y la precisión intermedia porcentual.

Tabla 11: Parámetros de precisión mediante estudio ANOVA

ANOVA		
Compuesto	Precisión intermedia <sup>1</sup> (%)	Repetibilidad <sup>2</sup> (%)
Limoneno	6,3	2,3
Alcohol bencílico	8,6	3,3
Linalol	4,5	7,6
Citronelol	15	6,4
Geraniol	8,8	6,7
Eugenol	11	5,4
Cumarina	6,3	4,1
Alfa-Isometil ionona	0,4	4,8
Lilial	9,0	1,7
Amil cinamal	11	1,6
Hexil cinamal	13	5,7
Salicilato de bencilo	9,2	3,1

<sup>1</sup>Precisión intermedia( $\%$ )= $\frac{\sqrt{CM_{inter}}}{\bar{X}}$  \* 100; 5 réplicas x 3 días

<sup>2</sup>Repetibilidad( $\%$ )= $\frac{\sqrt{CM_{intra}}}{\bar{X}}$  \* 100; 5 réplicas x 3 días

Observando los resultados de la Tabla 11, podemos decir que el método desarrollado es preciso.

#### 4.2.4. Estudio del efecto matriz

En los análisis que implican muestras reales analizadas mediante cromatografía de gases es común encontrar variaciones en la respuestas, la cuales son inducidas por componentes de la matriz de la muestra analizada.

Una de las formas para evaluar para el efecto matriz consiste en obtener una recta de calibrado en presencia y ausencia de muestra. En nuestro caso realizamos una recta de calibrado en acetato de etilo y adiciones de las mismas concentraciones a muestras reales disueltas en acetato de etilo. Las muestras se analizaron con el método analítico desarrollado por lo que se pesaron 0,1 g de muestra y se llevaron a matraces de 100 ml, debido a que el calibrado es en bajas concentraciones se modificó la dilución para disminuir las señales de las fragancias presentes en las muestras.

En matraces aforados de 10,0 ml se adicionaron volúmenes de patrón correspondientes a las concentraciones de la recta y se añadió acetato de etilo hasta que la suma del volumen de patrón y disolvente fuera 250 µl, esto se realizó para asegurar que en todos los puntos de la recta hubiera la misma cantidad de matriz. Los matraces de 10,0 ml se enrasaron con las muestras diluidas, se filtraron con filtro de Nylon 0,20 µm y se inyectaron en el cromatógrafo de gases.

Para cada compuesto se trataron los resultados cromatográficos y se obtuvieron cinco rectas de calibrado, una correspondiente a la recta sin matriz y cuatro rectas procedentes de las muestras. A continuación, se muestra la Tabla 12 que recoge los intervalos de confianza al 95% de la pendiente de las rectas para cada analito y muestra.

Tabla 12: Efecto matriz para cuatro muestras

Intervalo de confianza (95%) de la pendiente <sup>1</sup> /10 <sup>3</sup>					
Compuesto	Sin matriz	Suavizante	Desinfectante de manos	Limpiador facial	Champú
D-Limoneno	22,1 – 25,1	22,4-25,6	19,2-27,0	21,8-24,2	17,3-30,3
Alcohol bencílico	23,7 – 27,2	25,1-26,7	22,1-27,8	25,1-29,7	n.a <sup>1</sup>
Linalol	13,9 – 16,5	2,80-15,0	10,7-14,8	12,3-14,5	1,80-24,2
Citronelol	5,5 – 6,64	1,58-5,80	4,67-6,16	4,77-5,86	2,30-8,89
Geraniol	20,3 – 25,0	16,1-23,5	17,5-23,3	19,4-22,4	18,6-26,4
Eugenol	14,6 – 18,1	13,0-16-5	13,7-17,4	15,0-18,7	14,3-20,4
Cumarina	28,9 – 32,5	5,81-22,3	20,1-25,0	21,6-27-6	20,6-28,8
Alfa-Isometil ionona	28,0 – 34,1	19,7-33,4	20,5-28,2	20,0-30,1	19,4-31,6
Lilial	23,6 – 27,3	18,1-19,4	14,6-19,5	15,8-20,3	17,4-22,6
Amil cinamal	11,7 – 13,7	9,08-9,80	5,55-11,1	8,49-11,21	8,06-17,0
Hexil cinamal	10,3 – 14,4	9,02-10,5	4,55-10,6	7,28-10,8	n.a
Salicilato de bencilo	40,8 – 56,1	32,3-34,1	24,9-39,7	30,5-46,5	32,9-46,9

<sup>1</sup> n.a. no aplicable, la muestra contiene una concentración mucho mayor que el límite de linealidad

El intervalo de confianza de la pendiente para el alcohol bencílico y el hexil cinamal en la muestra de champú no se ha podido determinar porque su concentración en la muestra era muy alta quedando fuera del rango lineal.

Aquellas casillas marcadas en naranja presentan efecto matriz, es decir, las pendientes de la recta sin matriz y con matriz no solapan. Algunas comparaciones de rectas se muestran a continuación (Figuras 28 y 29).

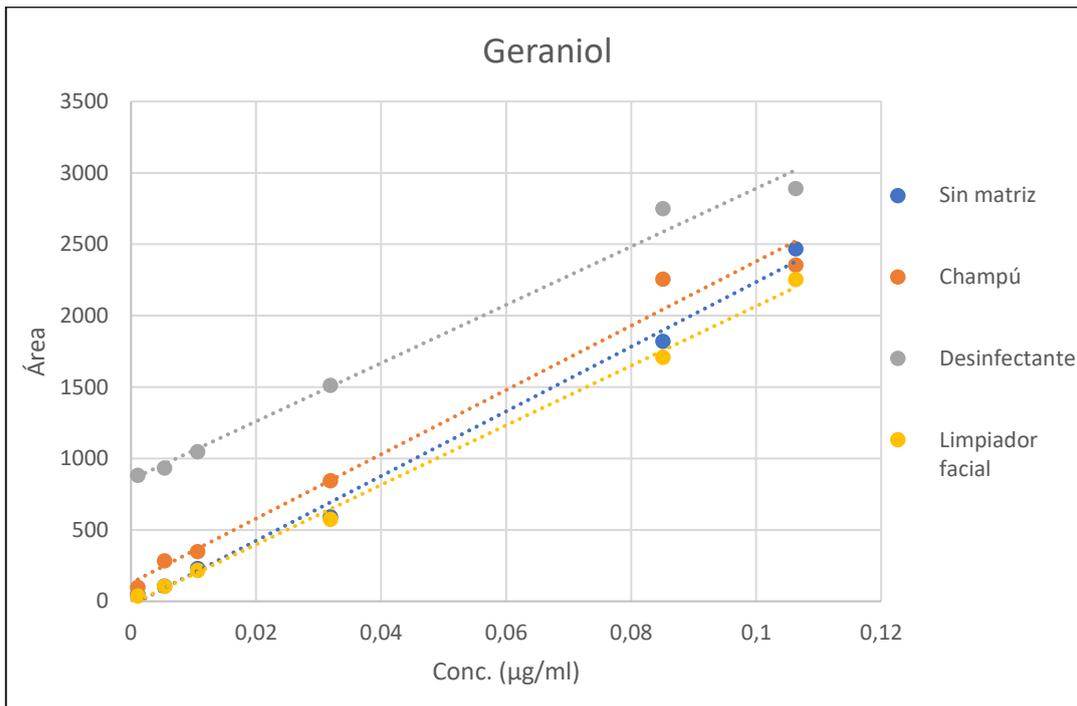


Figura 28: Estudio de efecto matriz para el compuesto Geraniol

Como se puede observar en la Figura 28, las rectas presentan misma pendiente (o similar). Mirando el intervalo de confianza de la pendiente se puede afirmar que solapan, y, por tanto, no presentan efecto matriz. La recta correspondiente al suavizante se ha eliminado del gráfico porque la matriz de la muestra presenta geraniol y no permite visualizar bien el resto de las rectas.

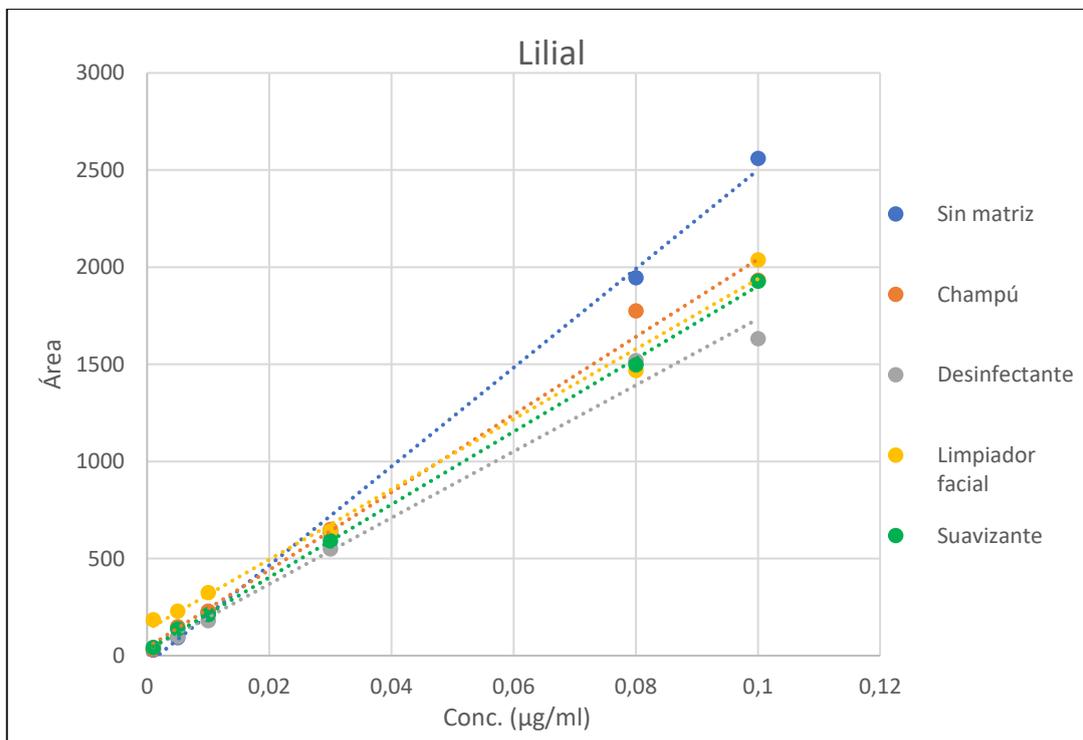


Figura 29: Estudio de efecto matriz para el compuesto Lilial.

Por el contrario, las rectas obtenidas para el lilial (Figura 29) presentan diferencias significativas en las pendientes y los intervalos de confianza no solapan con la pendiente de la recta sin matriz. Por ello, se puede concluir que existe efecto matriz en todas las muestras estudiadas para este analito.

#### 4.2.5. Exactitud

Para establecer la exactitud del método se realizó un estudio de recuperación en cuatro tipos de matrices: un suavizante de ropa marca Eroski, un limpiador facial marca Cien y un champú de cabello y un desinfectante de manos marca Deliplus.

La exactitud es la coincidencia entre el resultado del análisis y el valor de concentración real. Con este estudio se determina la existencia o no de errores sistemáticos que puede presentar el resultado y, generalmente, se expresa como error relativo porcentual.

Para este estudio es recomendable emplear un material de referencia similar a la muestra analizada ya que su concentración ha sido determinada por un laboratorio acreditado. También pueden emplearse muestras que no contengan el analito enriquecidas con una concentración conocida de este. Por último, si no pueden emplearse ninguna de las anteriores puede realizarse mediante muestras reales analizadas con otro método seguro.

En nuestro caso empleamos la segunda opción y, por ello, el cálculo se realiza mediante el estudio de recuperación, aunque en vez de emplear una muestra en blanco se utilizaron muestras que contenían algunos de los analitos estudiados. Para corregir este factor la muestra se analizó antes y después de la adición de patrón por lo que se empleó la siguiente ecuación:

$$Rec (\%) = \frac{C_F - C_0}{C_A} \cdot 100$$

Donde  $C_F$  es la concentración de la muestra enriquecida tras añadir el patrón,  $C_0$  es la concentración de analito en la muestra antes de la adición y  $C_A$  es la concentración de patrón añadida a la muestra.

En este trabajo, para determinar la exactitud del método desarrollado se calculó la recuperación a dos niveles, medio (10 ng/ml) y alto (100 ng/ml). Para ello se adicionaron en matraces aforados de 10,0 ml los volúmenes de patrón correspondientes a esas concentraciones y se añadió acetato de etilo hasta llegar a 250  $\mu$ l para asegurar que presentaban la misma cantidad de matriz. Se pesaron 0,1 g de muestra y se llevaron a matraces aforados de 100 ml y se enrasó con acetato de etilo. Con esta disolución de muestra se enrasaron los matraces de 10,0 ml que contenían los patrones, se filtró cada disolución con un filtro de Nylon de 0,20  $\mu$ m y se analizaron por cromatografía de gases y detector de espectroscopía de masas.

Los resultados obtenidos tras el análisis se analizaron con los software comentados en el apartado 3.2, y se recogieron las tasas de recuperación de las fragancias alergénicas en la siguiente tabla en función del nivel de estudio y de la matriz empleada.

Tabla 13: Porcentaje de recuperación de fragancias alergénicas en cuatro muestras diferentes a dos niveles de concentración

(Recuperación ± desviación estándar) (%) (n=4)								
Compuesto	Suavizante		Champú		Limpiador facial		Desinfectante de manos	
	10 ng/ml	100 ng/ml	10 ng/ml	100 ng/ml	10 ng/ml	100 ng/ml	10 ng/ml	100 ng/ml
D-Limoneno	n.a. <sup>1</sup>	88 ± 6	n.a. <sup>1</sup>	n.a. <sup>1</sup>	n.a. <sup>1</sup>	87 ± 3	n.a. <sup>1</sup>	84 ± 8
Alcohol bencílico	89 ± 1	84 ± 6	n.a. <sup>1</sup>	n.a. <sup>1</sup>	85 ± 4	91 ± 6	97 ± 7	98 ± 5
Linalol	n.a. <sup>1</sup>	91 ± 8	n.a. <sup>1</sup>	n.a. <sup>1</sup>	n.a. <sup>1</sup>	93 ± 5	n.a. <sup>1</sup>	84 ± 13
Citronelol	n.a. <sup>1</sup>	91 ± 7	n.a. <sup>1</sup>	82 ± 2	97 ± 3	99 ± 1	86 ± 9	95 ± 4
Geraniol	n.a. <sup>1</sup>	88 ± 10	n.a. <sup>1</sup>	n.a. <sup>1</sup>	73 ± 3	93 ± 7	n.a. <sup>1</sup>	88 ± 6
Eugenol	n.a. <sup>1</sup>	92 ± 6	87 ± 6	91 ± 6	87 ± 4	95 ± 6	88 ± 3	90 ± 8
Cumarina	n.a. <sup>1</sup>	n.a. <sup>1</sup>	74 ± 4	75 ± 2	n.a. <sup>1</sup>	n.a. <sup>1</sup>	84 ± 8	71 ± 3
Alfa-Isometil ionona	83 ± 12	79 ± 4	76 ± 10	76 ± 5	81 ± 7	80 ± 5	92 ± 9	74 ± 6
Lilial	56 ± 2	59 ± 2	59 ± 3	54 ± 4	n.a. <sup>1</sup>	61 ± 5	66 ± 2	56 ± 4
Amil cinamal	67 ± 2	62 ± 1	75 ± 3	61 ± 4	59 ± 5	71 ± 3	n.a. <sup>1</sup>	n.a. <sup>1</sup>
Hexil cinamal	n.a. <sup>1</sup>	n.a. <sup>1</sup>	n.a. <sup>1</sup>	n.a. <sup>1</sup>	87 ± 8	60 ± 3	n.a. <sup>1</sup>	n.a. <sup>1</sup>
Salicilato de bencilo	62 ± 2	48 ± 5	47 ± 4	48 ± 3	49 ± 1	57 ± 3	70 ± 10	47 ± 3

<sup>1</sup> n.a. no aplicable, la muestra contiene una concentración mucho mayor que el nivel utilizado en el estudio de recuperación

En el caso del linalol, no se ha podido determinar la recuperación con adición de 10 ng/ml ya que su límite de cuantificación es de 20 ng/ml. Para el resto de las celdillas marcadas con "n.a" no se ha determinado la recuperación porque las muestras contenían estos compuestos a unos niveles muy superiores a los añadidos. Para poder establecer la recuperación de estos compuestos sería necesario realizar una dilución mayor de la muestra.

Se cree que, para los valores bajos de recuperación obtenidos para lialil, amil cinamal y salicilato de bencilo, se deben a que estas fragancias alergénicas presentan efecto matriz tal y como se ha comentado anteriormente y, por tanto, se debería utilizar una calibración por adición estándar para dichos compuestos.

Como conclusión, si no tenemos en cuenta las excepciones comentadas anteriormente, las tasas de recuperaciones se encuentran en el rango 71-99 % considerados valores de recuperación aceptables, aunque mejorables.

### 4.3. Análisis de muestras

Finalmente, se llevó a cabo el análisis de las cuatro muestras empleadas anteriormente: suavizante de ropa de Eroski, limpiador facial de la marca Cien, desinfectante de manos Deliplus y champú Deliplus.

Para este estudio se empleó el método validado durante el trabajo (pesando 0,1 g de muestra y llevándolo a matraces aforados de 100 ml para después filtrarlos con filtro de Nylon de 0,20  $\mu\text{m}$  y analizarlos por cromatografía de gases acoplada a un detector de espectrometría de masas). El análisis se realizó en modo scan y SIM.

A continuación, se muestran los cromatogramas de dos de las muestras analizadas:

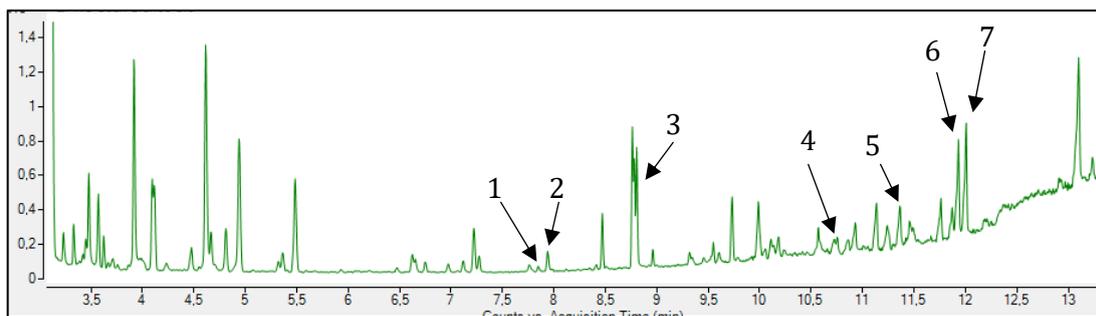


Figura 30: Cromatograma de la muestra de suavizante (modo scan). Identificación de picos: 1) D-limoneno, 2) eucaliptol, 3) linalol, 4) eugenol, 5) Cumarina, 6) salicilato de isoamilo, 7) dietilftalato

En la figura 30 hay muchos picos diferentes a los de los analitos analizados, sin embargo, están muy separados entre sí permitiendo la identificación de cada uno por separado y así saber cuál corresponde a nuestras fragancias estudiadas. También se han identificado otras sustancias como eucaliptol que es una fragancia natural empleada en perfumería la cual se recoge en la etiqueta bajo el genérico perfume, por no ser una fragancia alergénica. Para la identificación de este pico cromatográfico se realizó la comparación de los espectros de masas experimental y de la librería NIST, esta comparación se muestra en la Figura 31 y se obtuvo una coincidencia del 98,92%.

En las tres comparaciones que vamos a comentar a continuación, se muestra en la parte superior el espectro del pico experimental obtenido por inyección en el cromatógrafo, en la parte inferior se muestra el espectro de masas extraído de la librería NIST y en el centro la comparación de ambos espectros.

El resto de las fragancias que presenta la muestra y no se indican en la Figura 30 se encuentran en bajas concentraciones comparadas con el resto de los picos y, por ello, para observarlas hay que ampliar el cromatograma.

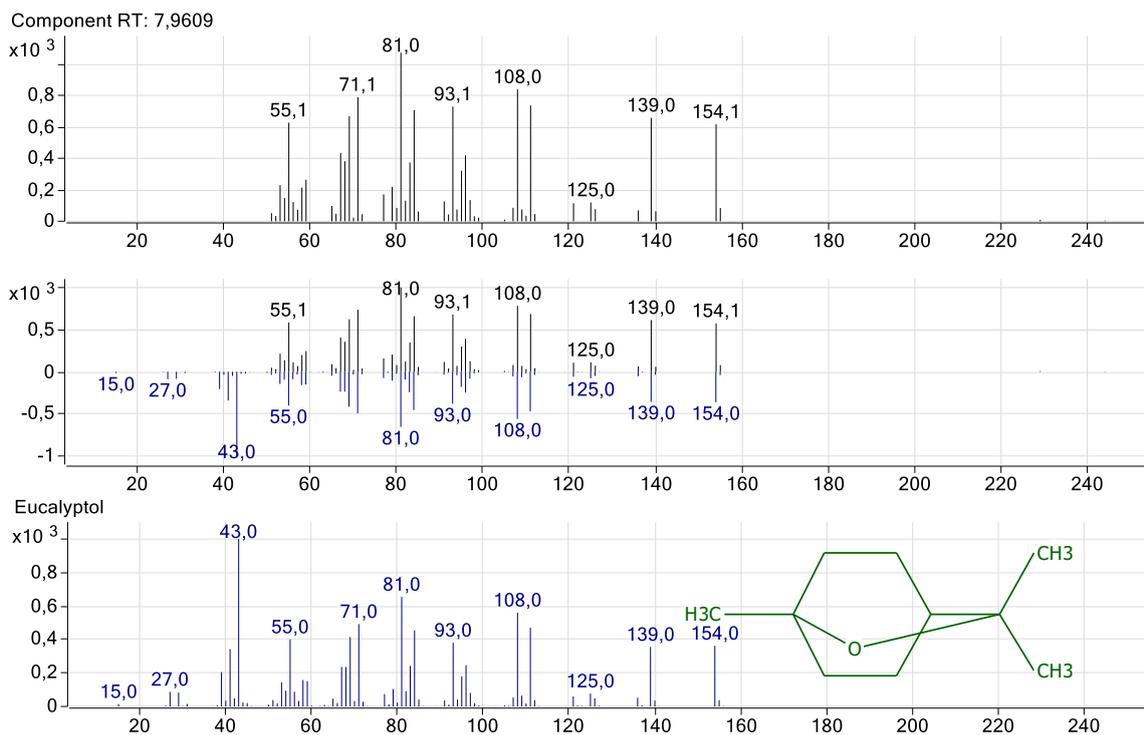


Figura 31: Espectros de masa del eucaliptol, a) especto experimental al tiempo de retención 7,96 minutos, b) espectro del eucaliptol obtenido de la librería NIST.

También se identificó el dietilftalato mediante la comparación del espectro de masas experimental con el espectro obtenido de la librería NIST como se muestra en la siguiente figura, con una coincidencia de 94,94%. Este compuesto es un plastificante empleado en farmacia, elaboración de plásticos y, en este caso, como fijador de fragancias.

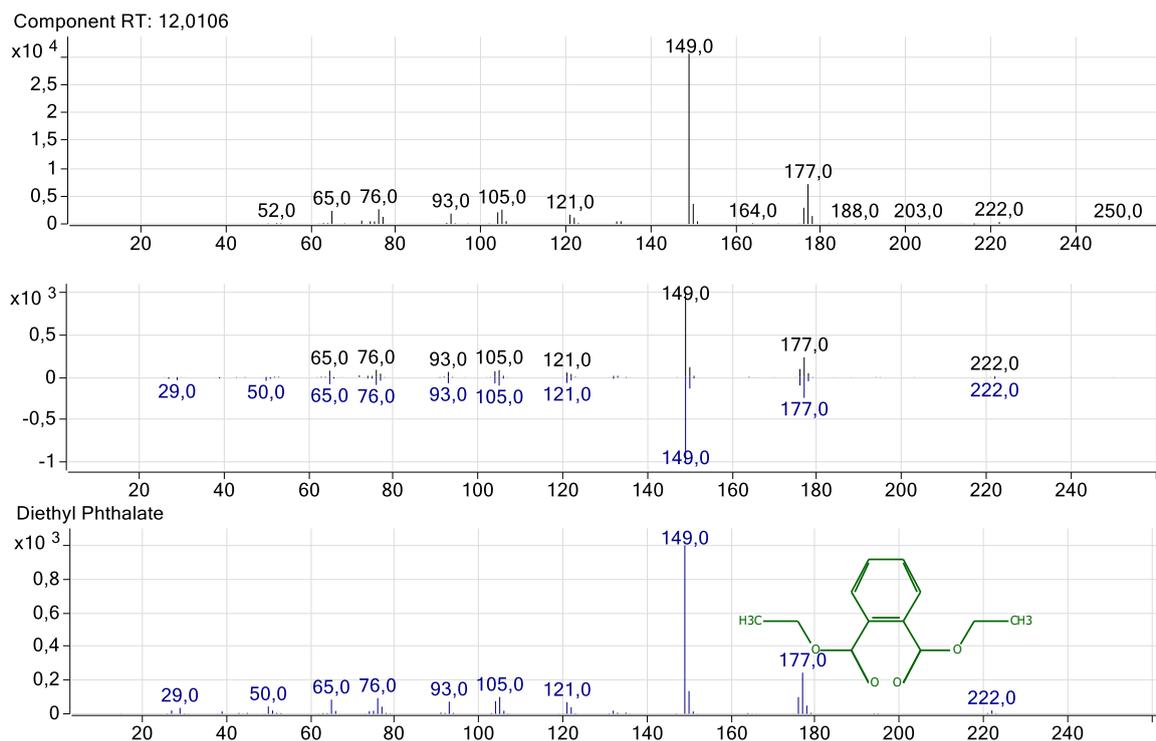


Figura 32: Espectros de masa del dietilftalato, a) especto experimental al tiempo de retención 12,01 minutos, b) espectro del ácido benzoico obtenido de la librería NIST.

Por último, también se reconoció el salicilato de isoamilo mediante la misma comparación. Este compuesto es un aromatizante empleado en perfumería y fabricación de saborizantes. La comparación de los espectros con una coincidencia de 89,52% se muestra en la Figura 33:

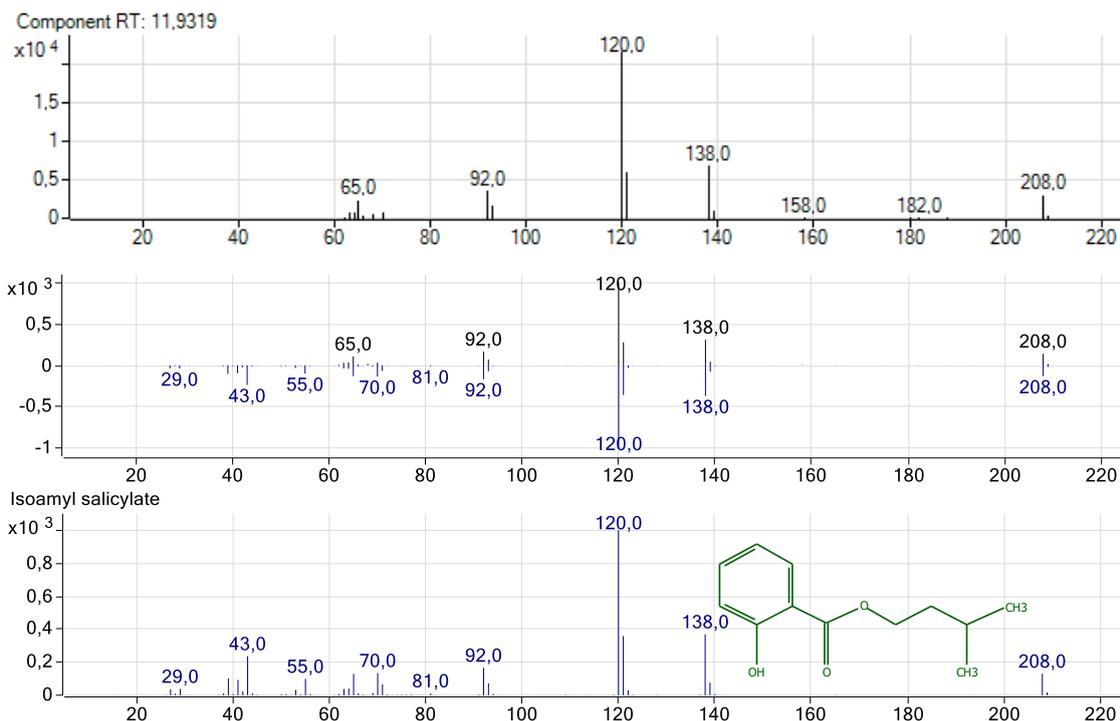


Figura 33: Espectros de masa del salicilato de isoamilo, a) espectro experimental al tiempo de retención 11,93 minutos, b) espectro del salicilato de isoamilo obtenido de la librería NIST.

Por otro lado, en la siguiente figura se muestra el cromatograma de la muestra de champú.

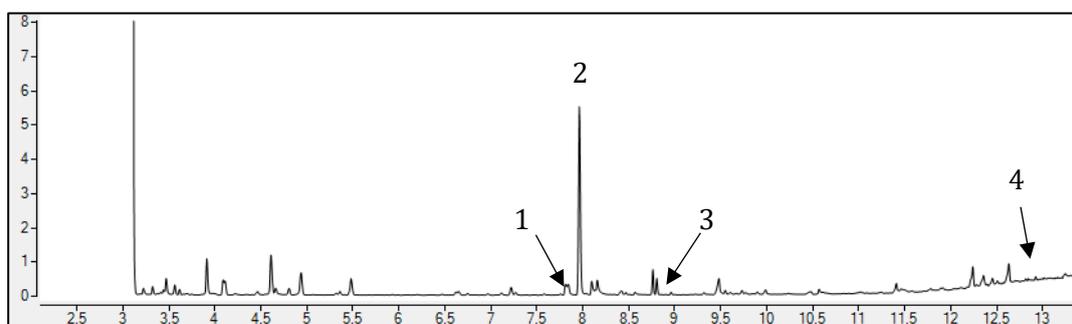


Figura 34: Cromatograma de la muestra de champú (modo scan). Identificación de picos: 1) D-limoneno, 2) alcohol bencílico, 3) linalol, 4) Hexil cinamal.

En el caso de la muestra de champú, hay menos picos por lo que es más fácil la asignación de cada uno de ellos, y el pico a unos 8 minutos (2) corresponde al alcohol bencílico, que como hemos comentado antes, ha dificultado la determinación de la recuperación a niveles de ng/ml y el estudio del efecto matriz porque se encuentra a altas concentraciones en esta muestra.

El resto de las fragancias alergénicas presentes en la muestra y no indicadas en la figura se encuentran a bajas concentraciones y para su observación se necesita ampliar el cromatograma. Para este análisis se prepararon cuatro réplicas de cada muestra y se trataron los datos con el programa Excel. Para la determinación de la concentración de analito en la muestra se acompañó el análisis con una recta de calibrado y se utilizó la siguiente ecuación para calcular la concentración:

$$C_{\text{analito}}(\mu\text{g/g}) = \frac{A_{\text{exp}} - b}{m} \left( \frac{\mu\text{gfragancia}}{\text{ml}} \right) \cdot 100 \text{ ml} \cdot \frac{1}{m_{\text{muestra}}(\text{g})}$$

Donde  $C_{\text{analito}}$  es la concentración de la fragancia en la muestra ( $\mu\text{g/g}$ ),  $A_{\text{exp}}$  es el área obtenida por integración del cromatograma,  $b$  es la ordenada en el origen de la recta de calibrado,  $m$  la pendiente de la regresión lineal y  $m_{\text{muestra}}$  es la cantidad de muestra pesada (g). En la Tabla 14 se recogen los resultados del análisis de las cuatro muestras.

Tabla14: Resultados del análisis de las cuatro muestras

Concentración en muestras ( $\mu\text{g/g}$ ) $\pm s$				
Compuesto	Champú	Suavizante	Desinfectante de manos	Limpiador facial
Limoneno	<b>100 <math>\pm</math> 6</b>	20 $\pm$ 1	<b>50 <math>\pm</math> 2</b>	8 $\pm$ 1
Alcohol bencílico	<b>5130 <math>\pm</math> 189</b>	1,6 $\pm$ 0,2	1 $\pm$ 2	N.D
Linalol	<b>350 <math>\pm</math> 14</b>	<b>400 <math>\pm</math> 7</b>	<b>60 <math>\pm</math> 2</b>	<b>9,2 <math>\pm</math> 0,4</b>
Citronelol	<b>210 <math>\pm</math> 11</b>	<b>400 <math>\pm</math> 6</b>	<b>30 <math>\pm</math> 2</b>	N.D
Geraniol	<b>200 <math>\pm</math> 9</b>	<b>400 <math>\pm</math> 2</b>	<b>40 <math>\pm</math> 2</b>	2,2 $\pm$ 0,4
Eugenol	1,8 $\pm$ 0,1	70 $\pm$ 4	1 $\pm$ 3	0,62 $\pm$ 0,03
Cumarina	N.D	<b>200 <math>\pm</math> 12</b>	N.D	0,5 $\pm$ 0,2
Alfa-Isometil ionona	N.D	6 $\pm$ 1	N.D	5 $\pm$ 2
Lilial	N.D	N.D	N.D	<b>10 <math>\pm</math> 1</b>
Amil cinamal	1,2 $\pm$ 0,3	N.D	<b>50 <math>\pm</math> 2</b>	N.D
Hexil cinamal	<b>440 <math>\pm</math> 51</b>	1 $\pm$ 2	<b>40 <math>\pm</math> 5</b>	N.D
Salicilato de bencilo	N.D	N.D	N.D	N.D

N.D: No detectado (señal <LOD),  $\geq 10 - 100 \mu\text{g}_{\text{fragancia}}/\text{g}_{\text{muestra}}$

En la Tabla 14 se indican en negrita aquellas fragancias que deben estar indicadas en la etiqueta del producto ya que superan el límite legal ( 10 µg fragancia/g muestra para productos que no se enjuagan y 100 µg fragancia/g muestra para aquellos que se aclaran) y en color naranja se ha marcado el valor encontrado de eugenol en champú porque su concentración está por encima del nivel estipulado en la legislación, pero no estaba declarado en la etiqueta del producto.

## 5. Conclusiones

Durante este trabajo se ha implementado un método GC-MS para la determinación de doce fragancias alergénicas. Se han establecido las condiciones óptimas para su detección y cuantificación.

El método ha resultado ser sensible con límites de detección entre 0,5 ng/ml y 2 ng/ml, y preciso con desviación estándar relativa porcentual entre 1,9% y 10,3%.

Se ha comprobado el correcto etiquetado de las muestras analizadas (suavizante, champú, desinfectante de manos y limpiador facial), con excepción del geraniol que presenta un valor superior al estipulado en la normativa sobre etiquetado, pero no estaba declarado en el producto.

El uso de un patrón interno moderado isotópicamente podría compensar los valores de recuperación inferiores al 100%. Sin embargo, presentan un alto coste.

Se recomienda la calibración mediante adición estándar para aquellos compuestos que han presentado efecto matriz.

Como conclusión, aunque faltaría matizar ciertos detalles, el método que se ha desarrollado es apto para las prácticas de laboratorio, ya que el objetivo principal de este estudio era ayudar al profesorado a desarrollar el método y poder así utilizarlo en una asignatura de máster.

## 6. Bibliografía

- [1] Boletín oficial del estado. Reglamento CE No 1223/2009 del parlamento europeo y del consejo de 30 de noviembre de 2009 sobre los productos cosméticos. <https://www.boe.es/doue/2009/342/L00059-00209.pdf>
- [2] European Commission, Directorate-General for Internal Market, Industry, Entrepreneurship and SMEs, Impact assessment study on fragrance labelling on cosmetic products: final report, Publications Office, 2020, <https://data.europa.eu/doi/10.2873/193428>
- [3] European Commission, Directorate-General for Internal Market, Industry, Entrepreneurship and SMEs, Impact assessment study on fragrance labelling on cosmetic products: executive summary, Publications Office, 2020, <https://data.europa.eu/doi/10.2873/335771>
- [4] Mazzucotelli, Minteguiaga, Sgorbini, Sidisky, Marengo, Rubiolo, Bicchi, Cagliero. Ionic liquids as water-compatible GC stationary phases for the analysis of fragrances and essential oils: Quantitative GC–MS analysis of officially-regulated allergens in perfumes. *Journal of Chromatography A*, 1610, 2020, 460567. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460567>
- [5] Pérez-Outeiral, Elcoroaristizabal, Amigo, Vidal. Development and validation of a method for the determination of regulated fragrance allergens by High-Performance Liquid Chromatography and Parallel Factor Analysis 2. *Journal of Chromatography A*, 1526, 2017, 82-92. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.10.034>.
- [6] Shibuta, Shimpei, Imasaka, Tomoko, Imasaka, Totaro. Determination of Fragrance Allergens by Ultraviolet Femtosecond Laser Ionization Mass Spectrometry. *American Chemical Society*, 88, 2016, 10693 – 10700. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b03229>
- [7] Tranchida, Maimone, Franchina, Rodrigues, Alcaraz, Purcaro, Mondello. Four-stage (low-)flow modulation comprehensive gas chromatography quadrupole mass spectrometry for the determination of recently-highlighted cosmetic allergens. *Journal of Chromatography A*, 1439, 2016, 144-151. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.12.002>.
- [8] Hou, Wang, Tang, Xiong, Guo, Liu. Application of  $\beta$ -cyclodextrin/graphene oxide-modified fiber for solid-phase microextraction of six fragrance allergens in personal products. *Royal society of chemistry*, 2015, 6727-6735. <https://doi.org/10.1039/C5AN01030F>
- [9] Celeiro, Lamas, Garcia-Jares, Llompart. Pressurized liquid extraction-gas chromatography-mass spectrometry analysis of fragrance allergens, musks, phthalates and preservatives in baby wipes. *Journal of Chromatography A*, 1384, 2015, 9-21. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.01.049>.
- [10] Desmedt, Canfyn, Pype, Baudewyns, Hanot, Courselle, De Beer, Rogiers, De Paepe, Deconinck. HS–GC–MS method for the analysis of fragrance allergens in complex cosmetic matrices. *Talanta*, 131, 2015, 444-451, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.08.006>.
- [11] Celeiro, Guerra, Lamas, Lores, Garcia-Jares, Llompart. Development of a multianalyte method based on micro-matrix-solid-phase dispersion for the analysis of fragrance allergens and preservatives in personal care products. *Journal of Chromatography A*, 1344, 2014, 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.03.070>.
- [12] Sanchez-Prado, Alvarez-Rivera, Lamas, Llompart, Loresa, Garcia-Jares. Content of suspected allergens and preservatives in marketed baby and childcare products. *Analytical Methods*, 2013, 416-427, <https://doi.org/10.1039/C2AY26145F>.

- [13] Devos, Ochiai, Sasamoto, Sandra, David. Full evaporation dynamic headspace in combination with selectable one-dimensional/two-dimensional gas chromatography–mass spectrometry for the determination of suspected fragrance allergens in cosmetic products. *Journal of Chromatography A*, 1255, 2012, 207-215. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.01.082>
- [14] Sanchez-Prado, Lamas, Alvarez-Rivera, Lores, Garcia-Jares, Llompart. Determination of suspected fragrance allergens in cosmetics by matrix solid-phase dispersion gas chromatography–mass spectrometry analysis. *Journal of Chromatography A*, 1218, 2011, 5055-5062. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.06.013>.
- [15] Sanchez-Prado, Llompart, Lamas, Garcia-Jares, Lores. Multicomponent analytical methodology to control phthalates, synthetic musks, fragrance allergens and preservatives in perfumes. *Talanta*, 85, 2011, 370-379. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.03.079>.
- [16] Lamas, Sanchez-Prado, Garcia-Jares, Lores, Llompart. Development of a solid phase dispersion-pressurized liquid extraction method for the analysis of suspected fragrance allergens in leave-on cosmetics. *Journal of Chromatography A*, 1217, 2010, 8087-8094. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.10.120>.
- [17] Niederer, Bollhalder, Hohl. Determination of fragrance allergens in cosmetics by size-exclusion chromatography followed by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, Volume 1132, 2006, 109-116. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.07.055>.
- [18] Dunn, Vulic, Shellie, Whitehead. Morrison, Marriott, Targeted multidimensional gas chromatography for the quantitative analysis of suspected allergens in fragrance products. *Journal of Chromatography A*, 1130, 2006, 122-129. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.08.012>