



Kimika Zientzien Fakultatea

Kimika Aplikatua Saila

**Kosmetikoen osagai hautatuak determinatzeko
kromatografia elektrozinetiko mizelarrean
oinarritutako metodoen garapena eta aplikazioa**

izena duen txostena

Zientzia Kimikoetan Doktore-maila eskuratzeko

Josu Lopez Gazpio

Donostia 2014

© Servicio Editorial de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU)
- *Euskal Herriko Unibertsitateko Argitalpen Zerbitzua (UPV/EHU)*
- EHU Press (UPV/EHU)
- **ISBN: 978-84-9082-094-0**

ESKER-EMATEA

Kimika analitikoa taldearen, Kimika Aplikatua sailaren, Kimika Zientzien Fakultatearen, Gipuzkoako Campusaren eta, orokorrean, Euskal Herriko Unibertsitatearen azpiegiturak eta baliabideak ezinbestekoak izan dira doktorego-tesi hau aurrera eraman ahal izateko.

Tesi honen parte izan direnei, Rosa Garcia dk. irakasleari eta, guztien gaitetik, Esmeralda Millán dk. zuzendariari:

Eskerrik asko.

FINANTZAKETA

Doktorego-tesi hau Euskal Herriko Unibertsitateko Kimika Aplikatua saileko analitikako taldean gauzatu da, Eusko Jaurlaritzaren Hezkuntza, Hizkuntza Politika eta Kultura Sailaren ikertzaileak prestatzeko laguntzari esker.

Ikerkuntzaren finantzaketari dagokionez, Euskal Herriko Unibertsitatearen EHU11/20 ikerkuntza proiektua eta Eusko Jaurlaritzaren S-PE13UN192 SAIOTEK proiektua lagungarriak izan dira ikerketa hau garatzeko.

Fortunately science, like that nature to which it belongs, is neither limited by time nor by space. It belongs to the world, and is of no country, and of no age. The more we know, the more we feel our ignorance, the more we feel how much remains unknown; and in philosophy, the sentiment of the Macedonian hero can never apply; there are always new worlds to conquer.

Sir Humphry Davy

Aurkibidea

I. zatia: Sarrera orokorra	1
1. Kontzeptu orokorrak	5
1.1. Kosmetikaren historia laburra	5
1.2. Egungo araudia	8
1.3. Kalitate-kontrola	13
1.4. Kosmetikoen osagaiak eta analisisa: ikuspegi orokorra	14
1.5. Kosmetikoen osagaiak: lurrinak eta lurringintza	17
1.6. Usainen kimioerrezeptzioa	24
1.7. Lurrinen analisisa: ikuspegi orokorra	33
1.8. <i>Conceptos generales (resumen traducido)</i>	35
1.9. <i>Erreferentziak / Referencias</i>	45
2. Musketak	51
2.1. Sarrera	51
2.2. Musketa naturala	52
2.3. Musketa nitroaromatikoak	54
2.4. Musketa poliziklikoak	58
2.5. Musketa poliziklikoen toxikotasuna	63
2.6. Musketa makroziklikoak eta etorkizuneko erronkak	66
2.7. Musketen analisisa kosmetikoetan	67
2.8. <i>Almizcles (resumen traducido)</i>	71
2.9. <i>Erreferentziak / Referencias</i>	79
3. Lurrin alergenak, kontserbagarriak eta ultramore-iragazkiak	87
3.1. Lurrin alergenak	87
3.1.1. Alergenoak eta segurtasuna	92
3.1.2. Lurrin alergenoen analisisa	94
3.2. Kontserbagarriak	97
3.2.1. Kontserbagarri antimikrobianoak	98
3.2.2. Kontserbagarri antioxidatzaileak	104
3.2.3. Kontserbagarrien analisisa	105
3.3. Ultramore-iragazkiak	107
3.3.1. Ultramore-iragazkien analisisa	109
3.4. Aldibereko analisisa	110
3.5. <i>Fragancias alérgenas, conservantes y filtros ultravioleta (resumen traducido)</i>	113
3.6. <i>Erreferentziak / Referencias</i>	123
4. Elektroforesi kapilarra	135
4.1. Elektromigrazio-tekniken bilakaera	135
4.2. Elektroforesi fenomenoak	140

4.3. Elektroosmosia	143
4.3.1. Geruza elektriko bikoitzaren deskribapena	145
4.3.2. Fluxu elektroosmotikoaren abiadura-profila	147
4.3.3. Fluxu elektroosmotikoaren kontrola	148
4.4. Instrumentazioa	151
4.4.1. Goi-tentsio iturria	152
4.4.2. Kapilarrak	154
4.4.3. Injekzio-sistemak	155
4.4.4. Detekzio-sistemak	156
4.4.4.1. Detekzio-sistema optikoak	157
4.4.4.2. Detekzio-sistema elektrokimikoak	158
4.4.4.3. Masa-espektrometria	159
4.5. Banaketen kalitatea	160
4.6. Elektromigrazio-teknika motak	161
4.6.1. Zonako elektroforesi kapilarra	162
4.6.2. Kromatografia elektrozinetiko mizelarra	165
4.6.3. Elektroforesi kapilar ez-akuosoa	169
4.6.4. Kromatografia elektrozinetiko mizelar ez-akuosoa	172
4.7. <i>Electroforesis capilar (resumen traducido)</i>	175
4.8. <i>Erreferentziak / Referencias</i>	189
Helburuak	199
Helburuak	201
Objetivos	203
II. zatia: Atal esperimentalak	205
5. Perfumeetan musketa poliziklikoak determinatzeko kromatografia elektrozinetiko mizelar ez-akuosoa oinarritutako metodoaren garapena eta optimizazioa	209
5.1. Sarrera	211
5.2. Materialak eta metodoa	211
5.2.1. Erreaktiboak eta laginak	211
5.2.2. Instrumentazioa	211
5.2.3. Prozedura	212
5.3. Emaitzak eta eztabaida	213
5.3.1. Metodoaren optimizazioa	213
5.3.1.1. Diseinu esperimentalaren eta optimizazioaren deskribapena	213
5.3.1.2. MCRF erantzun-funtzioaren deskribapena	215
5.3.1.3. Optimizazioaren garapena	220
5.3.2. Ezaugarri analitikoak	225
5.3.2.1. Kalibraketa zuzenak eta linealtasuna	225
5.3.2.2. Detekzio eta kuantifikazio mugak	227

5.3.2.3. Doitasuna	227
5.3.2.4. Zehaztasuna	229
5.3.3. Aplikazioa	230
5.4. Ondorioak	237
5.5. <i>Erreferentziak</i>	239
5.6. <i>Published paper</i>	243
6. Zainketa pertsonalerako produktuetan lurrin alergenok eta kontserbagarriak determinatzeko kromatografia elektroinetiko mizelarrean oinarritutako metodoaren garapena eta optimizazioa	253
6.1. Sarrera	253
6.2. Materialak eta metodoa	256
6.2.1. Erreaktiboak	256
6.2.1.1. Barne-patroia eta azalera normalizatua	257
6.2.2. Instrumentazioa eta prozedura	258
6.2.3. Laginak eta laginen prestaketa	259
6.3. Emaitzak eta eztabaida	260
6.3.1. Metodoaren optimizazioa	260
6.3.1.1. Diseinu esperimentalaren deskribapena	260
6.3.1.2. Optimizazioaren garapena	261
6.3.2. Ezaugarri analitikoak	268
6.3.2.1. Kalibraketa zuzenak eta linealtasuna	268
6.3.2.2. Detekzio eta kuantifikazio mugak	271
6.3.2.3. Doitasuna eta zehaztasuna	272
6.3.3. Aplikazioa	274
6.4. Ondorioak	280
6.5. <i>Erreferentziak</i>	281
6.6. <i>Published paper</i>	287
7. Zainketa pertsonalerako produktuetan kontserbagarriak eta ultramore-iragazkiak determinatzeko kromatografia elektroinetiko mizelarrean oinarritutako metodoaren garapena eta optimizazioa	301
7.1. Sarrera	301
7.2. Materialak eta metodoa	305
7.2.1. Erreaktiboak	305
7.2.2. Instrumentazioa eta prozedura	306
7.2.3. Laginak eta laginen prestaketa	307
7.3. Emaitzak eta eztabaida	307
7.3.1. Metodoaren optimizazioa	307
7.3.1.1. MCRF erantzun-funtzioa: zenbait ohar	314
7.3.2. Ezaugarri analitikoak	317
7.3.2.1. Kalibraketa zuzenak eta linealtasuna	318
7.3.2.2. Detekzio eta kuantifikazio mugak	320

7.3.2.3. Doitasuna eta zehaztasuna	321
7.3.2.4. Kontserbagarriak: metodoen konparaketa	323
7.3.3. Aplikazioa	325
7.4. Ondorioak	331
7.5. <i>Erreferentziak</i>	333
7.6. <i>Submitted paper</i>	339
Ondorio orokorrak	357
Ondorio orokorrak	359
Conclusiones generales	361
<i>Argitalpenak / Publicaciones</i>	363

Acronyms / Akronimoak / Acrónimos

AC:	<i>Adenylate Cyclase</i> ; Adenilato Ziklasa; Adenilato Ciclasa
ACN:	<i>Acetonitrile</i> ; Azetonitrilo; Acetonitrilo
ADBI/AHMI:	<i>Celestolide</i>
AHDI:	<i>Phantolide</i>
AHTN:	<i>Tonalide</i>
ATII:	<i>Traseolide</i>
ATTN:	<i>Versalide</i>
ATP:	<i>Adenosine Triphosphate</i> ; Adenosin Trifosfato; Adenosin Trifosfato
BBD:	<i>Box-Behnken Design</i> ; Box-Behnken Diseinu; Diseño Box-Behnken
BGE:	<i>Background Electrolyte</i> ; Elektrolito Disoluzio; Disolución Electrolítica
BHA:	<i>Butylated Hydroxyanisole</i> ; Hidroxianisol butilatu; Hidroxianisol butilado
BHT:	<i>Butylated Hydroxytoluene</i> ; Hidroxitolueno butilatu; Hidroxitolueno Butilado
BZ:	<i>Benzophenone</i> ; Bentzofenona; Benzofenona
cAMP:	<i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i> ; Adenosin Monofosfato Zikliko; Adenosin Monofosfato Cíclico
CCD:	<i>Central Composite Design</i> ; Diseinu Konposatu Zentral; Diseño Central Compuesto
CE:	<i>Capillary Electrophoresis</i> ; Elektroforesi Kapilar; Electroforesis Capilar
CEC:	<i>Capillary Electrochromatography</i> ; Elektrokromatografia Kapilar; Electrochromatografía Capilar
CFSAN:	<i>Centre for Food Safety and Applied Nutrition</i>
CGE:	<i>Capillary Gel Electrophoresis</i> ; Elektroforesi Kapilarra Geletan; Electroforesis Capilar en Gel
CIEF:	<i>Capillary Isoelectric Focusing</i> ; Fokatze Isoelektriko Kapilar; Enfoque Isoeléctrico Capilar
CITP:	<i>Capillary Isotachopheresis</i> ; Isotakoforesi Kapilar; Isotacoforesis Capilar
CITES:	<i>Convention on International Trade in Endangered Species of wild fauna and flora</i>
CMC:	<i>Critic Micelle Concentration</i> ; Kontzentrazio Mizelar Kritiko; Concentración Micelar Crítica
CMR:	<i>Carcinogenic, Mutagenic or toxic for Reproduction</i> ; Kartzinogenoa, Mutagenikoa edo Ugalketarentzat toxiko; Carcinógeno, Mutagénico o tóxico para la Reproducción
COLIPA:	<i>Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association</i>
CRF:	<i>Chromatographic Response Function</i> ; Erantzun-Funtzio Kromatografiko; Función de Respuesta Cromatográfica
CZE:	<i>Capillary Zone Electrophoresis</i> ; Zonako Elektroforesi Kapilar; Electroforesis Capilar Zonal
DAD:	<i>Diode Array Detector</i> ; Lerrokatutako Diodoen Detektagailu; Detector de Diodos en Hilera
D-SPE:	<i>Dispersive Micro-Solid-Phase Extraction</i>
EIC:	<i>Extracted Ion Chromatogram</i>
DLLME:	<i>Dispersive Liquid-Liquid Microextraction</i> ; Likido-Likido Mikroerauzketa Dispersibo; Microextracción Líquido-Líquido Dispersiva
DM:	<i>Dohelert Matrix</i> ; Dohelert Matriz; Matriz Dohelert
DPMI:	<i>Cashmeran</i>
EOF:	<i>Electroosmotic Flow</i> ; Fluxu Elektroosmotiko; Flujo Electroosmótico

ESI:	<i>Electrospray Ionization</i> ; Elektrospray-ionizazio; Ionización por Electrospray
FA:	<i>Formamide</i> ; Formamida; Formamida
FDA:	<i>Food and Drug Administration</i>
FID:	<i>Flame Ionization Detector</i> ; Sugar Ionizazioko Detektagailu; Detector de Ionización de Llama
GC:	<i>Gas Chromatography</i> ; Gas-Kromatografia; Cromatografía de Gases
GDP:	<i>Guanosine Diphosphate</i> ; Guanosin Difosfato; Guanosin Difosfato
GPCR:	<i>G-Protein-Coupled Receptor</i> ; G-Proteinei Akoplatutako Errezeptore; Receptor Acoplado a Proteína-G
GTP:	<i>Guanosine Triphosphate</i> ; Guanosin Trifosfato; Guanosin Trifosfato
HHCB:	<i>Galaxolide</i>
HPLC:	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> ; Bereizmen Handiko Likido-Kromatografia; Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
ICP:	<i>Inductively Coupled Plasma</i> ; Induktiboki Akoplatutako Plasma; Plasma Acoplado Inductivamente
IFF:	<i>International Flavors and Fragrances</i>
IFRA:	<i>International Fragrance Association</i>
IR:	<i>Infrared</i> ; Infragorri; Infrarrojo
IS:	<i>Internal Standard</i> ; Barne-Patroi; Patrón Interno
KI:	<i>Kovats Index</i> ; Kovats Indize; Índice de Kovats
LC:	<i>Liquid Chromatography</i> ; Likido-kromatografia; Cromatografía de Líquidos
LD:	<i>Lethal Dose</i> ; Dosi Hilgarri; Dosis Letal
LIF:	<i>Laser Induced Fluorescence</i> ; Laserrez Induzitutako Fluoreszentzia; Fluorescencia Inducida por Láser
LOD:	<i>Limit of Detection</i> ; Detekzio Muga; Límite de Detección
LOQ:	<i>Limit of Quantification</i> ; Kuantifikazio Muga; Límite de Cuantificación
MA:	<i>Musk Ambrette</i> ; Abelmosko Musketa; Almizcle de Abelmosco
MALDI:	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i> ; Laserrez Lagundutako Matriz Desortzio/Ionizazio; Ionización/Desorción por Láser Asistida por Matriz
MBC:	<i>Minimum Biocidal Concentration</i> ; Kontzentrazio Biozida Mínimo; Concentración Biocida Mínima
MBE:	<i>Moving Boundary Electrophoresis</i> ; Fronte Mugikorren Elektroforesi; Electroforesis de Frente Móvil
MCM:	<i>MacroCyclic Musk</i> ; Musketa Makrozikliko; Almizcle Policíclico
MCRF:	<i>Modified Chromatographic Response Function</i> ; Erantzun-Funtzio Kromatografiko Aldatu; Función de Respuesta Cromatográfica Modificada
MCRF _R :	<i>MCRF (Resolution Term)</i> ; MCRF (Bereizmen Atala); MCRF (Término Resolución)
MCRF _T :	<i>MCRF (Time Term)</i> ; MCRF (Denbora Atala); MCRF (Término Tiempo)
MEEKC:	<i>Microemulsion Electrokinetic Chromatography</i> ; Mikroemulsio Kromatografia Elektrozinetiko; Cromatografía Electrocinética en Microemulsión
MEKC:	<i>Micellar Electrokinetic Chromatography</i> ; Kromatografia Elektrozinetiko Mizelar; Cromatografía Electrocinética Micelar
MeOH:	<i>Methanol</i> ; Metanol; Metanol
MIC:	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i> ; Kontzentrazio Inhibitzaile Mínimo; Concentración Inhibidora Mínima
MK:	<i>Musk Ketone</i> ; Zetona Musketa; Almizcle de Cetona

MS:	<i>Mass Spectrometry</i> ; Masa Espektrometria; Espectrometría de Masas
MSPD:	<i>Matrix Solid-Phase Dispersion</i>
MX:	<i>Musk Xylene</i> ; Xileno musketa; Almizcle de Xileno
MXR:	<i>Multixenobiotic Resistance</i> ; Erresistentzia Multixenobiotiko; Resistencia Multixenobiótica
NACE:	<i>Nonaqueous Capillary Electrophoresis</i> ; Elektroforesi Kapilar Ez-Akuoso; Electroforesis Capilar No Acuosa
NAMEKC:	<i>Nonaqueous Micellar Electrokinetic Chromatography</i> ; Kromatografia Elektrozinetiko Mizelar Ez-Akuoso; Cromatografía Electrocinética Micelar No Acuosa
NM:	<i>Nitro-aromatic Musk</i> ; Musketa Nitroaromatiko; Almizcle Nitroaromático
NMR:	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> ; Erresonantzia Magnetiko Nuklear; Resonancia Magnética Nuclear
NOAEL:	<i>Non Observed Adverse Effect Level</i> ; Efektu Kaltegarri Behagarririk Gabeko Maila; Nivel Sin Efecto Adverso Observable
OBP:	<i>Odor Binding Protein</i> ; Proteina Usain Lotzaile; Proteínas Enlazantes Olfativas
OR:	<i>Olfactory Receptor</i> ; Usain-erzeptore; Receptor Olfativo
PAGE:	<i>Polyacrylamide Gel</i> ; Poliakrilamida Gel; Gel de Poliacrilamida
PAS:	<i>Potentially Allergenic Substance</i> ; Substantzia Potentzialki Alergeno; Sustancia Potencialmente Alérgena
PCM:	<i>Polycyclic Musk</i> ; Musketa Polizikliko; Almizcle Policíclico
PCP:	<i>Personal Care Product</i> ; Zainketa Pertsonalerako Produktu; Produto para el Cuidado Personal
PLE:	<i>Pressurized Liquid Extraction</i> ; Presiopeko Erauzketa Likidoa; Extracción Líquida Presurizada
PNEC:	<i>Predicted Non-Effect Concentration</i> ; Efekturik Gabe Aurreikusitako Kontzentrazio; Concentración Prevista Sin Efecto
ppb:	<i>parts per billion</i> ; bilioikobeste; partes por billón
PPCP:	<i>Pharmaceutical and Personal Care Product</i> ; Zainketa Pertsonalerako eta Farmaziako Produktu; Producto Farmacéutico y para el Cuidado Personal
ppm:	<i>parts per million</i> ; milioikobeste; partes por millón
R _{cp} :	<i>Resolution of the Critical Pair</i> ; Piko-pare Kritikoaren Bereizmen; Resolución del Par de Picos Crítico
RIFM:	<i>Research Institute for Fragrance Materials</i>
ROS:	<i>Reactive Oxygen Specie</i> ; Oxigeno-Espezie Erreaktibo; Especie de Oxígeno Reactiva
RP:	<i>Resolved Peaks</i> ; Bereizitako Pikoak; Picos Resueltos
RSD:	<i>Relative Standard Deviation</i> ; Desbideraketa Estandar Erlatibo; Desviación Estándar Relativa
RSM:	<i>Response Surface Methodology</i> ; Erantzun-Gainazalen Metodologia; Metodología de Superficies de Respuesta
SBSE:	<i>Stir Bar Sorptive Extraction</i>
SCCNFP:	<i>Scientific Committee on Cosmetic products and Non-Food Products intended for consumers</i>
SCCP:	<i>Scientific Committee on Consumer Products</i>
SCCS:	<i>Scientific Committee on Consumer Safety</i>
SD:	<i>Standard Deviation</i> ; Desviación estándar, Desbideraketa estandarra

SDS:	<i>Sodium Dodecylsulfate</i> ; Sodio Dodezilsulfato; Dodecilsulfato de Sodio
SFE:	<i>Supercritical Fluid Extraction</i> ; Fluido Superkritikoen bidezko Erauzketa; Extracción con Fluidos Sueprcríticos
SIM:	<i>Selected Ion Monitoring</i>
SOR:	<i>Structure-Odor Relationship</i> ; Egitura-Usain Erlazio; Relaciones Estructura-Olor
SPE:	<i>Solid Phase Extraction</i> ; Fase Solidoko Erauzketa; Extracción en Fase Sólida
SPME:	<i>Solid-Phase Microextraction</i> ; Fase Solidoko Mikroerauzketa; Microextracción en Fase Solida
STB:	<i>Sodium Tetraborate Decahydrate</i> ; Sodio Tetraborato Dekahidrato; Tetraborato de Sodio Decahidratado
SVOC:	<i>Semivolatile Organic Compound</i> ; Konposatu Organiko Erdilurrinkor; Compuesto Orgánico Semivolátil
TCD:	<i>Thermal Conductivity Detector</i> ; Eroankortasun Termikoko Detektagailu; Detector de Conductividad Térmica
TLC:	<i>Thin Layer Chromatography</i> ; Geruza Fineko Kromatografia; Cromatografía de Capa Fina
TOF:	<i>Time Of Flight</i> ; Hegaldi Denbora; Tiempo de Vuelo
UV:	<i>Ultraviolet</i> ; Ultramore; Ultravioleta
ZE:	<i>Zone Electrophoresis</i> ; Zonako Elektroforesi; Electroforesis Zonal

I. ZATIA

Sarrera orokorra

I. ZATIA: Sarrera orokorra

1- Kontzeptu orokorrak

2- Musketak

3- Lurrin alergenak, kontserbagarriak eta ultramore-iragazkiak

4- Elektroforesi kapilarra

— 1 —

Kontzeptu orokorrak

1.1. Kosmetikaren historia laburra

Gizakiak erabili zituen lehen kosmetikoak perfumeak izan ziren, izan ere, usainek inkontzienteki alda edo gida dezakete gure portaera. Usaimena, dastamenarekin batera, bizidunon informazio iturri zaharrena da, inguratzen gaituenari buruzko datu kimikoak eskuratzeko bidea. Antzina ezaugarri ezinbestekoa izan zen espezieek biziraun zezaten, baita gizateriak ere. Gure aitzindariak bizitza kolektiboa hasi zutenetik hona, usainak sentitzeko ahalmenaren zati esanguratsu bat galdu egin dugu. Dena den, usainen eta funtzio sentsitibo, afektibo eta mentalen arteko erlazioek estuak izaten jarraitzen dute. Usainak bereziki garrantzitsuak dira giza portaeretan, eta horietan eragitea izan da, hain zuzen ere, perfumeen xede nagusienetakoa. Lurringintzaren hastapenetatik gaur egunera arte, kimikak eskaintzen dituen baliabideak izan dira tresnarik garrantzitsuenak perfumeen osagaiak prestatzeko.

Perfume hitzak latinean du jatorria, *per* eta *fumum* hitzetan zehazki; alegia, *kean zehar* edo *ketik*, eta antzina usain atseginak lortzeko erretzen ziren materialei egiten die erreferentzia. Adiera orokorragoan, eta egungo ikuspuntutik, usain oneko edozein produktu natural zein sintetiko izendatzeko erabil daiteke. Perfumeen historiaren hasierak gizateriaren historiarekin bat egiten du. Historiaurrean lehen gizakiak hainbat materialen usain onaz konturatu zirenetik, faraoi, enperadore, konkistatzaile eta monarka askok, euren gortesau eta alkimistekin batera, perfumeak erabili zituzten mendeetan zehar. Horrek perfumeen zientzia eta teknologiaren aurrerapen izugarria ekarri zuen, eta ondoren, garapen horiek guztiak beste esparru ugarritan aplikatu ahal izan ziren. D.J. Rowe adituaren hitzetan, kimika modernoaren sustraiak aromen eta perfumeen industrian daudela esatea ez da ahoberokeria (Rowe, 2005).

Historiaurrean usainek garrantzi erlijioso edo jainkotiarra izan bazuten ere, perfumeen garapena K.a. 4000. eta 2000. urteen artean hasi zen. Ezagutzen den perfumerik zaharrenak 4.000 urte inguru ditu. Arkeologo italiar batzuek Zipre

uhartean aurkitu zuten 2003an, Afrodita jainkosa mitologikoaren ustezko jaiolekutik gertu (National Geographic News, 2007). Antzina, Egiptoko eta Mesopotamiako zibilizazioei esker, perfumeen garapenerako giltzarriak aurkitu zituzten: konposatu kimiko usaintsuak, perfumeen ezinbesteko osagaia den alkohol etilikoa (fruten hartxiduratik lortua) eta edukiontzia egiteko beira. Orduan hasi ziren beratzearen edo *enfleurage* esaten zaionaren gisako teknikak erabiltzen; landareen esentziak lortzea zuten helburu (Pybus, 2006).

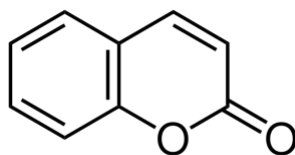
Grezian eta Erroman ere oso preziatuak ziren espezia, olio eta perfumeak: intsentsua, mirra, azafraia, kanela, arrosa-esentzia eta abar, arrakasta edota gizarte-maila altua erakusteko ikur gisa erabiltzen zituzten. Erromako inperioak iraun zuen bitartean, produktu horien merkataritza oparoa izan zen Ekialde Urrunetik Mediterraneora. Erdi Aroan, alkimista arabiarrek esentziak destilatzeko alanbikoa asmatu zuten, eta euren eskutik iritsi ziren perfumeen lehen errezeta-liburuak (Al-Hassani *et al.*, 2006). Hurrengo mendeetan ere izan ziren perfumeekin erlazioa duten gertaerak. Horien artean aipatzekoa da Florentzia, Venezia, Genoa eta horrelako merkataritza hirietan perfumeek izandako garrantzia, edo Amerikaren aurkitzea ekarri zuten Kristobal Kolonen bidaien arrazoi nagusienetakoa: Ekialde Urrunean zeuden produktu exotikoen merkataritza areagotzeko nahia (Fuster Ruiz, 1998).



1.1. Irudia. *Eau de Cologne* perfumeak arrakasta handia izan zuen XVIII. mendean.

XVIII. mendean, kimika modernoa lehen pausoak ematen ari zenean, lurringintzaren munduan bi gertakizun aipagarri izan ziren. Alde batetik, 1708an, Charles Lilly lurringileak animalia jatorriko lehen konposatua erabili zuen perfume batean osagai bezala: musketa (Pybus, 2006). Bestetik, 1710ean Giovanni Maria Farinak gaur egun ere ezaguna den *Eau de Cologne* perfumea sortu zuen (1.1. Irudia). Bitxikeria moduan, aipatu behar da Napoleon Bonaparte bera perfumezale amorratua zela eta hilabete baten buruan 60 perfume botila erabiltzen zituela (Ireland, 1828). Ikuspuntu kimikotik, 1882an aurrerapauso nabarmena eman zen: Paul Parquet lurringile frantsesak lehen aldiz konposatu sintetiko bat erabili zuen *Fougere Royale* perfumearen osagai moduan. Konposatu hori kumarina zen (1.2. Irudia), William Perkin kimikariak 1868an sintetizatu

zuen molekula, hain zuzen ere. Lurringintza modernoa, kimikaren bultzadarekin, abian zen jada (Rowe, 2005).



1.2. Irudia. Kumarinaren egitura kimikoa. Kumarina perfume batean erabilitako lehen konposatu sintetikoa izan zen, *Fougere Royale* perfumearen osagai moduan.

XX. mendean zehar, eta gaur egunera arte, perfumeen erabilera izugarri zabaldu zen, gizarte-maila guztietara iristeraino. Era berean, usain gozoen eta perfumeen kimikak aurrerapauso ikusgarriak eman ditu hainbat esparrutan. Teknika analitiko berriak agertzeari eta kimika organiko sintetikoa garatzeari esker, beste konposatu batzuk bilatu, identifikatu eta sintetizatu ahal izan dira.

1.1. Taulan ikusgai daude horietako gertakari garrantzitsu batzuk.

1.1. Taula. Lurringintzaren kimikaren arloko gertakari garrantzitsuak (Rowe, 2005; Pybus, 2006).

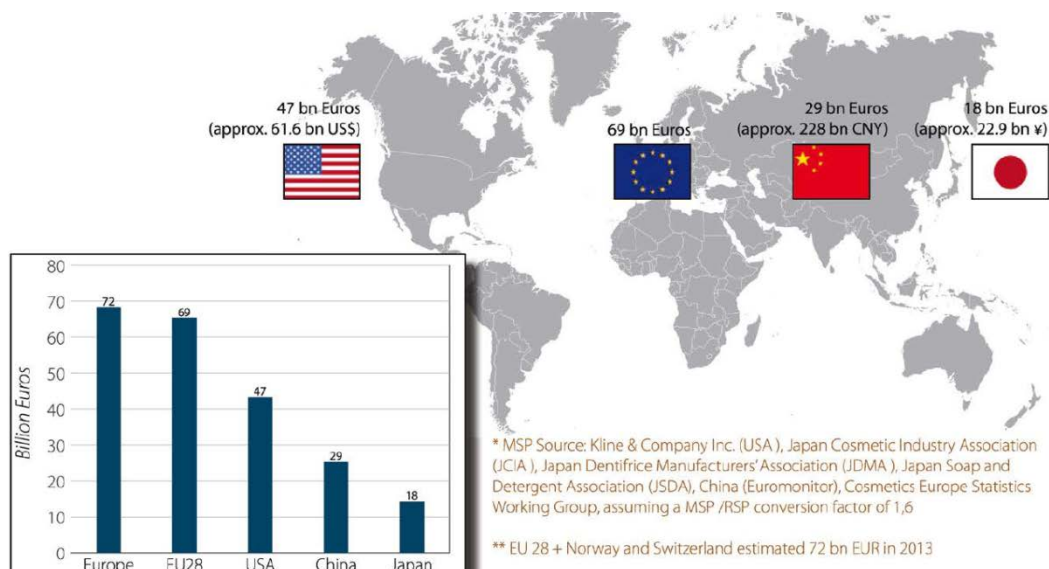
Urtea	Gertakaria	Nork?
1833	Anetol, borneol eta alkanforaren formula enpirikoa	Dumas
1834	Nitrobentzenoaren sintesia	Mitscherlich
1859	Pirolisi bidez aldehidoak sintetizatzea	Bertagnini
	Azido salizilikoa eskala handian prestatzea	Kolbe
1868	Kumarinaren sintesia	Perkin
1874	Guaiakoletik abiatuz bainilina sintetizatzea	Reimer eta Tiemann
1884	d-Limonenoa eta dipentenoa identifikatzea	Wallach (*)
1888	Musketa nitro-aromatikoak aurkitzea	Baur
	Lehen aldiz, konposatu baten usaimen-ataria determinatzea (etil merkaptanoarena)	Fischer y Penzoldt
1898	Zetona-musketa aurkitzea	Baur, Thurgau
1903	Aromatikotasunaren garapena	von Bayer (*)
1904	Muskona isolatzea	Walbaum
1919	Linaloola sintetizatzea	Ruzicka (*), Fomasir
1926	Muskonaren egitura identifikatzea	Ruzicka (*)
1926-28	Exaltone, civetone eta exaltolide sintetizatzea	Ruzicka (*)
1934	Muskonaren sintesia lortzea	Weber, Ziegler
1946	Terpenoideei aplikatutako isoprenoaren araua hobetzea	Robinson (*)
	Egitura kimikoaren eta usainaren arteko erlazioa	Pauling (*)
1949	Ambrox sintetizatzea	Stoll
1951	Phantolide sintetizatzea	Fuchs
1965	Galaxolide sintetizatzea	Beets
2001	Nirvanolide merkaturatzea	Givaudan S.A.

(*) Kimikako Nobel Saria jaso dutenak. Pauling-en kasuan izan ezik, besteen Nobel Saria lurrinen kimikarekin lotzen da.

Egun, industria kosmetikoaren sofistikazioa maila pentsaezinetara iritsi da, eta 3.000 osagai usaintsu baino gehiago ditu eskuragarri. Usaintsuak ez direnak kontuan hartuta, 10.000 edo gehiago izan daitezke. Gainera, negozioaren errentagarritasuna ukaezina da: 2013an, Europar Batasunean (EB-28) (Cosmetics Europe, 2013) 69 bilioi euroko bolumena lortu zuen merkatu horrek —72 bilioi Europa osoa kontuan hartzen bada, 47 bilioi Ameriketako Estatu Batuetan, 29 Txinan eta 18 Japonian— (1.3. Irudia).

1.2. Egungo araudia

Aipatu bezala, kosmetika mundu-mailako industria garrantzitsua da eta, lau merkatu handien batura 166 bilioi euro ingurukoa da. Ondorioz, beharrezkoa da produktu kosmetikoen eta produktu horietan dauden osagaien segurtasuna eta eraginkortasuna bermatuko duten tresnak garatzea. Tresna horiek, hainbat herrialdetan ezarri diren araudiak dira eta oraingoz, zoritxarrez, horien arteko harmonizazioa ez da oso estua. Ondorioz, kasu askotan produktu bera ezin da saldu merkatu guztietan konposizioa aldatu gabe. Atal honetan Europar Batasunean indarrean dagoen araudia aztertuko da, eta Estatu Batuetako eta Japoniako araudiari ere amaieran aipamen bat egingo da.



1.3. Irudia. Europako kosmetikoen merkatua 2013an. Irudia: Cosmetics Europe (Cosmetics Europe, 2013).

Europar Batasunari dagokionez, 2009ko abenduaren 22an Europar Batasuneko Aldizkari Ofizialean 1223/2009 araudia argitaratu zen (European Parliament and

European Council, 2009). Araudi horrek, aurretik ezarritakoak nabarmen aldatu zituen, bereziki ordura arte Kosmetikoen Zuzentarau zeritzon 76/768/EEC araudia (European Council, 1976). Azken zuzentarau horrek hobekuntza eta zuzenketa asko jasan zituen arren, 1223/2009 araudi berriak legedia asko sinplifikatu, harmonizatu eta argitu zuen.

1.2. Taula. Europar Batasuneko 1223/2009 araudiaren egitura (Mildau eta Huber, 2010).

Gaia	Artikuluak
Helburua, definizioak	1-2
Segurtasuna, erantzukizunak	3-9
Segurtasunaren ebaluazioa, produktuari buruzko informazioa, jakinarazpenak	10-13
Erabilpen-mugak	14-17
Animaliekin egindako esperimentazioa	18
Kontsumitzaileei zuzendutako informazioa	19-21
Merkaturatutako produktuen kontrola	22-24
Arau hausteen ingurukoak, babes-klausula	25-28
Administraritzarekin kooperazioa	29-30
Aplikazioari buruzko argibideak, azken xedapenak	31-40

Araudia 2013ko uztailaren 13an indarrean jartzekoa zen, artikulua konkretu batzuek beste data batzuk dituzten arren, eta beraz, gaur egun indarrean dagoena da. Zentzu horretan, araudiaren sarreraren 3. atalean jasotzen dira bere helburu garrantzitsuenak, hain zuzen ere, 1) terminologia eta prozedurak sinplifikatzea eta 2) Batasun guztian lege-baldintzak era uniformearen aplikatzea. Garrantzitsuak dira, bestalde, sarreraren egiten diren beste zenbait aipamen: ingurugiro-kutsaduraren eta osasun-segurtasunaren ingurukoak, besteak beste. Testuaren 40 artikuluen laburpena 1.2. taulan dago ikusgai, artikulua antolatuta.

Kosmetikoen Zuzentarauarekin alderatuz gero, aldaketa asko eta garrantzi handikoak ditu araudi berriak. Produktu kosmetikoen definizioa, 1223/2009 araudiaren arabera, hauex da: gorputzaren kanpoko atalak, hortzak edo ahoko mukosak garbitzeko, perfumatzeko, itxura aldatzeko, babesteko, ondo mantentzeko edo gorputzaren usaina hobetzeko horiekin kontaktuan egongo den edozein substantzia edo nahaste. Era berean, *substantzia* hitzarekin edozein elementu kimiko edo konposatu natural izendatzeko erabiltzen da, alegia, produktu kosmetikoen osagaiak izendatzeko. Beste definizio batzuk ere era argian azaltzen dira 3. artikuluan.

Produktu kosmetikoen segurtasunari dagokionez, kontzeptu aldaketa interesgarria dakar 1223/2009 araudiak, nabarmen zorrotzagoa baita zentzu horretan. 1976ko zuzentarauak kosmetikoak osasunarentzat kaltegarriak ez zutela izan behar esaten zuen, baina, arau berriaren arabera produktuak seguruak direla ziurtatu behar da. Ildo horretatik, araudia zorrotzagoa da produktu bat merkaturatu aurretik eman beharreko pausoekin eta *pertsona erantzule*

kontzeptua definitzen da. *Pertsona erantzule*-rik gabe —pertsona juridiko zein fisikoa izan daitekeena— ezin dira produktu kosmetikoak merkaturatu, eta pertsona horien betebeharrak zehatz-mehatz kontrolatuta daude (1.4. Irudia). Horri buruzko analisi sakonagoa bibliografian aurki daiteke (Mildau eta Huber, 2010).

Kosmetikoen segurtasunari dagokionez —araudiaren 3. kapitulu zehazten dena—, aurreko zuzentarauean baino askoz era xehatuagoan azaltzen da, eta baita segurtasunaren ebaluazioari dagokion atala ere. Araudian zerrendatuta dauden onartutako konposatuez gain, ondorio kaltegarriak sor ditzaketen osagai buruz berri ematea behartzen du eta, erantzule direnak informazio hori Europar Batasuneko kide guztiekin partekatu behar dute. Gainera, koloratzaile, ultramore-iragazki eta kontserbagarri berrien kasuan, espreski onartu behar dira kosmetikoetan erabili ahal izateko. Araudiaren 3. kapitulu zehazten den ebaluazioari buruzko xehetasunak aipatzen dira, esaterako, ebaluazio-mekanismoak, produktuei buruz eman beharreko informazioa eta erantzuleak jakinarazi behar dituen datu guztiak —kosmetiko mota, jatorrizko herrialdea, arriskutsuak izan daitezkeen osagaien zerrenda, eta abar luze bat—.

1223/2009 araudiaren 4. kapitulu da, zalantzarik gabe, interes analitiko handiena duena, izan ere, bertan kosmetikoetan erabili ezin diren edo erabilpen mugatua duten substantziak sailkatzen dira. Zentzu horretan, substantzia orokorrez gain, beste hiru konposatu talde arautzen dira: koloratzaileak, kontserbagarriak eta ultramore-iragazkiak. Koloratzaileak, produktu kosmetikoari kolorea emateko erabiltzen diren substantziak dira. Oxidazioz ileari kolorea emateko erabiltzen diren koloratzaileen aitzindariak ere koloratzaileen taldean sailkatzen dira. Ultramore-iragazkiak, erradiazio ultramore (UV) xurgatuz, islatuz edo sakabanatuz azala erradiazio ultramoretik babesteko helburua duten konposatuak dira. Azkenik, kontserbagarriak produktu kosmetikoan gerta daitezkeen mikroorganismoen garapena inhibitzea helburu duten substantziak dira.

Behin hiru konposatu talde horiek definituta, Europako araudiak ezartzen dituen mugak aztertuko dira jarraian. Alde batetik, araudiaren II eranskinean debekatutako substantzien zerrenda agertzen da: konposatu horiek ezin dira inola ere produktu kosmetikoen osagai gisa erabili. Bestetik, III eranskinean erabilpen mugatua duten konposatuen zerrenda azaltzen da. Osagai horien kasuan, kosmetikoetan erabil daitezke baina, edozein kasutan, eranskinean aipatzen diren baldintzak beteta.

Aipatutako baldintza horiek kontzentrazio maximoari, produktu motari edo produktuaren etiketari buruzkoa izan daitezke, besteak beste. Adibidez, azido oxalikoa eta bere esterrak eta gatz alkalinoak eranskin horretan daude, eta substantzia horien kontzentrazio maximoa %5 dela dio araudiak, gainera, substantziaren erabilpena ere mugatzen du, esparru profesionalean salduko diren kosmetikoetara mugatzen duelako —kasu horretan, ilerako produktu profesionaletaz ari da—.



1.4. **Irudia.** Europako Batzordeak 1223/2009 araudia azaltzeko erabili zuen infografia, atalik garrantzitsuenak aurreko zuzentarauarekin alderatuz. Irudia: Europako Batzordea.

Koloratzaileei dagokienez, IV eranskinean daudenak bakarrik ager daitezke kosmetikoetan eta gainera, muga batzuk ere ezartzen dira zenbait kasutan. V eranskinean, antzeko zerbait egiten da kontserbatzaileekin eta, azkenik, VI eranskinean onartutako UV-iragazkien zerrenda dago, horien mugak eta erabilpen-baldintzak finkatzen direlarik. Aipatutakoaren laburpena 1.3. taulan jaso da.

1.3. Taula. Europar Batasuneko 1223/2009 araudiaren substantzien sailkapena eta eranskinak.

Substantziak	Eranskina
Debekatutako substantziak	II
Mugak dituzten substantziak	III
Koloratzaileak	IV
Kontserbagarriak	V
UV-iragazkiak	VI

Osagai horietaz gainera, 15. artikuluan substantzia kartzinogenoak, mutagenikoak edo ugalketarentzat toxikoak direnak (CMR, *Carcinogenic, Mutagenic or toxic for Reproduction*) debekatu egiten dira edo horietako batzuei mugak jartzen zaizkie. CMR substantzia horiek, Europar Batasuneko beste araudi batean jasota daude (European Parliament and European Council, 2008). Era berean, artikulua horren 4. atalean sistema endokrinoa alda dezaketen substantziei buruz esaten da irizpide komunitarioak edo internazionalak daudenean Batzordeak horien araudia berrikusiko duela eta beranduenera jota, 2015eko urtarrilaren 11ean izango dela. Amaitzeko, 1223/2009 araudiaren 16. artikulua aipatu behar da, bertan produktu kosmetikoetan erabiltzen diren nanomaterialei buruzko arauak ezartzen baitira.

Beste herrialdeetako araudiei gainbegiratu bat ematearren, beste kosmetika merkatu nagusia aipatuko da, alegia, Ameriketako Estatu Batuetakoa. AEBn, kosmetikoei buruzko araudia FDAREN (*Food and Drug Administration*) esku dago. Kosmetikoen definizioa 1938ko *Federal Food, Drugs & Cosmetics Act* araudian aurki daiteke (United States Congress, 1938) eta, bidez batez, esan behar da 1938tik produktu kosmetikoen definizioak aldaketa gutxi jasan dituela. Dena den, legeak jasan dituen aldaketa guztiak FDAREN webgunean irakur daitezke (Food and Drug Administration, 2014). Europako Batasunean gertatzen den bezala, AEBetan FDAk arautzen du kosmetikoen segurtasuna, produktuen etiketak nolakoak izan behar duten ezartzen du eta kosmetikoei buruzko legeak proposatzen ditu. Hori guztia *Centre for Food Safety and Applied Nutrition* (CFSAN) sailaren bidez egiten da. Lege eta arau berriak proposatzerakoan, FDAk kontuan hartzen ditu produktu kosmetikoen analisisien ondorioak eta baita substantzia berriei dagozkienak ere. Mundu mailako beste araudiei buruzko xehetasunak, adibidez, Japoniakoak, Australiakoak, Kanadakoak, Txinakoak,

Errusiakoak eta abarretakoak bibliografian aurki daitezke (Gagliardi eta Dorato, 2007)

1.3. Kalitate-kontrola

Aurreko azpiatalean aztertutako araudiaren arabera —eta gauza bera esan daiteke beste herrialdeetako legediari buruz—, produktu kosmetikoek hiru baldintza nagusi bete behar dituzte eta baldintza horiek era zorrotzean ebaluatu behar dira, alegia, produktuaren segurtasuna, eraginkortasuna eta kalitatea. Aipatu den bezala, 1223/2009 araudiak kosmetiko-fabrikatzaileei eskatzen die informazio osoa izatea produktuaren, eta produktuan dauden osagaien, segurtasunari buruz.

Amaitutako kosmetikoaren segurtasunari dagokion informazioa lortzeko, azken produktu hori azter daiteke edo kosmetikoan dauden substantzien propietateetatik ondoriozta daiteke, esaterako, informazio toxikologikoa, sentikortasunari buruzkoa, substantziek sor ditzaketan alergiei buruzkoak, eta abar erabilia. Horretaz gain, zenbaitetan froga gehiago beharrezkoak izaten dira kosmetikoak sor ditzakeen albo-ondorioak detektatzeko (Fernández de Córdova Manent eta González Abellán, 2007; Nohynek *et al.*, 2010).

Produktu kosmetikoaren eraginkortasunari dagokionez, fabrikatzaileak etiketan aipatzen dituen efektu onak edo bilatzen diren ondorioak egiazkoak direla ziurtatzen duten datuak izatera behartuta dago. Froga horiek lortzeko hainbat saiakuntza egin behar ditu fabrikatzaileak, esaterako, analisi sentSORIALA, elastikotasun analisiak, reologia-frogak eta beste hainbat froga biometriko. Bestalde, froga horiek ez dira bakarrik kosmetikoan aztertzeakoak, horretaz gain, produktuaren ohiko erabilpenean ere eraginkorra dela egiaztatu behar da: azalean izan ditzakeen ondorioak, alergiarik sor dezakeen, eta abar.

Hirugarren puntu garrantzitsua produktuaren kalitatea bermatzea da. Alde batetik, produktuaren kalitate akatsak nabarmenak direnean, kontsumitzaileak ez ditu erabiltzen, adibidez, kosmetikoak usain txarra duenean edo faseak banatuta daudenean. Bestetik, kalitate akatsek eragin nabarmendik ez izatea gerta daiteke, baina, hala ere arriskutsua izatea. Demagun adibidez, eguzki-krema baten etiketa oker dagoela eta eguzki-izpiekiko ematen duen babesa ez dela kontsumitzaileak nahi duena, edo alergia sor dezakeen osagai bat etiketan ez dela azaltzen eta ondorioz kontsumitzaileari osasun arazoak sortzen dizkiola. Hori guztia saihesteko, produktuen kalitatea kontrolatzea ezinbestekoa da (Chiari *et al.*, 2012).

Produktu kosmetikoen kalitate-kontrola oso garrantzitsua da, beraz. Kosmetikoen kalitate-kontrola era egokian gauzatzeko —segurtasuna, eraginkortasuna eta kalitatea era egokian ebaluatzeko, alegia— beharrezkoa da prozedura analitiko, kimiko, fisikokimiko, biologiko eta mikrobiologiko egokiak

erabiltzea ekoizpen-prozesu guztian zehar (Fernández de Córdoba Manent eta González Abellán, 2007). Horretarako, metodoen doitasuna eta zehaztasuna —ingelesez *precision* eta *accuracy*, hurrenez hurren— ezaguna izan behar da eta, gainera, metodoak aldatu egin behar dira ikerkuntza berriak egiten diren heinean.

1.4. Kosmetikoen osagaiak eta analisisa: ikuspegi orokorra

Kosmetikoetan presente dauden osagaien kuantifikazioa oinarritzko atala da kalitate-kontrollean. Europar Batasuneko, Estatu Batuetako eta Japoniako legedien alde garrantzitsuenetakoa da kontsumitzaileen osasuna babestea eta, logikoki, araudietan jasota dago produktu kosmetikoek osasunarentzat ezin direla kaltegarriak izan. Zentzu horretan —1223/2009 araudiari erreparatu ezker— fabrikatzaileek produktu kosmetikoak seguruak izateko neurri guztiak beraien gain hartu behar dituzte. Horretaz gain, jakina, agintari eskudunek araudia betzen dela egiaztatuko duten kontrol mekanismoak izan behar dituzte, adibidez, II eranskinean dauden debekatutako substantziak produktu kosmetikoetan agertzen diren edo ez baieztatatzeko sistemak beharrezkoak dira, eta III eranskinean ezarritako erabilpen mugak —kontzentrazio maximoak, esaterako— egoki betetzen diren ziurtatu behar da. Araudiari eta bere eranskinei dagokienez, hiru osagai mota aztertu behar dira metodo analitikoak garatzerakoan.

Alde batetik, debekatuta dauden substantziak daude. Araudiak konposatu horien aztarnak egotea bakarrik baimentzen du, horien presentzia teknologikoki saihetsezina den kasuetan izan ezik —literalki: *prohibited substances should be acceptable at trace levels only if they are technologically inevitable with correct manufacturing processes and provided that the product is safe*—.

Reference number	Substance identification				Restrictions		
	Chemical name/INN	Name of Common Ingredients Glossary	CAS number	EC number	Product type, body parts	Maximum concentration in ready for use preparation	Other
a	b	c	d	e	f	g	h
71	Phenol, 2-methoxy-4-(2-propenyl)	Eugenol	97-53-0	202-589-1			The presence of the substance must be indicated in the list of ingredients referred to in Article 19(1)(g) when its concentration exceeds: <ul style="list-style-type: none"> — 0.001 % in leave-on products — 0.01 % in rinse-off products

1.5. Irudia. Adibide moduan, araudian eugenol lurin alergenari buruzko informazioa eta erabilpen mugak. Irudia: European Parliament and European Council, 2009.

Bestetik, erabilpen mugatua duten konposatuak daude. Horiek, lehenago aipatu den bezala, kontzentrazio zein erabilpen baldintza jakin batzuk bete behar dituzte. Talde horren barruan, konposatu talde interesgarria aipatu behar da, alegia, potentzialki alergenokoak diren substantziak (PAS, *Potentially Allergenic Substances*). Substantzia horiei lurrin alergenokoak (*allergenic fragrances*) ere deritze bibliografian, izan ere, konposatu talde horretan dauden substantzia gehienak lurrin moduan erabiltzen dira kosmetikoetan. Lurrin alergenoko horiek alergiak sor ditzaketan 26 konposatu dira, III eranskinean daudenak. 26 PASen zerrenda 2003an ezagutarazi zen (European Parliament and European Council, 2003), eta orduz gero interes bereziko konposatuak izan dira (López-Nogueroles *et al.*, 2014). Substantzia horiek etiketan identifikatuta egon behar dira kontzentrazioa %0,001 baino handiago bada kosmetiko iraunkorren kasuan (*leave-on products*) eta %0,01 baino handiagoa bada eliminatzeak diren produktu kosmetikoen kasuan (*rinse-off products*) (1.5. Irudia). Dena den, PASak 3. kapituluan aztertuko dira xehetasun gehiagorekin. Alergenoko horien edo orokorrean erabilpen muga duten osagaien kasuan, agintariak araudia betetzen den erabakitzeko metodo analitikoak izan behar dituzte.

Azkenik, zerrendatze-positiboko substantziak aipatu behar dira, alegia, osagai bezala erabili ahal izateko araudiaren eranskinean azaldu behar diren substantziak. Helburu zehatz eta konkretuak izaten dituzte eta lehenago ere aipatu dira: koloratzaileak, kontserbagarriak eta UV-iragazkiak. Konposatu horiek, kasu gehienetan, erabilpen mugak izaten dituzte kontzentrazioari dagokionez eta, hortaz, onartutako kontzentrazioetik gora ez direla erabiltzen baieztatu behar da.

Hiru osagai talde horietaz gain, kosmetikoen araudian jasota ez dauden beste zenbait konposatu kuantifikatzeko interesa izan ohi dute agintari eskudunek, hala nola, 1) etiketan aipatutako beste substantzien presentzia, 2) etanol kontzentrazioa —zerga edo erlijio arrazoiak direla-eta, zenbait herrialdetan kontrolatu egiten da— eta 3) kosmetikoei buruzko araudietan aipatzen ez diren arren bestelako legediak debekatzen edo mugatzen dituen konposatuak (Gagliardi *et al.*, 2007). Europar Batasunean, 1976ko kosmetikoen zuzentaraua indarrean jarri ondoren, Batasuneko agintariak eta kosmetika industriaren COLIPA (*Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association*) elkarteak —bide batez, elkarteak egun *Cosmetics Europe* izena duela aipatu behar da— kosmetikoak analizatzeko metodoak garatzen hasi zen. Metodo analitikoari buruzko lehen zuzentaraua 1980an ezagutarazi zen eta beranduago beste hainbat argitaratu ziren. Metodo analitiko ofizialei buruzko berrikuspena 1999an argitaratu zen (European Commission, 1999). Argitaratutako metodo ofizialak 38 dira eta 60 osagai inguru determinatzeko balio dute. Produktu kosmetikoetan erabiltzen diren lehengaiak 10.000 baino gehiago izan daitezkeela kontuan hartuta, deskribatutako metodo ofizial kopurua oso urria dela ukaezina da (Gagliardi *et al.*, 2007). Ondorioz,

metodo ofizial horietaz gain, badira literatura zientifikoan argitaratutako beste hainbat metodo analitiko kosmetikoak aztertzeko. Metodo analitiko horiek fidagarriak izan daitezten, hainbat baldintza aztertu behar dira —aurrerago sakonago aztertuko direnak—, besteak beste, espezifikotasuna, zehaztasuna, doitasuna, linealtasuna, sentsibilitatea eta selektibitatea (Food and Drug Administration, 1996; Valcárcel, 2000).

Kosmetikoen analisiari dagokionez, kontuan hartu behar da horiek lagin konplexuak izaten direla eta substantzia askoz osatuta daudela. Bestalde, metodo analitiko egoki bat garatu nahi bada, konposatu kopuru handia aldi berean kuantifikatzeko gai izan behar da eta, jakina, aztertu beharreko lagin kopurua handia izaten da. Bereziki azken arazo horri aurre egingo dion metodoa garatu nahi denean, kontuan hartu behar da metodoaren automatizazio maila, sinpletasuna, erreaktibo kontsumoa eta horien toxikotasuna.

Literaturan argitaratutako metodoen helburuak laginen aurretratatamenduak hobetzea, teknika instrumental berriak aplikatzea eta erreaktibo toxikoen erabilera murriztuko duten metodo analitiko *berdeak* garatzea izan ohi dira. Kapitulu honi amaiera emateko, kosmetikoen analisiari ikuspegi orokorra emango zaio eta, hurrengo kapituluetan substantzia mota garrantzitsuenen analisi zorrotzagoa egingo da. 1980-2006 urteen tartean egindako analisi bibliografikoaren arabera (Salvador *et al.*, 2007) hiru produktu mota aztertuenak ilerako produktuak, hortzak edo ahoa zaintzeko produktuak eta azalerako produktuak ziren, %18, %14 eta %9 inguruko ehunekoekin, hurrenez hurren. 2007-2014 tarteari dagokionez, eta 1223/2009 araudian egindako produktuen sailkapenean oinarrituta (1.4. Taula), literatura zientifikoan gehien analizatutako produktuak ilerako produktuak, azalerako produktuak eta hortzak edo ahoa zaintzeko produktuak izaten jarraitzen dute, %35, %21 eta %19 portzentaiekin, hurrenez hurren.

1.4. Taula. Europar Batasuneko 1223/2009 araudiaren araberako produktu kosmetikoen sailkapena.

Iraupen iraunkorrekoak
 Eliminatzeakoak (kontaktu mugatukoak)
 Ilerako produktuak
 Azalerako produktuak
 Ezpainetarako produktuak
 Aurpegirako produktuak
 Azkazaletan aplikatzeko produktuak
 Ahoan aplikatzeko produktuak
 Mukosa-menbranetan aplikatzeko produktuak
 Begietarako produktuak

Aztertutako analito motei dagokienez, jakina, aurrez aipatutako konposatu taldeak dira gehien aztertu direnak, besteak beste, UV-iragazkiak

—bentzofenonak, nagusiki—, koloratzaileak, kontserbagarriak —parabenoak eta formaldehidoa, nagusiki—, lurrinak —aipatutako PAS konposatuak eta musketak— eta surfaktanteak (Salvador *et al.*, 2007). Konposatu horiek aztertzeo bibliografian erabili diren metodo analitikoaren inguruan, bi alderdi azertu behar dira.

Alde batetik, laginaren prestaketari dagokionez, hainbat metodo erabili dira kosmetiko-matrize konplexuak tratatzeko. Horien artean, erabilienak fase solidoko erauzketa, likido-likido erauzketa eta distilazioa izan ziren 1980-2006 urteen tartean (Salvador *et al.*, 2007). Azken urteotan ere laginen aurretratamendurako teknika berri asko deskribatu dira bibliografian MSPD (*Matrix Solid-Phase Dispersion*), D-SPE (*Dispersive Micro-Solid-Phase Extraction*), SPME (*Solid-Phase Microextraction*), SBSE (*Stir Bar Sorptive Extraction*), SFE (*Supercritical Fluid Extraction*), PLE (*Pressurized Liquid Extraction*) eta abar (Cabaleiro *et al.*, 2014). Aurretratamendu teknikez gain, analisirako erabiliko den teknikaren arabera erreakzio kimikoak gauzatzea beharrezkoa da konposatuak aztertzeo, esaterako fluoreszentsia erabili behar denean konposatu fluoreszente bat gehitu behar zaio analitoari edo, gas-kromatografiaren kasuan, deribatizazio erreakzioak egin behar izaten dira zenbaitetan.

Bestetik, kosmetikoen osagaiak aztertzeo erabilitako teknika analitiko instrumentalei dagokienez (Salvador *et al.*, 2007), zalantzarik gabe teknika kromatografikoak dira erabilienak —gas-kromatografia eta likido-kromatografia, nagusiki—. Metodoen %70a, gutxi gorabehera, kromatografian edo antzeko tekniketan oinarritzen dira eta, bigarren teknikarik ugariena espektroskopia molekularra da —%15 inguruko portzentaiarekin—. Teknika kromatografikoei eutsiz, 1980-2006 tartean metodo kromatografikoen %38a likido-kromatografian oinarritzen zen, %16a gas-kromatografian eta %6a elektroforesi kapilarrean —hiru horien artean, beraz, metodoen %60a suposatzen zuten—. 2007-2014 urteen artean, aldiz, hiru teknika horien erabilpena aldatu egin da eta, kosmetikoen analisia hiru horietako teknikaren batekin egiten denean, %39an likido-kromatografia erabiltzen da, %33an gas-kromatografia eta %28an elektroforesi kapilarra. Kosmetikoen analisiari buruzko ikuspegi orokorra aztertzeo irakurleak bibliografia espezializatura jo dezake (Philippsborn, 2000; Anselmi *et al.*, 2004; Salvador eta Chisvert, 2007).

1.5. Kosmetikoen osagaiak: lurrinak eta lurringintza

Perfumeak ehundaka konposatu kimiko aromatiko osatuta egon daitezke, eta testu honetan osagai horiei lurrin deituko zaie aurrerantzean —literatura ingelesean erabiltzen diren *perfume* eta *fragrance* bereizteko—. Lurrin asko kontzentrazio oso txikietan bakarrik egoten dira, baina beraien arteko efektu

sinergikoaren ondorioz, osagai guztiek beren ezaugarri bereziak izaten dituzte. Hori nabarmena da hainbat lurrin dituen perfume baten usain-pertzepzioan. Bestalde, hainbat lurrinez osatutako perfumeak egoten dira kosmetikoetan, kosmetiko horiek kontsumitzailearentzat atseginak izan daitezten. Zenbaitetan, perfumearen helburua kosmetikoan dauden beste osagaien usain txarrak estaltzea izaten da.

Esan bezala, perfumeak egiteko erabiltzen diren lehengai aromatikoak lurrinak dira eta, horiek gutxitan izaten dira konposatu kimiko puruak. Alegia, lurringileek lurrinak konbinatzen dituzte perfumeak sortzeko eta, horretarako, perfume hori non eta zertarako erabiliko den ezagutu behar du. Horretaz gain, originaltasuna eta moda ere faktore garrantzitsuak izan ohi dira. Kosmetikoak duen perfume kontzentrazioaren arabera, kosmetiko horiek izen desberdinak dituzte (1.5. Taula). Alde batetik, perfume kontzentrazio handiena dutenak lurrin finak dira —%1 eta %18 arteko perfume kontzentraziokoak— eta perfumeen disoluzio hidroalkoholikoak dira. Bestetik, gainerako kosmetikoak daude, perfume kontzentrazio txikia izaten dutenak —%0,01 eta %1 artean— (Chisvert eta Salvador, 2007).

Perfumeak bi talde handitan sailka daitezke jatorriaren arabera, alde batetik jatorria naturan duten perfumeak —animalietatik edo landareetatik lortzen direnak— eta, bestetik, perfume sintetikoak bereiz daitezke, alegia, laborategian sintetizatutako konposatuak dituztenak. Aurrerantzean, zentzu horrekin erabiliko dira natural/sintetiko terminoak, alegia, konposatuen jatorria adierazteko eta ez, jakina, hitz horiek on/txar terminoekin lotzeko. Esan beharrik ez dago bi jatorriak dituzten konposatuak badaudela eta kasu horietan ez dela beharrezkoa bereiztea jatorria zein den.

1.5. Taula. Kosmetikoen sailkapena perfume edukiaren arabera (Chisvert eta Salvador, 2007).

Produktu kosmetikoa	Perfume edukia (%)
Lurrin finak	
-Haurtxoentzako kolonia	1-2
- <i>Kolonia</i>	2-3
- <i>Eau de cologne</i>	3-4
- <i>Eau Fraiche</i>	4-5
- <i>Eau de Toilet</i>	5-8
- <i>Eau de Parfum</i>	8-12
- <i>Parfum</i>	12-18
Azala zaintzeko produktuak	0,01-0,5
Ilea zaintzeko produktuak	0,01-1
Bainurako kosmetikoak	0,1-3
Hortzetako pastak	0,5-1

Jatorri naturala duten lurrinak asko dira eta antzinetik erabili dira perfumeak egiteko. Talde garrantzitsuenetako bat olio esentzialak dira eta landare jatorria dute. Landareen hainbat ataletatik lortzen dira horrelakoak, esaterako, loreetatik —jasmína, arrosa, gardenia—, fruituetatik —limoia, laranja, banilla—, egurretik —sandaloa, zedroa—, azaletik —kanela, intxaur muskatua—, erretxinatik —galbanoa, tolua, benjuia— eta landare osotik —izpilikua (1.6. Irudia), geranioa—.

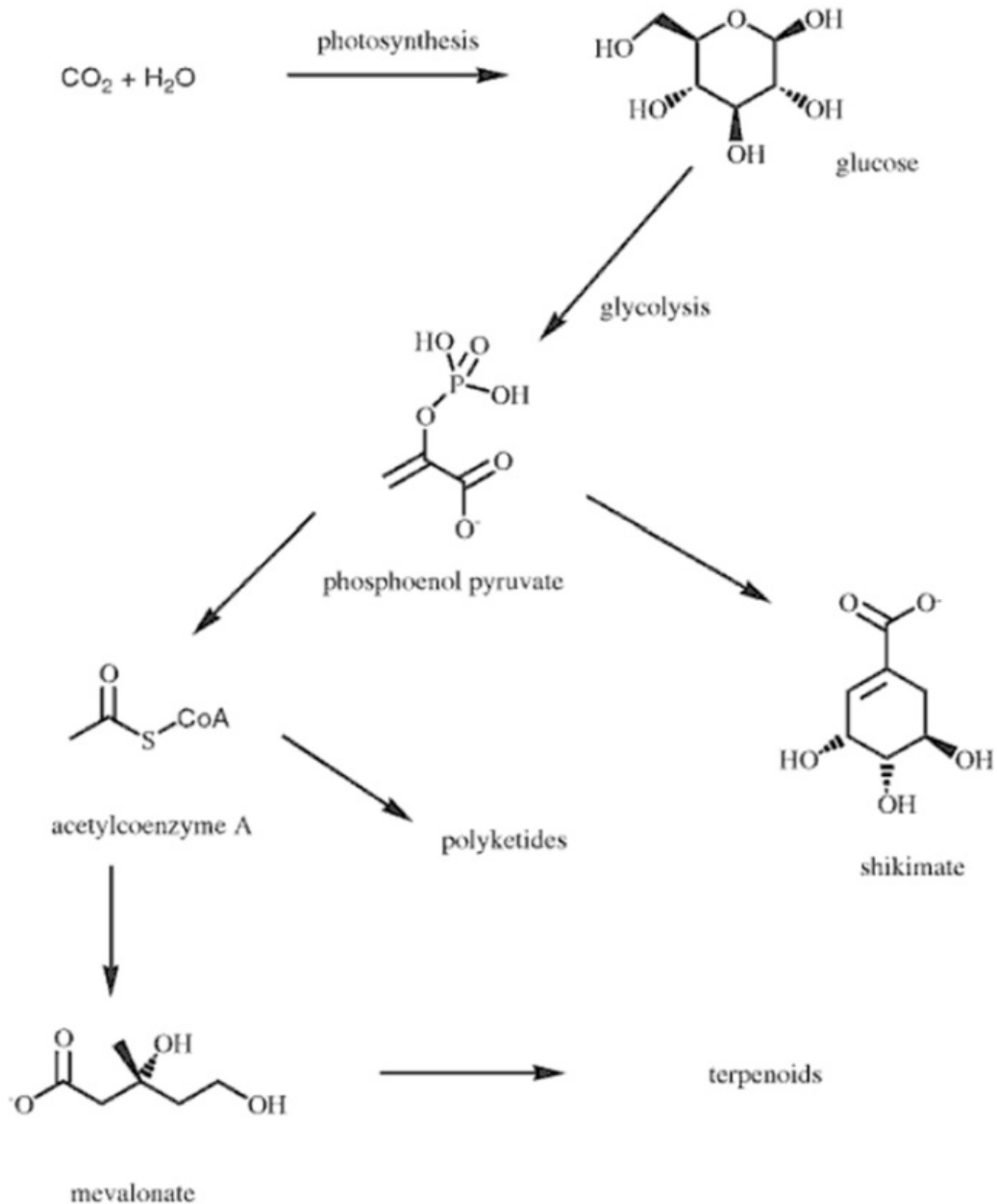


1.6. Irudia. Izpilikua (*Lavender* sp.) soroa.

Lurrin naturalak animalien guruinetatik eta organoetatik ere lor daitezke eta hori da, hain zuzen ere, orein musketadunaren guruinetatik erauzten den musketaren kasua, bide batez, aurrerago aztertuko dena. Beste adibide ezagun bat zibetaren kasua da. Zibeta, izen bera duen animaliaaren uzkitik erauzten da. Badira beste zenbait adibide gehiago ere, adibidez, anbar arrea eta kastoreoa, kaxalotetik eta kastoretik lortzen direnak, hurrenez hurren (Theimer, 1982; Sell, 2006a). Naturan hainbeste usain mota desberdin aurkitzea ulergarria da usaimenaren garrantzia kontuan hartzen badugu. Animalia askok usaimena erabiltzen dute elikagaiak bilatu edo horien kalitatea kontrolatzeko, eta baita komunikatzeko ere (Sell, 2006a). Dena den, naturan aurki daitezkeen lurrin guzti horietatik, lurringintzarentzat interesgarrienak biosintesiaren ondorioz ekoizten diren metabolito sekundarioak dira. Hiru talde garrantzitsuenak terpenoideak, sikimatoak eta poliketidoak dira (1.7. Irudia). Irakurleak bibliografian aurki dezake terpenoideei (Sell, 2003) eta lurrin naturalen biogenesiari (Mann *et al*, 1994) buruzko analisi zorrotzagoa.

Aipatutako konposatuak olio esentzialetan egon ohi dira eta, horiek beren matrizeetatik erauzi behar dira lurringintzako osagai bezala erabili ahal izateko.

Horretarako, badira hainbat erauzketa-teknika, produktu naturalaren ezaugarri fisikokimikoen arabera aukeratu behar dena. Bestalde, kontuan izan behar da erauzketa-teknikak neurri handian eragina duela lurrinaren kalitatean. Jarraian teknika horietako batzuk laburki deskribatuko dira (Da Costa eta Eri, 2005; Sell, 2006a; Chisvert eta Salvador, 2007).



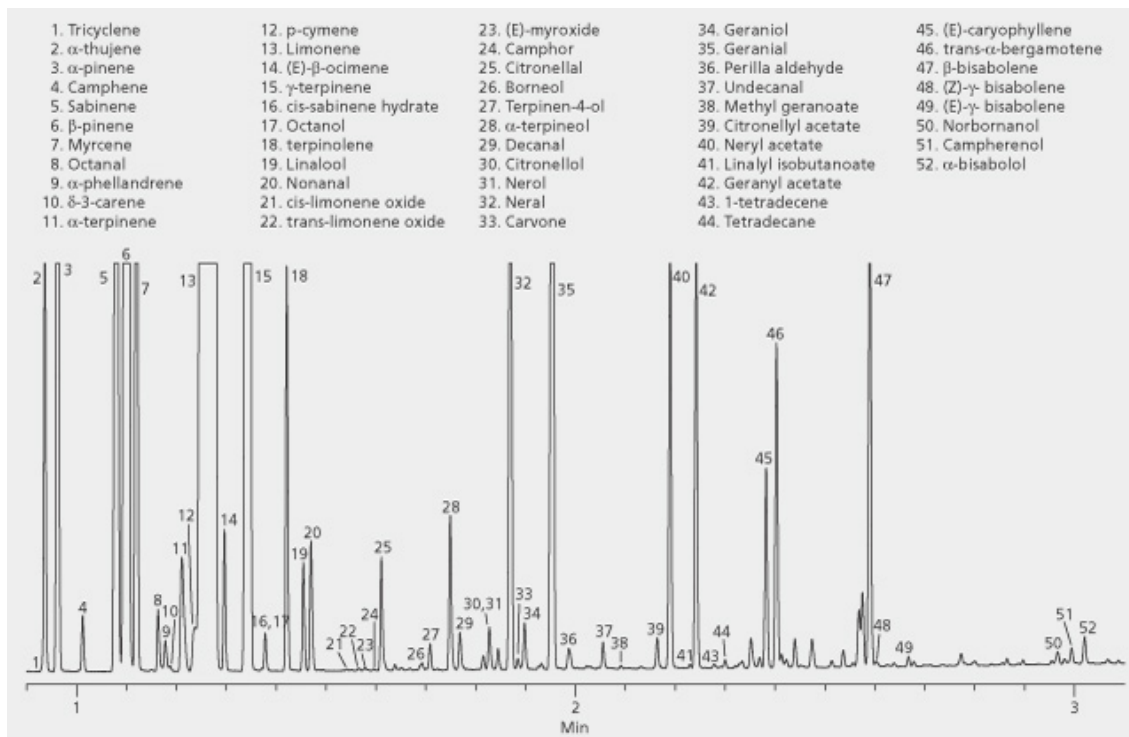
1.7. Irudia. Terpenoideen, sikimatoen eta poliketidoen bide metabolikoa. Irudia: Sell, 2006a.

(1) Konpresioa: Teknikarik sinpleena da eta normalean zuhaitzen azaletan dauden olioak erauzteko erabiltzen da. Arrabolen bidez presio fisikoa aplikatzean oinarritzen da.

(2) Disolbatzaileen bidezko erauzketa: Animalia- edo landare-matrizetik konposatuak erauzteko erabiltzen da, hexanoa, eterra, metanola edo etanola disolbatzaile moduan erabiliz. Erauzketa motak asko dira, esaterako, Soxhlet erauzketa, *enfleurage* delakoa eta beratzea.

(3) Distilazioa: Era askotara egin daitekeen arren, sinpleena hidrodistilazioa da, alegia, uretan disolbatutako produktu naturala distilatu eta distilatua jasoz. Ondoren distilatuaren beste erauzketa pauso bat egin behar izaten da.

Jatorri sintetikoa duten lurrinen kasuan, bi mota bereizten dira. Alde batetik, naturan aurkitzen den lurrin baten usaina oso preziatua denean, baina, ekoizpena urria denean, konposatu hori edo antzeko usaina duen sustantzia bat laborategian sintetizatzeke ahaleginak egiten dira. Hori da, hain zuzen ere, musketaren edo anbar arrearen kasua, izan ere, XX. mendetik aurrera ezinezko bihurtu zen kontsumitzaileen eskaera handiak asetzea jatorri naturaleko konposatuekin bakarrik —musketaren kasua hurrengo kapituluan aztertuko da sakonago—. Gainera, osagai sintetikoen abantailarik handiena ekoizpen-prozesua merkeago izatea da, eta produktuaren homogeneotasuna bermatu ahal izatea. Beste alde batetik, kimika sintetikoaren beste aukera konposatu berriak sortzeko ahalmena da. Kasu horietan, helburua ez da naturan dagoen usain jakin bat errepikatzea, baizik eta usain edo molekula usaintsu berriak egitea.



1.8. Irudia. Limoiares olio esentzialaren kromatograma, *Fast-GC* teknika erabiliz lortua. Irudia: Mondello *et al.*, 2003.

Ohikoena bigarren prozedura erabiltzea da, izan ere, naturako usainak errepikatzea oso zaila da. Kontuan izan behar da naturan aurki daitezkeen lehengaiak ez daudela konposatu kimiko gutxi batzuek osatuta. Olio esentzialak, esaterako, ehundaka edo milaka konposatu kimikoz osatuta daude (Scott, 2005). 1.8. Irudian limoiaren olio esentzialaren kromatograma ikus daiteke, bere konplexutasunaren adibide gisa. Kimika sintetikoaren beste arazoetako bat, naturan aurkitzen diren konposatuen kiraltasuna da. Kiraltasuna oso garrantzitsua da zenbait kasutan, konposatu beraren bi isomero kiralek usain desberdina edo usaimen-atari desberdina izan dezaketelako. Adibidez, (4S)-(+)-karbonaren usaimen-ataria 600 ppb-koa (bilioikobeste, *parts per billion*) da airean eta mihilu usaina du, baina bere isomeroa den (4S)-(-)-karbonaren usaimen-ataria 43 ppb da airean eta menda usaina du (Leffingwell, 2014). Ezaugarri horien ondorioz, lurrinen sintesi kimikoa katalisi asimetrikoaren bidez egin behar izaten da, alegia, kiraltasuna kontrolatzen duen sintesia, edo bestela, isomeroak banatzeko teknikak erabili behar dira sintesiaren ondoren.

Lurringintzan erabiltzen diren lurrin sintetikoen sailkapena 1.6. taulan dago ikusgai. Taula osatzeko C. Sell-ek proposatutako irizpidea jarraitu da (Sell, 2006a), nahiz eta beste irizpide batzuen araberrako sailkapenak ere badauden (Theimer, 1982; Rowe, 2005). Taulan azaltzen diren lurrin talde garrantzitsuenak honako hauek dira:

- Terpenoen deribatuak eta terpenoideak: talde zabalena osatzen dute eta komunean dute isopreno unitatez —5 karbonoko unitatez— osatuta egotea. Bost terpenoide dira beste hainbat terpenoide osatzeko gakoa direnak, alegia, geraniol/nerola, linaloola, zitronelola, zitronelala eta zitrala. Terpenoide horiek eraldatuz lurringintzan erabiltzen diren osagai asko sintetiza daitezke. Konposatu horiek monoterpenoideak dira, hau da, bi isopreno unitate dituzte, eta trementinatik edo iturri petrokimikoetatik lortzen dira. 1.6. Taulan terpenoide garrantzitsuenak jaso dira.
- Musketak: lurrinen beste talde garrantzitsua da (Kraft, 2005a). Konposatu talde hori 2. kapitulan aztertuko da sakonago.
- Bentzenoaren deribatuak: garrantzitsuena 2-feniletanola da, arrosaren osagaietako bat. Hasiera batean etilen oxidoaren eta bentzenoaren arteko Friedel-Crafts adizioaren bidez sintetizatzen zen, baina, gaur egun metodo seguruagoak daude sintesi hori aurrera eramateko.
- Toluenoaren deribatuak: toluenoaren klorazioz edo oxidazioz lortzen diren bentzaldehidoa edo bentzil kloruroa beste zenbait lurrin sintetizatzekeo abiapuntuak dira.

- Fenolaren deribatuak: fenolaren alkilazioa edo alkil fenolen hidrogenazioa izaten da lehen pausoa.
- Beste lurrinak: naftalenoaren, konposatu alifatikoen, ziklopentanonaren eta ziklopentadienoaren deribatuak, besteak beste, talde horretan sailkatu dira.

1.6. Taula. Lurrinenen sailkapena.

Taldea	Azpitaldea	Adibideak
Terpenoen deribatuak eta terpenoideak	Hemiterpenoideak	Prenil azetatoa, prenil bentzoatoa
	Monoterpenoide aziklikoak	Geraniola/nerola, linaloola, zitronelola eta bere esterrak; mirzenola, dihidromirzenola
	Monoterpenoide ziklikoak	l-Mentola, l-karvona, α -terpineola, limonenoa
	Monoterpenoide biziklikoak	Kanfenoa, alkanforra, isoborneola, isobornil azetatoa
	Seskiterpenoideak	Geranilazetona, nerolidola, farnesola, bisabolola, α -farnesenoa
	Zedro-olioak	Zedrola, Zedrenoa, Lixetone, Vertofix
	Sanadalo-olioak	Santalolesa, terpenofenolak, Sandela, SandelN, Santalix, Santalidol
Musketak	Diterpenoideak	Abalyn, Hercolyn
	Anbar arrea	Ambreina, Amberlyn, Ambrox, Ambroxan
	Iononak eta antzekoak	Iononak, damaskonak, ironak
	Naturan daudenak	Muskona, zibetona
Bentzenoaren deribatuak	Nitroaromatikoak	Zetona musketa, xileno musketa
	Poliziklikoak	Tonalide, Galaxolide, Traseolide, Phantolide
	Makroziklikoak	Etilen brasilatoa, Exaltolide, Habanolide
	Aliziklikoak	Cyclomusk, Helvetolide, Romandolide
Toluenoaren deribatuak		2-Feniletanola eta bere deribatuak (esterrak eta azetalak), aldehido hidroznamikoak, Lilial, Lilistralis
		Rosyrane, Mefrosol, Phenoxanol
Fenolaren deribatuak		Difenil oxidoa, Ortholate, salizilatoaren esterrak, kumarina, anisaldehidoa, katekolaren deribatuak
Naftalenoaren deribatuak		Naftilmetilzetona, naftola
Besteak		δ -Dekalaktona, Frutonile, Beauvertate, cis-3-hexenola, 2-alkilidenziklopentanonak, Jasmacyclene

Perfume berri bat sortzerakoan, lurrin horien nahasketa aproposa egin behar da. Perfumeetan, hiru nota —edo hiru ukitu— bereizi behar dira, eta osagai bakoitzak bere kontribuzioa du. Goiko nota deritzonak, lehen 1-2 orduak irauten dituen usaina da eta konposatu lurrunkorrenei esker lortzen da. Erdiko nota tarteko lurrinkortasuna duten konposatuek osatzen dute, perfumearen izaera definitzen dute eta 6 orduko iraupena izaten du, gutxi gorabehera. Beheko nota, berriz, lurrinkortasun baxuena duten konposatuek ematen dute eta 6 ordu baino gehiago irauten du. Lurringitzaren gakoa hiru nota horien arteko oreka aurkitzea da eta, horretarako, garrantzitsuak dira bai lurrinak eta baita finkatzaileak eta aldatzaileak ere. Musketak, adibidez, finkatzaile funtzioa du, alegia, usaina emateaz gain beste lurrinen usaina iraunkorragoa izaten laguntzen du (Kraft, 2005b; Chisvert eta Salvador, 2007).

1.6. Usainen kimioerrezeptzioa

Perfumeen funtzioa eta garrantzia ulertzeko derrigor azaldu behar da usaimenaren mekanismo kimikoa. Usainen kimioerrezeptzioari buruzko atal hau literatura zientifikoan aurki daitekeenaren laburpena eta moldaketa da (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013).

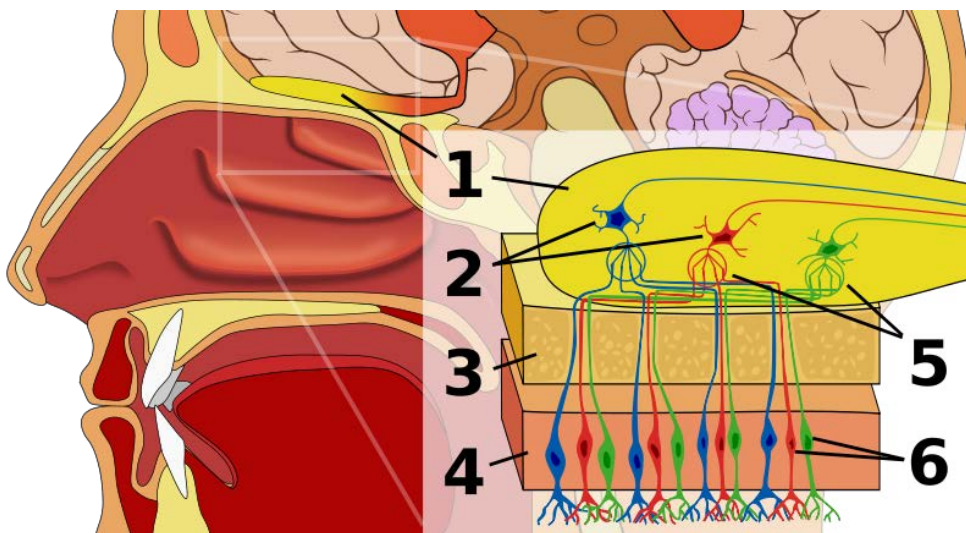
Bizidunok milaka urtez eboluzionatu ondoren inguratzen gaituen sistemari buruzko informazioa jasotzeko mekanismo konplexuak garatu ditugu: bost zentzumenak. Horietatik bi —usaimena eta dastamena— zentzumen kimikoak dira, datu kimikoak jasotzen dituztelako. Ingurunean dauden molekulek organismoan ditugun errezeptoreak —kimioerrezeptoreak— aktibatzen dituzte, eta integratuta ditugun mekanismoen bidez kanpo-estimulu kimikoak informazio ulergarri bihurtzen dira. Organismo primitiboek ere badituzte informazio kimikoa jasotzeko mekanismo arkaikoak eta, ziur asko, zentzumen horiek garatu ziren azkarren. Dударik gabe, inguruneari buruz eta ingurunean gertatzen diren aldaketei buruz informazioa jasotzeko mekanismo eraginkorrak dituen espezieak, bizirik irauteko aukera gehiago ditu tresna hori ez dutenekin alderatuz gero. Ondorioz, naturak —hautespen naturala eta eboluzioa medio—, kimioerrezeptzio mekanismoak garatu, egokitu eta findu ditu: horietako bat usaimena da (Sell, 2006b).

Espezie gehienek zentzumen kimikoak dituzte informazio-iturri nagusi gisa. Arau orokor horren salbuespen bakarrak dira zentzumen nagusitzat ikusmena duten zenbait hegazti eta primate —gizakia kasu—. Gizakion kasuan, eboluzionatu ahala usaintzeko gaitasun handia galdu dugula jakina da, zehazki esateko, usaimenaren bi herenak galdu ditugula zenbatetsi da (Gilad *et al.*, 2003). Usainen erregistroa oso zabala da, are gehiago gizakia 10.000 usain desberdin identifikatzeko gai dela kontuan hartzen badugu —zifra horri buruz ohar

interesgarri bat gehitu da azpiatal honen amaieran azken aurkikuntzak kontuan hartuta—. Funtzio hori eraginkortasunez egin behar duenez, usaimen-sistemaren konplexutasuna immunitate-sistemarenaren parekoa dela ikusi da (Hatt, 2005).

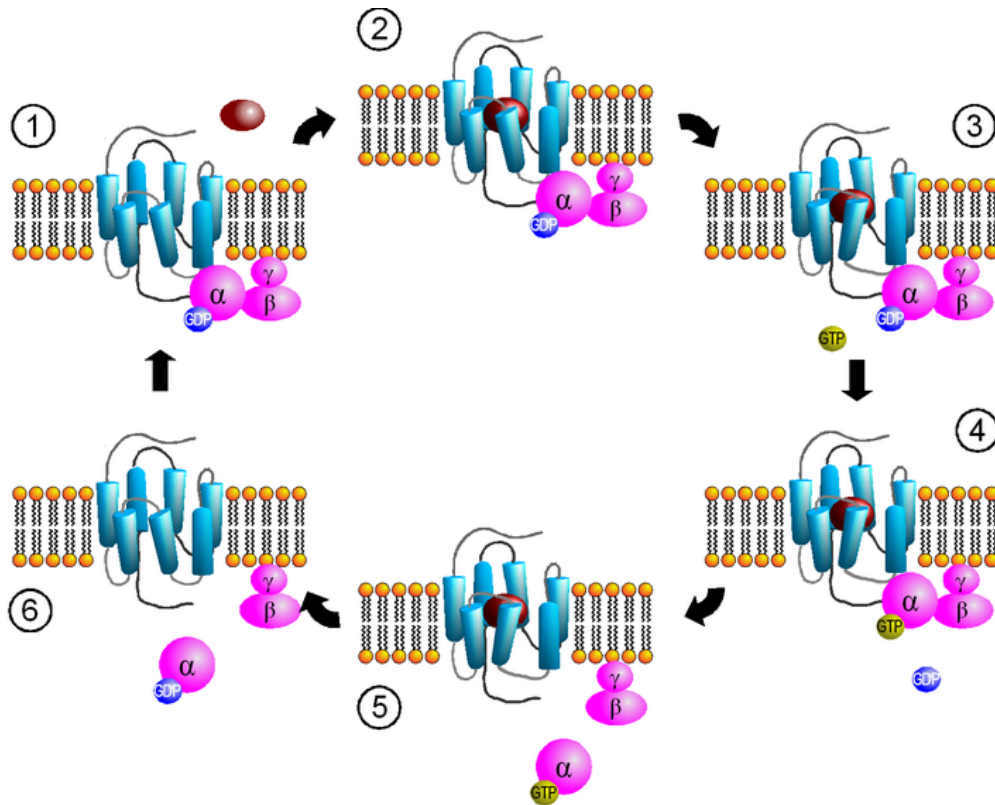
Bestalde, usaimen-mekanismoa ulertzeko interes handia dago, horrek usainak neurtzeko emango digun gaitasuna dela-eta. Molekula batek duen usainaren izaera eta intentsitatea hainbat propietate fisikokimikoren ondorioa da: hegazkortasuna, egitura kimikoa, egonkortasuna, gainazal-atxikidura, eta abar. Ezaugarri multzo hori era zehatzean kuantifikatzea benetan konplexua da. Gainera, normalean, hainbat osagai dituen nahaste baten usaina ez da banakako osagaien batuketa aritmetikoa. Horren ondorioz, oso zaila da —kasu askotan ezinezkoa— usainen sailkapena egitea. Normalean usainak beste usainekiko duten antzekotasunaren arabera sailkatzea da dugun aukera bakarra. Konplexutasun horien azalpena usaimenaren ezaugarrietan bilatu behar da, hain zuzen ere, usaimen-mekanismoaren eta usain-seinaleen neuroprozesaketaren bide bihurrietan. Usaimenaren fisiologia eta biokimika ulertzen bada, hainbat konposatuk —koloniek, perfumeek, eta abarrek— gizakiengan duten eragina ulertu ahal izango da.

Airea arnasterakoan molekula kopuru izugarria iristen zaigu sudur-hobietara (1.9. Irudia), eta, arnasten den bakoitzean usaintzen dira. Molekula horien usaina atzemateko prozesuaren lehen urratsean usaimen-epitelioak sudur-hobietan jariatzen duen muki-mintzak eta ehun konektiboz osatutako geruza azpiepitelialak parte hartzen dute. Gizakion kasuan, usaimen-epitelioak 10 cm²-ko azalera du —txakurrek, esaterako, 35-169 cm²-ko azalera epitelioa dute, arrazaren arabera— eta 100-200 µm-ko lodiera (Issel-Tarver eta Rine, 1997).



1.9. Irudia. Giza usaimen-sistema: 1) usaimen-erraboila, 2) zelula mitralak, 3) hezurra, 4) usaimen-epitelioa, 5) glomeruluak eta 6) neurona usain-errezptoreak. Irudia: I. Icke, Wikimedia Commons.

proteinaren α azpiunitatea disoziatzen du beste bi azpiunitateetatik (1.11. Irudia). G-proteinaren aktibazio mekanismoan GTP (Guanosin Trifosfatoa) eta GDP (Guanosin Difosfatoa) molekulek ere parte hartzen dute. G-proteinaren α azpiunitatea da AC entzima aktibatzen duena, hain zuzen ere.



1.11. Irudia. G-proteinen aktibazio mekanismoaren zikloa. Mintzean dagoen GPCR errezeptorearen zapi azpiunitateak ikusten dira, eta GTP/GDP molekulek duten funtzioa. Aktibazioaren amaieran (5) α azpiunitate aktibatua askatzen da. AC entzima aktibatua ondoren, azpiunitate hori egoera desaktibatura itzultzen da (6) eta zikloa berriz has daiteke. Irudia: S. Jähnichen, Wikimedia Commons.

G-proteinaren kausaz aktibatua ondoren, adenilato ziklasak adenosin monofosfato ziklikoa (cAMP, *Cyclic Adenosine Monophosphate*) sintetizatzen du, horretarako adenosin trifosfatoa erabiliz (ATP, *Adenosine Triphosphate*). cAMP bigarren mailako mezularia da eta, hortaz, zelula barneko seinale-transdukzioan parte hartzen du (1.12. Irudia).

cAMP-ren menpeko mekanismo horren ondorioz, zelula-mintzean dauden kanal ioniko deritzen proteinek aldaketa konformazionalak jasaten dituzte. Kanal ioniko horiek mintzaren alde batetik bestera dagoen ioi-fluxua kontrolatzen dute —nagusiki, Na^+ , Ca^{2+} eta Cl^- ioiak—, eta cAMPren eraginez gradiente elektrokimikoa sortzen dute —20 mV ingurukoa—. Azkenik, seinale elektrokimiko hori neurona-errezeptoreen axonetatik usaimen-errabilera (1.9. Irudia)

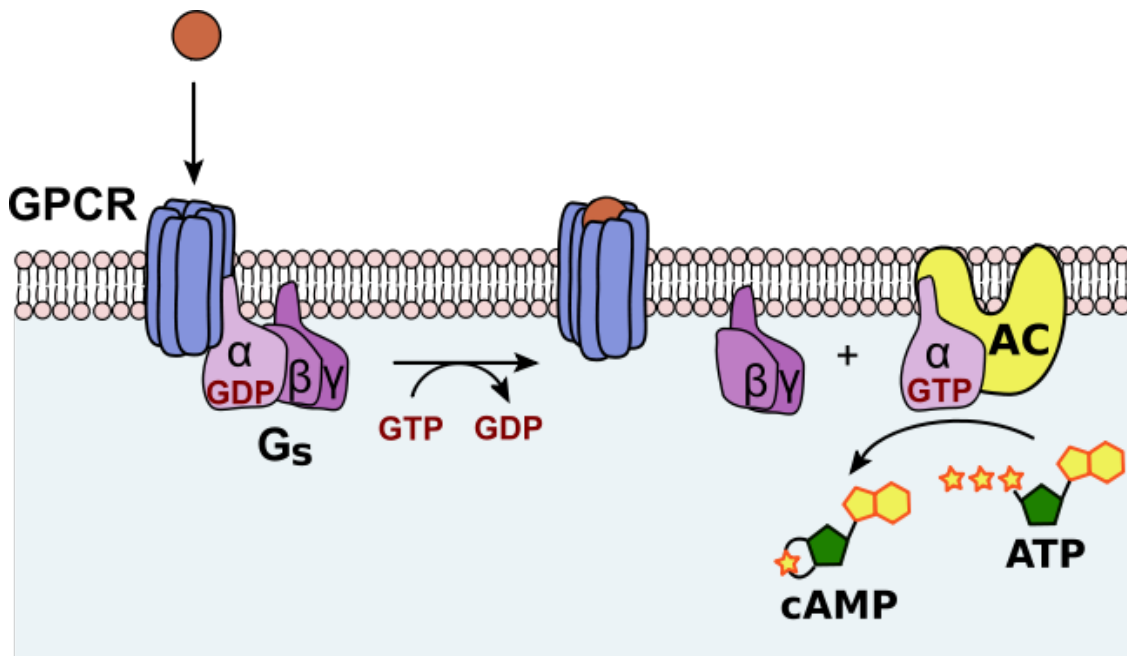
transmititzen da (Raming *et al.*, 1993; Hatt, 2005). Beraz, usaimen-mekanismoa lau pauso hauetan labur daiteke:

I. Usain-molekulen garraioa GPCR errezeptoreetara (OR errezeptoreak): difusioz eta garraio aktiboz OBP proteinei esker;

II. Molekula horien eta OR errezeptoreen arteko interakzioa;

III. Interakzio horren ondorioz seinale elektrokimikoa sortzea: G-proteinei, adenilato ziklasari eta kanal ionikoei esker, besteak beste, eta;

IV. Sortutako seinalearen interpretazioa.



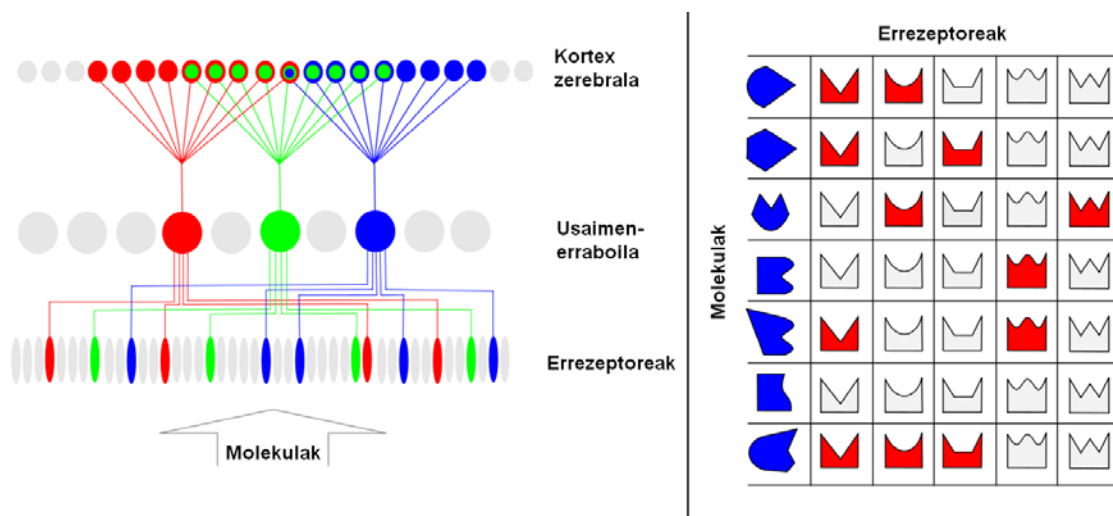
1.12. Irudia. Adenilato ziklasaren (AC) aktibazioa eta G-proteinaren funtzioa. Usain-molekulak aktibatutako GPCR errezeptorea ere ikusten da zelula-mintzean. Irudia: T. Nakane, Wikimedia Commons.

Orain arte lehen hiru pausoak aztertu dira, baina, agian garrantzitsuena den azken pausoa aztertu behar da, alegia, usain-molekulak sortutako seinale elektrokimikoa nola bihurtzen den *ulertzeko moduko* informazioan.

Informazio elektrokimikoaren interpretazioari dagokionez, usaimen-erraboilean glomerulu deritzen egitura esferikoak daude eta, horietara iristen dira neurona-errezeptoreetan sortzen diren seinale elektrokimikoak. Glomerulu kopurua oso aldakorra da espezie batetik bestera: gizakion kasuan, 2.000 inguru ditugula

zenbatetsi da (Zou *et al.*, 2009). Glomeruluetara hainbat errezeptoretan jasotako seinaleak iristen dira —milaka seinale glomerulu bakoitzeko— eta, bertan, aktibitate *patroi bat* bezala prozesatzen dira. Hartara, usain bakoitza seinale-multzo baten modura jaso daiteke eta seinale hori zelula mitraletara bidaltzen da. Azkenik, informazio kimikoa talamora eta hipotalamora iristen da. Garunaren zati horiek emozioak, sentimenduak eta senak kontrolatzen dituzte, eta hori gutxi balitz, memoriaren edukiak eta hormonak askatzeko prozesuak ere kontrolatzen dituzte. Azkenik tratatutako informazioa kortex zerebralerara bidaltzen da eta, orduan, kontziente bihurtzen da. Gainera, aipatutako prozesu horretaz gain, usain-molekulen %60ak sudur-hobiak estaltzen dituen nerbio trigeminoa ere aktibatzen du. Hori ere molekulak duen usainaren beste informazio iturri bat da.

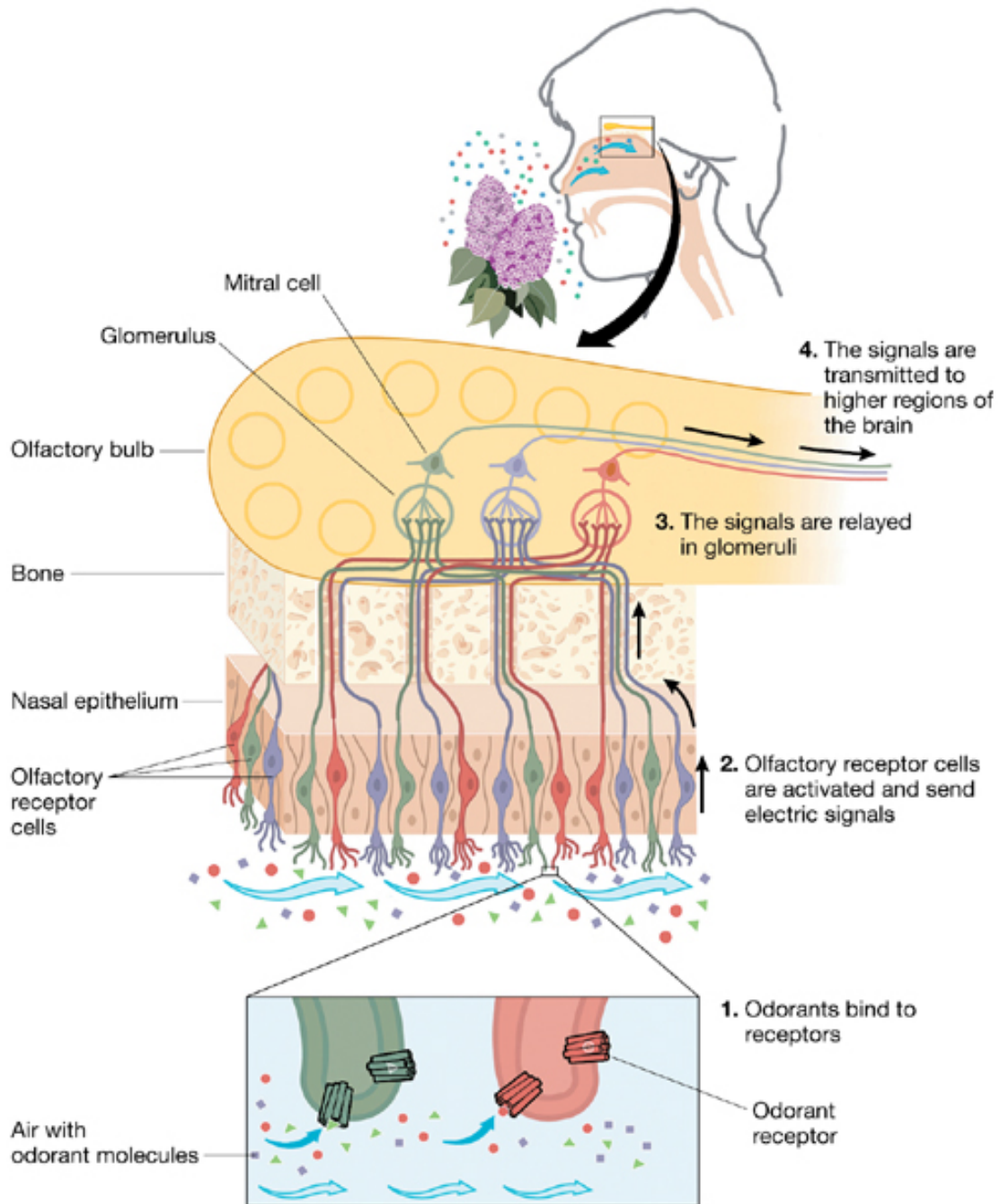
Usaimenaren mekanismoa azaldu ondoren, argiago ikus daiteke zergatik esaten den usainak izaera konbinatorioa duela, alegia, molekula baten usaina ez dela errezeptore bakarrarekin duen interakzioaren araberakoa. Usaina kortexera iritsi den seinale-patroiak sortzen du, hainbat errezeptoretan izandako elkarrekintzaren informazioa duena. Milioika zelula errezeptore daude sudur-hobietan eta, errezeptore-mota bakoitzak usain-molekula askorekin interakziona dezakeen bezala, usain-molekula bakoitzak errezeptore asko aktiba ditzake (1.13. Irudia).



1.13. Irudia. Usainen errezeptzio-mekanismoa (ezkerrean) eta usain-molekula/neurona-errezeptore interakzioaren eskema sinplifikatua (eskuinean).

Molekula bakoitza gai da errezeptore-multzo bat aktibatzeko, eta gainera, intentsitate desberdineko interakzioa gerta daiteke: horrek guztiak sortzen du molekularen usain kontzientea. Metafora eder baten bidez azalduz, molekula batek errezeptoreekin duen interakzioa pianoaren teklak jotzearekin alderatuko bagenu, molekula horrek sortzen duen usain kontzientea sinfonia baten parekoa litzateke.

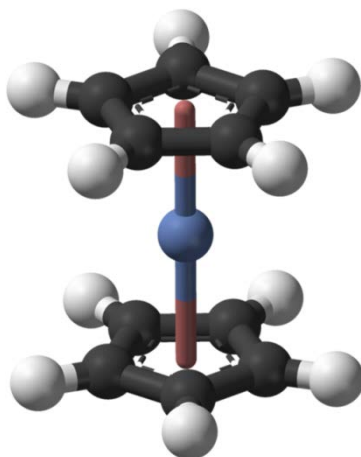
Usaimen-mekanismo osoaren eskema 1.14. irudian ikus daiteke. Azaldutakoaren ondoren, OR proteinetan erantzuna sortzeko gai den edozein molekula usain-molekula dela esan daiteke. Arnasten den airean ppm (milioikobeste, *parts per million*) edo ppb (bilioikobeste, *parts per billion*) kontzentrazioan dauden molekulak antzeman daitezke, nahiz eta usain daitekeen kontzentrazio muga hori molekularen, banakoaren eta espeziearen menpekoa den.



1.14. Irudia. Usaimen mekanismo osoaren eskema 4 pausotan adierazita. Irudia: Rinaldi, 2007.

Bestalde, oso zaila da —ezinezkoa, agian— molekula baten usaina zein izango den jakitea edo aurreatea. Demagun, esaterako, sintetizatu berri den konposatu baten usaina aurreateko gaitasunak izango lukeen interes zientifikoan eta ekonomikoan. Molekula baten egitura kimikoa eta sortzen duen usaina azaltzeko Egitura – Usain Erlazioak (SOR, *Structure – Odor Relationship*) erabiltzen dira. Zenbait teoria proposatu badira ere, gaur egun bi SOR teoria gailendu dira: Formaren teoria eta bibrazio molekularren teoria (Turin, 2005).

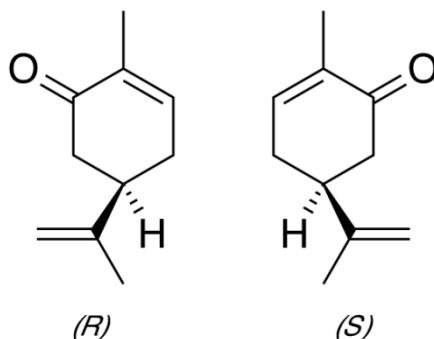
(1) Formaren teoria: Formaren teoria molekulak duen itxuran oinarritzen da, alegia, “giltza eta sarraila” erako mekanismoan, entzimen eta substratuen arteko interakzioa gertatzen den antzeko eran. Teoria horren arabera, molekulek odotopo edo osmoforo deritzen taldeak dituzte —*giltzak*— eta talde horiek errezeptoreak —*sarrailak*— aktibatzeke gai dira. Interakzio horiek nagusiki elkarrekintza elektrostatikoa oinarritutakoak dira eta, hortaz, molekula baten usainaren intentsitatea elkarrekintza horien sendotasunaren arabera izango dira.



1.15. Irudia. Metalozenoen egitura: ferrozenoaren kasuan erdiko atomoa burdina da eta, nikelozenoaren kasuan nikela.

Odotopoen teoria biologian askotan gertatzen den mekanismoan oinarritzen den arren, huts egiten du zenbait kasutan, adibidez, metalozenoen usaina azaltzerakoan. Ferrozenoa — $\text{Fe}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2$ — eta nikelozenoa — $\text{Ni}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2$ — egitura kimiko berdineko molekulak dira (1.15. Irudia), baina, beraien usaina desberdina da. Bi molekula horien arteko desberdintasunak bibrazio-espektraoan agertzen direnez, horien usaina desberdina izatea bibrazio molekularren teoriaren bidez azal daiteke.

(2) Bibrazio molekularren teoria: Teoria honen arabera, sudurra eta usaimen-mekanismoa espektroskopia bibrazional batekin konpara daiteke, hau da, molekulen bibrazio-espektroak finkatzen du beraien usaina. Konposatuak dituen bibrazio-frekuentzien konbinazioa hatz-marka baten modukoa da eta, horrek bere usaina deskribatzen du. Bibrazio molekularren teoriak ere huts egiten du zenbait molekulen usaina azaltzerakoan. Esaterako, enantiomeroek —elkarren arten ispilu-irudiak diren molekulek— bibrazio-espektro berdina izaten dute, baina, kasu batzuetan usain edo usain-intentsitate desberdinak dituzte (1.16. Irudia). Usainaren errezeptoreak enantiomeroak bereizteko gai izan daitezkeenez, formaren teoriaren bidez enantiomeroen usaina desberdina izatea justifika daiteke.



1.16. Irudia. *R*-Karbona eta *S*-Karbona enantiomeroak dira eta usain desberdinak dituzte, menda-usaina eta kumino-usaina, hurrenez hurren.

Zientzia-komunitateari gogorragoa egiten zaio bibrazio molekularren teoria onartzea, planteatzen dituen hipotesiak frogatzea zailagoa izan delako. Teoria baten eta besteren aldeko eta aurkako argudio gehiagoren analisi sakonagoa bibliografian aurki dezake interesa duen irakurle orok (Doty, 2003; Kraft, 2005b; Turin, 2005). Dena den, agian bi teoria horiek osagarriak izan daitezke usain-molekulen eta OR errezeptoreen arteko elkarrekintza konplexuak ulertzerakoan.

Formaren teoriak nahiz bibrazio molekularren teoriak atomo-talde jakin batek usain batekin duen erlazio estatistikoa ematen du, alegia, talde berri bat sintetizatzen denean izango duen usainaren iragarpena *probabilitate* huts bezala adierazten du. Eredu estatistikoak lagungarriak diren arren, gaur egun ezin da auresan zein izango den laborategian sintetizatuko dugun molekula berriaren usaina. Zientziaren etorkizuneko erronka garrantzitsua da usainaren mekanismoaren ñabardura guztiak ulertzea eta, informazio hori eskuragarri dugunean, molekula berrien usaina auresan ahal izatea. Horrela usain-molekula berriak arrazoizko eran diseinatu eta sintetizatu daitezke (Turin, 2005).

Atalari amaiera emateko, aipatu behar da atal honen oinarria den artikulua (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013) argitaratu ondoren ikerkuntza iraultzaile baten

emaitzak ezagutzera eman direla *Science* aldizkarian (Bushdid *et al.*, 2014). Artikulu horretan gizakiek identifika ditzaketen 10.000 usain horien ordeztatik—bibliografia zientifikoak ontzat emandako kopurua— egileen arabera, gizakia gai da, gutxienez trilioi bat usain-estimulu bereizteko. Ohiz kanpoko baieztapenek ohiz kanpoko azalpenak behar dituzten arren eta, baieztapen hori sendotuko duten ikerkuntza gehiago argitaratzen diren bitartean, esan behar da usaimen mekanismoa azaltzea oso konplexua dela, literatura zientifikoak baieztatzen duen bezala.

1.7. Lurrinen analisia: ikuspegi orokorra

Lurrinen analisia garrantzitsua da Europako araudiari dagokionez, baina, askotan zalantzazkoa izan daiteke lurrinak definitzea. Testu honen helburuen ikuspuntutik, gogoratu, lurrin hitzarekin perfumeen osagai usaintsuak identifikatzen direla. Lurrinei buruzko informazio osagarri eta interesgarria bi erakundetan aurki daiteke. Alde batetik, RIFM (*Research Institute for Fragrance Materials*) institutua aipatu behar da (RIFM, 2014), izan ere, lurrinen segurtasuna aztertzen duen erakunde independentea da. RIFMk lurrinei buruzko datu zientifikoak ikertzen, ebaluatzen eta zabaltzen ditu mundu-mailan, etxeko produktuen eta kosmetikoen segurtasuna bermatzeko. Bere datu basea lurrinei buruz dagoen datu baserik handiena da, eta informazio toxikologiko zabala jasota dago bertan. Bestetik, 1973an sortutako IFRA (*International Fragrance Association*) elkarte aipatu behar da. Elkarte hori lurrinen industriaren elkarte da eta erakunde auto-erregulatzaile lanak egiten ditu. Bere web-orrian (IFRA, 2014) lurrinei buruzko informazio garrantzitsuena jasotzen dute, besteak beste, RIFMren gomendioetan oinarrituta. Une honetan, 47. zuzenketari —2013ko ekainaren 10ean egina— dagokion zerrenda aurki daiteke web-orrian eta, bertan, lurrinen industriaren erabilera egokien kodea ezartzen da.

Lurrinen analisiari dagokionez, konposatu lurrinkorrak direnez, gas-kromatografia (GC, *Gas Chromatography*) da teknika erabiliena. Hala ere, beste zenbait tekniken bidez ere kuantifika daitezke lurrinak. Jarraian lurrinen kuantifikaziora aplikatutako analisi instrumentalaren ikuspegi orokorra aztertuko da, aurrerago musketen eta lurrin alergenoen kasua sakonago aztertuko baita. Laginaren prestaketari buruzko xehetasunak bibliografia espezializatuan aurki daitezke (Bazemore, 2001). Perfumeen osaketari buruzko informazio kualitatiboa nahi denean, ohikoak dira teknika espektroskopikoak, esaterako, UV-ikusgaia, infragorria (IR, *InfraRed spectroscopy*) eta erresonantzia magnetiko nuklearra (NMR, *Nuclear Magnetic Resonance*). Baina, esan bezala, informazio zehatza nahi denean banaketa teknika instrumentalak beharrezkoak dira. Zentzu horretan,

ikerkuntza asko argitaratu dira GC erabiliz lurrinak kuantifikatzeko (Chisvert eta Salvador, 2007). Gainera, gas-kromatografiaren alorrean egindako aurrerakuntzek askotariko aplikazioak ahalbidetzen dituzte. Aipatzekoak dira, adibidez, GC multidimentsionala (GCxGC), eta beste teknika akoplatuak. Teknika akoplatuen artean, masa-espektrometria (MS, *Mass Spectrometry*) detektagailuei akoplatutako GC teknikak nagusitu dira, esaterako, GC-MS/MS tandem ekipoak, edo GCxGC-MS teknika bidimentsionalak (Bicchi *et al.*, 2006; Rouseff eta Goodner, 2011).

Gas-kromatografia arruntaren kasuan, ohikoenak FID (*Flame Ionization Detector*) eta TCD (*Thermal Conductivity Detector*) detektagailuak dira. Horiek erabiltzen direnean, MS detektagailuek baino informazio gutxiago eskaintzen dutenez, KI (*Kovats Index*) delakoa erabiliz identifika daitezke perfume edo kosmetiko batean dauden lurrinak, datu baseetan KI balioak jasota egon ohi direlako. Bestalde, teknika kromatografikoei dagokienez, likido-kromatografia (LC, *Liquid Chromatography*) da bigarren teknikarik arruntena, normalean hain lurrinkorrek ez diren edo termolabilak diren osagaiak kuantifikatzeko erabiltzen dena (Chisvert eta Salvador, 2007). Zentzu horretan, elektroforesi kapilarra lurrinen analisiaren aplikaziorako indarra hartzen ari den teknika kromatografikoa da, eta 4. kapituluan aztertuko da xehetasun guztiekin (Cabaleiro *et al.*, 2013; Minematsu *et al.*, 2013).

1.8. Resumen traducido: Conceptos generales

1. Breve historia de la cosmética

Uno de los primeros cosméticos utilizados por el ser humano fueron los perfumes, ya que los olores tienen un papel crucial en el comportamiento humano. Un olor agradable puede hacernos sentirnos mejor o más relajados, mientras que un olor desagradable produce sensaciones negativas, ansiedad o malestar. El gusto y el olfato son nuestros sentidos más antiguos, y fueron vitales para la supervivencia en los albores de la Humanidad.

La palabra perfume, que proviene del latín “*per fumum*”, por o a través del humo, hace referencia a una materia olorosa y aromática, que puesta al fuego desprende un humo fragante y oloroso. De manera más general, puede tratarse de cualquier sustancia que se utilice para dar buen olor. La historia del perfume se remonta a los mismos orígenes del ser humano, y el perfume está muy presente en muchos aspectos de la historia de la humanidad. Esto supuso un desarrollo importantísimo de la ciencia y tecnología de las fragancias, desarrollos que han tenido posteriormente aplicaciones en otros campos. De hecho, en palabras de D. J. Rowe las raíces de la química moderna están en la industria de los aromas y las fragancias (Rowe, 2005).

Griegos y después romanos tomaron de estas civilizaciones su afición por los perfumes, aceites y especias. Esencias como la rosa, azafrán, madera de cedro, incienso, mirra o canela eran muy codiciadas. En la Edad Media, uno de los primeros tratados de perfumería, que describe la receta de más de cien perfumes y técnicas para la extracción de esencias, como la destilación en alambique, fue escrito en el siglo IX por el alquimista árabe Al-Kindi (Al-Hassani *et al.*, 2006). En el siglo XVIII, los fundamentos de la ciencia moderna fueron establecidos en esta época por químicos como A. Lavoisier o J. Dalton, entre otros. En el campo de la perfumería, se produjo un hecho clave, y es que en 1708, el perfumista londinense Charles Lilly introdujo fragancias de origen animal en su nuevo perfume: el almizcle (Pybus, 2006). A finales del siglo XIX, las fragancias empezaron a ser investigadas en profundidad, y en 1882 Paul Parquet comercializó por primera vez un perfume (*Fougere Royale*) con un compuesto sintético: la cumarina, que había sido sintetizada por William Perkin en 1868 (Rowe, 2005). Uno de los negocios más lucrativos del mundo daba sus primeros pasos.

En el siglo XX, después de la Segunda Guerra Mundial, la industria de fragancias y aromas inició una espectacular expansión con el aumento del uso de perfumes. En el siglo actual, la sofisticación de la cosmética ha llegado a cotas inesperadas. La industria continúa en ascenso, buscando nuevas metodologías sintéticas y la identificación de nuevos compuestos “exóticos”. Además, la rentabilidad del negocio es incuestionable, que cuenta con más de 3000 fragancias como ingredientes y otros 10.000 más, aproximadamente, si se tienen en cuenta

todos los ingredientes. Según los datos de la Unión Europea para el año 2013, el mercado de la industria cosmética movió aproximadamente 69 billones de euros en la Unión (Cosmetics Europe, 2013) (Figura 1.3.).

Pie de figura 1.3. (1.3. Irudia): El mercado de la cosmética en 2013. Figura: Cosmetics Europe (Cosmetics Europe, 2013).

2. Reglamento actual

Debido al amplio uso de cosméticos en Europa, es fundamental el desarrollo de una normativa que regule y legisle los aspectos de seguridad y eficacia de los productos cosméticos. En este texto se analizará con más detalle la normativa europea actualmente en vigor. En el caso de la Unión Europea, el 22 de diciembre de 2009 se publicó en el Diario Oficial de la Unión Europea el reglamento 1223/2009 sobre los productos cosméticos (European Parliament and Council, 2009). Este reglamento, que deriva de la versión refundida de la Directiva Europea de Cosméticos 76/768/EEC (European Council, 1976) vino a modificar dicha normativa, mejorando y perfeccionando la mayoría de sus artículos. Por otro lado, el nuevo reglamento 1223/2009 armonizó y simplificó en gran medida la reglamentación anterior. El reglamento entró en vigor, al menos en gran parte, el 13 de julio de 2013, siendo uno de los aspectos más importantes el referente a la seguridad en la salud del consumidor.

En el artículo 2 de la normativa, en la que se presentan una serie de definiciones, se define como producto cosmético toda sustancia o mezcla destinada a ser puesta en contacto con las partes superficiales del cuerpo humano o con los dientes y las mucosas bucales, con el fin exclusivo o principal de limpiarlos, perfumarlos, modificar su aspecto, protegerlos, mantenerlos en buen estado o corregir los olores corporales. De la misma manera, se define la sustancia como un elemento químico y sus compuestos naturales, es decir, se trataría de los ingredientes de los productos cosméticos.

Dos de los cambios fundamentales del reglamento 1223/2009 son los referentes a la seguridad y a la eficacia de los productos cosméticos. En cuanto a la seguridad, se establece la denominada *persona responsable*, que puede ser física o jurídica, pero sin cuya designación no es posible introducir en el mercado de la Unión ningún producto cosmético. Además de ello, se introducen cambios fundamentales en cuanto a la información de seguridad que el fabricante a de aportar a las autoridades (Figura 1.4.). Un análisis pormenorizado sobre la normativa europea 1223/2009 puede encontrarse en la bibliografía (Mildau y Huber, 2010).

Pie de figura 1.4. (1.4. Irudia): Infografía utilizada por la Comisión Europea para dar a conocer las diferencias entre el nuevo reglamento 1223/2009 y la anterior Directiva. Figura: Comisión Europea.

El capítulo 4 es, sin duda, el más interesante desde el punto de vista de la química analítica. En él se establecen las sustancias autorizadas y prohibidas para su uso como ingredientes de los productos cosméticos. En ese sentido, la normativa contiene una serie de anexos, en los que se establecen las sustancias prohibidas en cualquier concentración (anexo II), las sustancias limitadas en su uso (anexo III), los colorantes autorizados (anexo IV), los conservantes autorizados (anexo V) y los filtros ultravioleta autorizados (anexo VI). También cabe destacar que la normativa define en su artículo 2 esos tres grandes grupos de compuestos mencionados. Son colorantes aquellas sustancias cuya finalidad sea colorear el producto cosmético, o bien todo el cuerpo o partes de él. Los conservantes se definen como aquellas sustancias cuya finalidad sea inhibir el desarrollo de microorganismos en el producto cosmético. Finalmente, son filtros ultravioleta (UV) aquellas sustancias cuya finalidad sea proteger la piel de determinadas radiaciones ultravioletas.

3. Control de calidad

Según el reglamento 1223/2009, los productos cosméticos tienen que cumplir tres aspectos fundamentales: seguridad, eficacia y calidad. Toda la información referente a esas tres características ha de ser conocida por la denominada *persona responsable* y ha de ser puesto en conocimiento de las autoridades competentes. La información asociada a la seguridad del producto se refiere a la información toxicológica, de sensibilización, de posibles alergias que pueda causar el producto o de otros efectos secundarios nocivos (Fernández de Córdoba Manent y González Abellán, 2007; Nohynek *et al.*, 2010). La información referente a la eficacia indica que el fabricante debe demostrar que las supuestas ventajas que ofrecerá el producto al consumidor están debidamente demostradas por las pruebas científicas pertinentes (sensoriales, biométricas, etc.). Finalmente, en cuanto a la calidad del producto, el fabricante debe asegurar que el cosmético se mantendrá en condiciones óptimas (ya sean visibles a simple vista o no) durante su periodo de vida.

Por todo ello, es absolutamente imprescindible que el producto cosmético sea sometido a estrictos controles de calidad (Chiari *et al.*, 2012) de carácter analítico, químico, fisicoquímico, biológico y microbiológico a lo largo de todo el proceso de producción (Fernández de Córdoba Manent y González Abellán, 2007). Para ello, es necesario el desarrollo de metodologías analíticas nuevas que cumplan con los principales criterios de validación, como pueden ser la determinación de la precisión o de la exactitud.

4. Ingredientes de los cosméticos y su análisis: perspectiva general

La cuantificación de los ingredientes utilizados en los distintos productos cosméticos es esencial para el control de calidad. Es por ello que tanto los

fabricantes (*personas responsables*, según el reglamento 1223/2009) como las autoridades competentes deben disponer de mecanismos de control de los cosméticos. Estos mecanismos son de aplicación especialmente en tres supuestos.

En primer lugar, están las sustancias prohibidas que se mencionan en el anexo II y que no deben estar presentes en los productos cosméticos, salvo a niveles traza y en los casos en que su presencia es tecnológicamente inevitable.

En segundo lugar, se encuentran las sustancias cuyo uso está restringido por el anexo III, restricciones que pueden referirse tanto al uso como a la concentración de algunos compuestos. Entre este grupo de compuestos, se encuentran las denominadas fragancias o sustancias potencialmente alérgicas (PAS, *Potentially Allergenic Substances*). Se trata de un listado de 26 ingredientes que se dio a conocer en una enmienda de 2003 a la Directiva Europea de Cosméticos (European Parliament and Council, 2003) y son compuestos de especial interés desde el punto de vista de la salud. La presencia de dichas sustancias debe indicarse en la etiqueta si su concentración excede el 0,001% en productos de contacto permanente (*leave-on*) y el 0,01% en productos de eliminación por aclarado (*rinse-off*).

Finalmente, cabe mencionar tres grupos de sustancias de interés, es decir, aquellas que han sido sometidas a listados positivos de uso. Se trata de los ya mencionados colorantes, conservantes y filtros UV. Además de tener que ser autorizados, la mayoría de compuestos están sometidos a las pertinentes restricciones.

En cuanto a los métodos desarrollados para la cuantificación de estos ingredientes, la Unión Europea publicó, en colaboración con la asociación COLIPA (*Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association*) una serie de métodos oficiales para la determinación de sustancias presentes en los productos cosméticos (European Commission, 1999). Se publicaron 38 métodos oficiales para la determinación de aproximadamente 60 sustancias, lo cual es un número ínfimo si se tienen en cuenta los más de 10.000 productos de los que dispone la industria cosmética (Gagliardi *et al.*, 2007). Es por tanto necesario el desarrollo de nuevas metodologías analíticas que cumplan los principales criterios de especificidad, exactitud, precisión, linealidad, selectividad y sensibilidad (Food and Drug Administration, 1999; Valcárcel, 2000).

Los métodos publicados en la literatura científica desarrollan principalmente tres aspectos: el pretratamiento de las muestras, la aplicación de nuevas técnicas instrumentales y el desarrollo de metodologías denominadas *verdes*, es decir, aquellas que tratan de disminuir la cantidad de reactivos necesarios o su toxicidad. El lector puede encontrar en la bibliografía un detallado análisis de los métodos más comunes utilizados para cuantificación de ingredientes de cosmética en el periodo 1980-2006 (Salvador *et al.*, 2007). En el periodo 2007-2014, los productos cosméticos más estudiados han sido los productos para el cuidado del cabello, de la piel y los productos orales para el cuidado de los dientes o de la boca (35%, 21% y 19%, respectivamente). Los analitos más veces cuantificados han sido también los

mencionados con anterioridad, es decir, filtros UV (principalmente benzofenonas), colorantes, conservantes, fragancias (PAS y almizcles) y surfactantes (Salvador *et al.*, 2007).

En lo referente al desarrollo de metodologías analíticas, destacan los avances en nuevas técnicas de pretratamiento de muestras, como por ejemplo, MSPD (*Matrix Solid-Phase Dispersion*), D-SPE (*Dispersive Micro-Solid-Phase Extraction*), SPME (*Solid-Phase Microextraction*), SBSE (*Stir Bar Sorptive Extraction*), SFE (*Supercritical Fluid Extraction*), PLE (*Pressurized Liquid Extraction*) etcétera (Cabaleiro *et al.*, 2014). En el campo de las técnicas analíticas instrumentales más comunes, destacan los métodos basados en técnicas cromatográficas (en torno al 70% de métodos) y también el aumento experimentado por las técnicas basadas en la electroforesis capilar, que han aumentado de manera sustancial del periodo 1980-2006 al periodo 2007-2014. Algunas otras consideraciones sobre el análisis de productos cosméticos puede encontrarse en la bibliografía especializada (Philippsborn, 2000; Anselmi *et al.*, 2004; Salvador y Chisvert, 2007).

5. Ingredientes de los cosméticos: fragancias y perfumería

Un perfume puede estar formado por cientos de compuestos químicos aromáticos, también conocidos como fragancias químicas. Algunos de ellos pueden encontrarse en concentraciones traza, pero el efecto sinérgico entre los distintos componentes hace que todos y cada uno de estos compuestos aporten alguna característica a la sensación olfativa global de un perfume. Por otra parte, los perfumes están íntimamente relacionados con los cosméticos en general, debido a que a la gran mayoría de cosméticos se les añade cierta cantidad de perfume para que sean más agradables al consumidor. En otros casos el perfume cumple la función de enmascarar olores no deseados que están causados por otros componentes del cosmético. Las materias primas utilizadas en los perfumes pocas veces son fragancias químicas puras. Estas fragancias son mezcladas por perfumistas para crear un perfume concreto, cuya composición dependerá tanto del tipo de cosmético al que se le va a añadir como del estudio de mercado previo del consumidor al que se dirige el cosmético, además de otros factores como la originalidad o la moda (Chisvert y Salvador, 2007). Los perfumes pueden clasificarse en dos grupos dependiendo de su origen. Por una parte están los perfumes naturales, que se obtienen a partir de productos naturales (plantas y animales) y por otra parte los que contienen productos químicos sintéticos. En el presente texto los términos sintético/natural se refieren exclusivamente al origen de la fragancia.

Los perfumes naturales, también llamados aceites esenciales, se obtienen de distintas partes de las plantas, como por ejemplo, las flores (jazmín, rosa, gardenia...), frutas (limón, naranja, vainilla...), madera (sándalo, cedro...), cortezas (canela, nuez moscada...), resinas (gálvano, tolú, benjuí...) o incluso la planta entera (lavanda, geranio...). Las fragancias naturales también pueden obtenerse a partir

de glándulas u órganos animales, como es el caso del almizcle, que se obtiene de las glándulas del ciervo almizclero y que se tratará más adelante por ser parte esencial del presente proyecto. La algalia también es de origen animal (glándula de la civeta situada cerca del ano), así como el ámbar gris (secreción biliar de los intestinos del cachalote) o el castóreo (secreción glandular del castor) (Theimer, 1982; Sell, 2006a).

Los aceites esenciales naturales han de ser extraídos de su matriz para que puedan ser empleados como ingredientes de perfumería. La elección de la técnica depende del tipo de producto natural y de las propiedades fisico-químicas del compuesto a extraer. Es importante tener en cuenta que la técnica de extracción afecta en gran medida a la calidad del perfume que se obtendrá. Algunas de las técnicas más utilizadas son la compresión, la extracción con disolventes y la destilación (Da Costa y Eri, 2005; Sell, 2006a; Chisvert y Salvador, 2007).

En cuanto a los perfumes de origen sintético, existen fragancias sintéticas que imitan muchas de las fragancias anteriormente mencionadas, sobre todo las de origen animal, ya que debido a la escasez de recursos naturales (por ejemplo, en el caso del almizcle o del ámbar gris) no se puede cubrir la gran demanda de perfumes que existió a partir del siglo XX. Una de las grandes ventajas de usar ingredientes sintéticos es que reduce el coste de producción, así como poder garantizar la homogeneidad de las materias primas. Por otra parte, la aplicación de la química sintética permite crear nuevas fragancias, a partir de moléculas que no existen en la Naturaleza. Además, los aceites esenciales no son estables en algunos productos (jabones, polvos de lavandería...) debido a su pH o a la presencia de oxidantes, por lo que los compuestos sintéticos permiten añadir perfumes a este tipo de productos. Los ingredientes principales de los perfumes se pueden clasificar en familias dependiendo de su estructura química, tal y como se hace a continuación. La clasificación, resumida en la tabla 2.2. sigue la estructura propuesta por C. Sell (Sell, 2006a), aunque existen otros tipos de clasificación (Theimer, 1982; Rowe, 2005).

6. Quimiorrecepción del olor

La quimiorrecepción del olor ha de ser inevitablemente explicada para entender la función principal de los perfumes (Lopez-Gazpio y Millán, 2013). Los seres vivos han desarrollado a lo largo de miles de años de evolución complejos sistemas para obtener información del medio que los rodea: los cinco sentidos. Tanto el sentido del gusto como el del olfato son conocidos como sentidos químicos, ya que dan información sobre las características químicas del entorno. La mayoría de las especies confían principalmente en los sentidos químicos (gusto y olfato) para obtener información, siendo la excepción a esta regla algunas aves y primates, entre los que se encuentra el ser humano, que tienen la vista como sentido principal. Además, en el caso del ser humano, en el transcurso de la evolución este

ha perdido aproximadamente dos tercios de su capacidad olfativa (Gilad *et al.*, 2003).

Tabla 2.2. Clasificación de las fragancias.

Grupo	Subgrupo	Ejemplos
Derivados de terpenos y terpenoides	Hemiterpenoides	Acetato de prenilo, benzoato de prenilo
	Monoterpenoides acíclicos	Geraniol/nerol, linalool, citronelol y sus ésteres; mircenol, dihidromircenol
	Monoterpenoides cíclicos	l-Mentol, l-carvona, α -terpineol, limoneno
	Monoterpenoides bicíclicos	Canfeno, alcanfor, isoborneol, acetato de isobornilo
	Sesquiterpenoides	Geranilacetona, nerolidol, farnesol, bisabolol, α -farneseno
	Aceites de cedro	Cedrol, cedreno, Lixetone, Vertofix
	Aceites de sándalo	Santaloles, terpenofenoles, Sandela [®] , Sandel N, Santalix, Santalidol
	Diterpenoides	Abalyn, Hercolyn
Almizcles	Ámbar gris	Ambreína, Amberlyn, Ambrox, Ambroxan
	Iononas y similares	Iononas, damasconas, ironas
	Presentes en la Naturaleza	Muscona, civetona
	Nitroaromáticos	Almizcle de cetona, almizcle de xileno
Derivados del benceno	Policíclicos	Tonalide, Galaxolide, Traseolide, Phantolide
	Macrocíclicos	Brasilato de etileno, Exaltolide, Habanolide
	Alicíclicos	Cyclomusk, Helvetolide, Romandolide
	Derivados del benceno	2-Feniletanol y sus derivados (ésteres y acetales), aldehídos hidrocinámicos, Lilial, Lilistralis
Derivados del tolueno	Rosyrane, Mefrosol, Phenoxanol	
Derivados del fenol	Óxido de difenilo, Ortholate, ésteres de salicilato, cumarina, anisaldehído, derivados del catecol	
Derivados del naftaleno	Naftilmetilcetona, naftol	
Otros	δ -Decalactona, Frutonile, Beauvertate, cis-3-hexenol, 2-alquilidenciclopentanonas, Jasmacyclene	

El registro de estos olores es realmente complejo, y es que el ser humano es capaz de distinguir más de 10.000 olores de manera excepcionalmente específica y sensible (sobre esta cifra se hará una aclaración al final del presente apartado a tenor de las últimas investigaciones). De hecho, en términos de complejidad el sistema olfativo compite con el sistema inmune (Hatt, 2005).

Durante la inhalación, un gran número de moléculas puede llegar a la cavidad nasal. El órgano olfativo es una membrana mucosa formada por el epitelio olfativo y una lámina subepitelial de tejido conectivo. El epitelio olfativo, que en el caso del ser humano tiene una superficie de 10 cm² consta de una serie de células, cuya

función principal es la generación de neuronas receptoras olfativas y células de soporte. Estas neuronas receptoras forman protuberancias desde donde se proyectan cilios olfatorios a los que tienen que llegar las moléculas odoríferas. En esta tarea tienen un papel importante las proteínas enlazantes de olor (OBP, *Odor Binding Protein*), encargadas de transportar las moléculas volátiles hasta las proteínas receptoras que se encuentran en los cilios de las neuronas receptoras olfativas. Las proteínas receptoras olfativas pertenecen a una de las grandes familias de receptores para neurotransmisores, conocidas como receptores acoplados a proteínas G (GPCR, *G-Protein-Coupled Receptor*). Las GPCR son proteínas que se encuentran en la membrana celular de las neuronas receptoras, y son capaces de reconocer las moléculas odoríferas (Figura 1.10.).

Pie de figura 1.10. (1.10. Irudia): Representación de las siete subunidades que forman los GPCR.

La interacción de esta molécula con el GPCR activa la proteína G que actúa como mediadora en la activación de la enzima adenilato ciclasa (AC, *Adenylate Cyclase*). La adenilato ciclasa produce adenosín monofosfato cíclico (cAMP, *Cyclic Adenosine Monophosphate*) a partir de adenosín trifosfato (ATP, *Adenosine Triphosphate*). El cAMP actúa sobre la membrana celular, para producir cambios conformacionales en distintos canales iónicos (otro tipo de proteínas transmembrana). La variación del gradiente electroquímico debido a los iones que fluyen a través de los canales iónicos de la mucosa nasal al interior de la célula o viceversa, produce una señal que es enviada a través del axón de la neurona receptora al bulbo olfativo (Raming *et al.*, 1993; Hatt, 2005) (Figura 1.12).

Pie de figura 1.12. (1.12. Irudia): Activación de la adenilato ciclasa (AC) y la función de la proteína G. También puede observarse cómo las moléculas olorosas activan el receptor GPCR en la membrana celular.

En el bulbo olfativo se encuentran los glomérulos, a los que llegan las prolongaciones nerviosas de las neuronas olfativas. En los glomérulos se reciben las señales aromáticas que llegan de distintas proteínas receptoras, de tal manera que puedan ser procesadas formando un patrón de actividad en los glomérulos relacionado con un olor concreto. Toda esta información se envía al tálamo y al hipotálamo, regiones cerebrales responsables de las emociones, sentimientos, instintos e impulsos, encargadas además de almacenar los contenidos de la memoria y regular la liberación de hormonas. Finalmente, la información olorosa se envía a la corteza cerebral y se vuelve consciente.

En el ser humano se expresan funcionalmente 347 tipos de receptores olfativos, menos que la mayoría de mamíferos, que disponen de unos 1.000 (Kraft, 2005b;

Sell, 2006b). Por tanto, el reconocimiento de un olor particular es una cuestión de reconocimiento de un patrón de actividad concreto en los glomérulos (Figura 1.13.).

Pie de figura 1.13. (1.13. Irudia): Mecanismo de recepción olfativo (izquierda) y representación simplificada de la interacción molécula olfativa-receptor neuronal (derecha). Kortex zerebrala: Córtex cerebral; Usaimen-Erraboila: Bulbo olfativo; Errezeptoreak: Receptores; Molekulak: Moléculas.

En la figura 1.14. puede verse un interesante resumen de todo el sistema olfativo humano, según lo descrito en este apartado.

Pie de figura 1.14. (1.14. Irudia): Representación esquemática del mecanismo de olfacción. Figura: Rinaldi, 2007.

Uno de los objetivos de comprender estos mecanismos relacionados con la olfacción es poder diseñar moléculas con un olor concreto, a partir de las relaciones estructura-olor (SOR, *Structure – Odor Relationship*), que pueden agruparse en dos grandes grupos (Turin, 2005):

(1) Teoría de la forma: Explica el olor de una molécula por su forma que describe los grupos olfatóforos (en paralelismo a los grupos cromóforos) para una variedad de tipos de olor.

(2) Teoría vibracional: Justifica el olor de las moléculas por sus frecuencias de vibración, buscando la relación entre el olor y la espectroscopía.

Interesantes revisiones sobre las dos teorías pueden encontrarse en la bibliografía (Doty, 2003; Kraft, 2005b; Turin, 2005). La teoría de la forma o de los olfatóforos indica el promedio estadístico de propiedades olfativas que un grupo dado puede producir. No obstante, estos modelos son intrínsecamente estadísticos y estiman la probabilidad de que un grupo nuevo tenga el olor deseado. Por tanto, en el futuro más próximo seguirá siendo necesario sintetizar una molécula para saber que olor tendrá (Sell, 2006a). Uno de los grandes retos de la ciencia en este campo es poder predecir olores de moléculas que todavía no han sido sintetizadas, a través de la minuciosa comprensión de los mecanismos de olfacción para poder llevar a cabo un *diseño racional* de nuevas fragancias (Turin, 2005).

Finalmente, hay que mencionar que tras la publicación del artículo que sirve de base a este apartado (Lopez-Gazpio y Millán, 2013) se han dado a conocer las conclusiones de un artículo revolucionario en el campo del olfato (Bushdid *et al.*, 2014). Según los autores, el número real de estímulos olfativos que el ser humano es capaz de detectar no son los 10.000 olores que habitualmente se mencionan en la bibliografía, sino que sería al menos de un trillón de estímulos. Si bien es cierto que afirmaciones extraordinarias requieren evidencias extraordinarias, queda clara la

complejidad del mecanismo del olfato y las posibilidades que se abren en este campo de investigación.

7. Análisis de fragancias: perspectiva general

El análisis de fragancias es importante desde la perspectiva de la normativa europea, sin embargo, en ocasiones resulta dudoso definir qué es una fragancia. En ese aspecto, hay que destacar por un lado la labor del RIFM (*Research Institute for Fragrance Materials*) en cuya página web (RIFM, 2014) se encuentra la mayor base de datos toxicológicos sobre fragancias, y por otro lado, la IFRA (*International Fragrance Association*), asociación autoreguladora de la industria cosmética en cuya web (IFRA, 2014) puede encontrarse un amplio listado de fragancias así como un código de buenas prácticas para la industria cosmética.

Las fragancias se han determinado en perfumes y cosmética en general por distintas razones. El uso de técnicas espectroscópicas como el ultravioleta/visible (UV/VIS), el infrarrojo (IR, *Infrared Spectroscopy*) o la resonancia magnética nuclear (NMR, *Nuclear Magnetic Resonance*) aportan información interesante sobre la calidad de los cosméticos. Pero cuando se busca información más detallada, ya sea cualitativa o cuantitativa, normalmente se requieren técnicas de separación como la cromatografía de gases (GC, *Gas Chromatography*). La GC es una técnica muy adecuada para la determinación cuantitativa de fragancias, ya que normalmente son compuestos volátiles, aunque existen alternativas cuando las fragancias tienen menor volatilidad o no son termoestables (Chisvert y Salvador, 2007). Otros métodos empleados incluyen técnicas tales como la GC multidimensional (GCxGC) o GC acoplada a detectores de masas en tándem (GC-MS/MS) e incluso técnicas de separación bidimensional acopladas a espectrometría de masas (GCxGC-MS). Además de las técnicas basadas en GC, también se pueden determinar fragancias por medio de otras técnicas cromatográficas como la cromatografía de líquidos (LC, *Liquid Chromatography*), o la electroforesis capilar, que se analizará en detalle más adelante (Cabaleiro *et al.*, 2013; Minematsu *et al.*, 2014).

1.9. Erreferentziak / Referencias

Al-Hassani, S.T.S.; Woodcock, E.; Saoud, R.: *1001 Inventions: Muslim Heritage in Our World*, Foundation for Science, Technology and Civilisation, Manchester, UK, 2006.

Anselmi, A.; Rodríguez, A.; Bordin, G.; Ciranni, E.; Gagliardi, L.; Lippi, C.: *Analytical Methods for Cosmetics*, COLIPA, Brussels, 2004.

Bazemore, R.: *Sample Preparation*. In Goodner, K.; Rouseff, R.: *Practical Analysis of Flavor and Fragrance Materials*, Wiley, West Sussex, 2011, 23-44.

Bicchi, C.; Rubiolo, P.; Cordero, C.: *Separation Science in Perfume Analysis*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 384, 53-56, 2006.

Bushdid, C.; Magnasco, M.O.; Vosshall, L.B., Keller, A.: *Humans Can Discriminate More than 1 Trillion Olfactory Stimuli*, Science, 343, 1370-1372, 2014.

Cabaleiro, N.; de la Calle, I.; Bendicho, C.; Lavilla, I.: *Current Trends in Liquid-Liquid and Solid-Liquid Extraction for Cosmetic Analysis: A Review*, Analytical Methods, 5, 323-340, 2013.

Cabaleiro, N.; de la calle, I.; Bendicho, C.; Lavilla, I.: *An Overview of Sample Preparation for the Determination of Parabens in Cosmetics*, Trends in Analytical Chemistry, 57, 34-46, 2014.

Chiari, B.G.; De almeida, M.G.J.; Correa, M.A.; Isaac, V.L.B.: *Cosmetics Quality Control*. In AKYAR, I.: *Latest Research into Quality Control*, InTech, 2012.

Chisvert, A.; Salvador, A.: *Perfumes in Cosmetics. Regulatory Aspects and Analytical Methods for Fragrance Ingredients and Other Related Chemicals in Cosmetics*. In Salvador, A.; Chisvert, A.: *Analysis of Cosmetic Products*, Elsevier, Amsterdam, 2007, 243-256.

Cosmetics Europe: *Cosmetics Europe Activity Report 2013*, <http://www.cosmeticseurope.eu>, 2013. (last access: 2014/06/26)

Council Directive: *Council Directive of 27 July 1976 on the Approximation of the Laws of the Member States Relating to Cosmetic Products*, Official Journal of the European Union, L262, 169-200, 1976.

Da Costa, N.C.; Eri, S.: *Identification of Aroma Chemicals*. In Rowe, D.J.: *Chemistry and Technology of Flavors and Fragrances*, Blackwell Publishing Ltd, Oxford, 2005, 12-34.

Doty, R.L.: *Handbook of Olfaction and Gustation*, Marcel Dekker, New York, 2003.

European Commission: *Cosmetics Legislation, Cosmetic Products, Methods of Analysis, Vol.2*, Office for Official Publications of the European Communities, 1999.

European Parliament; European Council: *Directive 2003/15/EC of the European Parliament and of the Council of 27 February 2003 Amending Council Directive 76/768/EEC on the Approximation of the Laws of the Member States Relating to Cosmetic Products*, Official Journal of the European Union, L66, 26-35, 2003.

European Parliament; European Council: *Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on Classification, Labelling and Packaging of Substances and Mixtures, Amending and Repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and Amending Regulation (EC) No 1907/2006*, Official Journal of the European Union, L353, 1-1355, 2008.

European Parliament; European Council: *Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on Cosmetic Products (recast)*, Official Journal of the European Union, L342, 59-209, 2009.

Fernández de Córdova Manent, B.; González Abellán, E.F.: *Quality Control of Cosmetic Products. Specific Legislation on Ingredients*. In Salvador, A.; Chisvert, A.: *Analysis of Cosmetic Products*, Elsevier, The Netherlands, 2007, 29-41.

Firestein, S.: *How the Olfactory System Makes Sense of Scents*, Nature, 413, 211-218, 2001.

Food and Drug Administration: *Guidance for Industry. Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology*, International Conferences on Harmonisation, 1996.

Food and Drug Administration, <http://www.fda.gov>, 2014. (last access: 2014/06/26)

Fuster Ruiz, F.: *El Final del Descubrimiento de América: California, Canadá y Alaska, 1765-1822*, Servicio de Publicaciones, Universidad de Murcia, Murcia, 1998.

Gagliardi, L.; De Orsi, D.; Dorato, S.: *General Review of Official Methods of Analysis for Cosmetics in Different Countries*. In Salvador, A.; Chisvert, A.: *Analysis of Cosmetic Products*, Elsevier, The Netherlands, 2007, 45-71.

Gagliardi, L.; Dorato, S.: *General Concepts. Current Legislation on Cosmetics in Different Countries*. In Salvador, A.; Chisvert, A.: *Analysis of Cosmetic Products*, Elsevier, The Netherlands, 2007, 3-28.

Gilad, Y.; Man, O.; Pääbo, S.; Lancet, D.: *Human Specific Loss of Olfactory Receptor Genes*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100, 3324-3327, 2003.

Hatt, H.: *Molecular and Cellular Basis of Human Olfaction*. In Kraft, P.; Swift, K.A.D.: *Perspectives in Flavor and Fragrance Research*, Wiley-VCH, Weinheim, 2005, 1-13.

International Fragrance Association, <http://www.ifraorg.org>, 2014 (last access: 2014/07/01).

Ireland, W.H.: *The Life of Napoleon Bonaparte*, J. Cumberland, London, 1828.

Issel-Tarver, L.; Rine, J.: *The Evolution of Mammalian Olfactory Receptor Genes*, Genetics, 145, 185-195, 1997.

Kraft, P.: *Aroma Chemicals IV: Musks*. In Rowe, D.J.: *Chemistry and Technology of Flavors and Fragrances*, Blackwell Publishing Ltd, Oxford, 2005a, 144-168.

Kraft, P.: "Brain Aided" Musk Design. In Kraft, P.; Swift, K.A.D.: *Perspectives in Flavor and Fragrance Research*, Wiley-VCH, Weinheim, 2005b, 127-144.

Leffingwell, J.C.: *Chirality and Odour Perception*, www.leffingwell.com, 2014 (last access: 2014-06-26).

Lopez-Gazpio, J.; Millán, E.: *Usaimena, Zentzumen Ahaztu hori*, Ekaia, 26, 31-45, 2013.

López-Nogueroles, M.; Chisvert, A.; Salvador, A.: *Determination of Atranol and Chloroatranol in Perfumes Using Simultaneous Derivatization and Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Followed by Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, Analytica Chimica Acta, 826, 28-34, 2014.

Mann, J.; Harborne, J.; Davidson, R.S.: *Natural Products: Their Chemistry and Biological Significance*, Longman, Harlow, 1994.

Mildau, G.; Huber, B.: *The New EC Cosmetics Regulation 1223/2009 – Contents and First Explanations*, SOFW Journal, 136, 40-59, 2010.

Minematsu, S.; Xuan, G.-S.; Wu, X.-Z.: *Determination of Vanillin in Vanilla Perfumes and Air by Capillary Electrophoresis*, Journal of Environmental Sciences, 25(S), S8-S14, 2013.

Mondello, L.; Casilli, A.; Tranchida, P.Q.; Cicero, L.; Dugo, P.; Dugo, G.: *Comparison of Fast and Conventional GC Analysis for Citrus Essential Oils*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 5602-5606, 2003.

National Geographic News: <http://news.nationalgeographic.com/news/2007/03/070329-oldest-perfumes.html>, 2007. (last access: 2014/06/26)

Nohynek, G.J.; Antignac, E.; Re, T.; Toutain, H.: *Safety Assessment of Personal Care Products/Cosmetics and Their Ingredients*, Toxicology and Applied Pharmacology, 243, 239-259, 2010.

Philippborn, H.E.: *Elsevier's Dictionary of Cosmetic Science*, Elsevier, The Netherlands, 2000.

Pybus, D.H.: *The History of Aroma, Chemistry and Perfume*. In SELL, C.: *The Chemistry of Fragrances*, 2nd ed. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2006, 3-23.

Raming, K.; Krieger, J.; Boekhoff, I.; Kubick, S.; Baumstark, C.; Breer, H.: *Cloning and Expression of Odorant Receptors*, Nature, 361, 353-356, 1993.

Research Institute for Fragrance Materials, <http://www.rifm.org/index.php>, 2014 (last access: 2014/07/01).

Rinaldi, A.: *The Scent of Life: The Exquisite Complexity of the Sense of Smell in Animals and Humans*, EMBO reports, 8, 629-633, 2007.

Rouseff, R.; Goodner, K.: *Traditional Flavor and Fragrance Analysis of Raw Materials and Finished Products*. In Goodner, K.; Rouseff, R.: *Practical Analysis of Flavor and Fragrance Materials*, Wiley, West Sussex, 2011, 45-68.

Rowe, D.J.: *Chemistry and Technology of Flavors and Fragrances*, Blackwell Publishing Ltd. Oxford, 2005.

Salvador, A.; Chisvert, A.: *Analysis of Cosmetic Products*, Elsevier, The Netherlands, 2007.

Salvador, A.; March, J.G.; Vidal, M.T.; Chisvert, A.; Balaguer, A.: *General Review of Published Analytical Methods for Cosmetics*. In Salvador, A.; Chisvert, A.: *Analysis of Cosmetic Products*, Elsevier, The Netherlands, 2007, 72-82.

Scott, R.P.W.: *Encyclopedia of Analytical Science, Perfumes*, Elsevier, Amsterdam, 2005.

Sell, C.: *A Fragrant Introduction to Terpenoid Chemistry*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2003.

Sell, C.: *Perfumery Materials of Natural Origin*. In Sell, C.: *The Chemistry of Fragrances*, 2nd ed., Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2006a, 24-51.

Sell, C.: *Chemoreception*. In Sell, C.: *The Chemistry of Fragrances*, 2nd ed., Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2006b, 219-253.

Theimer, E.T.: *Fragrance Chemistry*, Academic Press Inc., Orlando, 1982.

Turin, L.: *Rational Odorant Design*. In Rowe, D.J.: *Chemistry and Technology of Flavors and Fragrances*, Blackwell Publishing Ltd, Oxford, 2005, 261-273.

United States Congress, *Federal Food, Drug and Cosmetic Act*, 21 United States Code, 321, 1938.

Valcárcel, M.: *Principles of Analytical Chemistry*, Springer, Berlin, 2000.

Zou, D.-J.; Chesler, A.; Firestein, S.: *How the Olfactory Bulb Got its Glomeruli: A just so Story?*, *Nature Reviews Neuroscience*, 10, 611-618, 2009.

— 2 —

Musketak

2.1. Sarrera

Antzinarotik erabili izan dira animalien gurin eta jariakinak lurringintzan. Sung Dinastiaren garaitik —X. mendetik XIII.era— merkatari txinatarrek zeta eta armak trukatzeko zituzten animalien jariakin aromatiko horiengatik, urrea baino baliotsuagoak baitziren. Usain horiek oso desiratuak ziren eta, horien artean garrantzitsuena musketa (*musk*) da. Musketa izenarekin konposatu talde zabal bati egiten zaio erreferentzia, baina, bereziki usain bat definitzen da, izan ere, musketa usaina duten konposatuen egitura kimikoa oso desberdina da. Jatorriz, musketa izena orein musketadunari (*Moschus moschiferus*, 2.1. Irudia) zor zaio. XIX. mendera bitarte, musketa lortzeko iturri bakarra natura zen, baina, egun lurringintzan erabiltzen den musketa gehiena sintetikoa da, arrazoi etikoak eta ekonomikoak direla-eta (King, 2007).



2.1. Irudia. Orein musketaduna (*Moschus moschiferus*). Irudia: R.A. Hill, 2007.

Ikuspuntu kimikotik, musketa lurrinak hiru talde handitan banatzen dira: musketa nitroaromatikoak (NM, *Nitro-aromatic Musks*), musketa poliziklikoak (PCM, *PolyCyclic Musks*) eta musketa makroziklikoak (MCM, *MacroCyclic Musks*). Lehen bi talde horietako lurrinak asko erabili izan dira, eta oraindik ere erabiltzen dira, bai lurringintzan eta baita kosmetikan ere —perfumeetan, xaboietan, kremetan, garbigarrietan, eta abar—. Nitromusketak arrainetan, giza esnean eta gantzean aurkitu zenean, lurrin horien erabilerari buruzko eztabaida piztu zen. Pixkanaka, musketa poliziklikoek nitromusketak ordezkatu zituzten, osasungarriagoak zirelakoan, baina azken horiek ere giza laginetan eta ingurunean aurkitu ziren (Sommer, 2004).

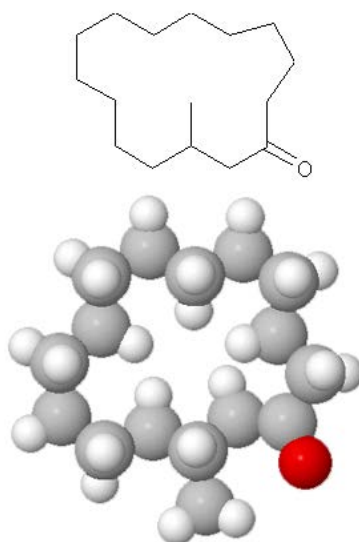
2.2. Musketa naturala

Musketa naturala orein musketadun arraren guruin-jariakina da eta mendeetan zehar erabili da lurringintzan. Orein musketaduna orein arruntaren antzekoa da: 60 cm inguruko altuera du eta 10-13 kg-ko pisua. Asia hegoaldeko eta ekialdeko hainbat herrialdetan —Indian, Txinan, Tibeten, Mongolian eta abar— eta Errusia ekialdeko mendiko basoetan bizi da. Aipatutako usain bereziko jariakinaz baliatzen da oreina bai lurraldea markatzeko eta baita emeak distantzia luzeetatik erakartzeko ere. Jariakina gordetzen duten musketa-guruinak lortzeko (2.2. Irudia), oreina ehizatu eta akabatu egin behar da. Oreina hil ondoren, guruina erauzi egiten zaio, garbitu eta era egokian diluitu ondoren lurringintzan erabili ahal izateko (Rimmel, 1988).



2.2. Irudia. Orein musketadunaren guruinak.

Musketa naturala aspalditik ezagutzen zen, batez ere Txinan, eta egun ere, garrantzi kultural handiko produktua da, droga eta sendagai moduan erabiltzen dena. Musketa produktu natural garestienetakoa dela kontuan hartuta —30.000-50.000 \$/kg inguru produktu purifikatuaren kasuan— eta 1 kg lortzeko 40 orein inguru hil behar direla jakinik, kalte ekologikoa laster iritsi zen. Horri aurre egiteko, 1979an CITES konbentzioan (*Convention on International Trade in Endangered Species of wild fauna and flora*) lurringintzan musketa naturala erabiltzea debekatzea erabaki zen eta ondoren hainbat naziotan egindako legeei esker orein musketaduna babestu zen. Hala ere, orein musketaduna desagertzeko zorian egon zen eta, egun ere, arriskuan dagoen espeziea da, batez ere legez kanpoko ehizaren kausaz. Txinan, adibidez, medikuntza tradizionalan musketari ematen zaion erabilpenaren ondorioz urtero 100.000 orein hiltzen direla kalkulatu da. Egun, zenbait herrialdetatik datorren musketa naturalaren merkataritza debekatura dago —esaterako, Afganistan, Butan, India, Myanmar, Nepal eta Pakistan— eta beste herrialde batzuen kasuan merkataritza kontrolatu egiten da. Hala ere, musketa naturala lurringintzan erabiltzen jarraitzen da txinako medikuntza tradizionalan eta Europari dagokionez, Frantzia da musketa naturala lurringintzan erabiltzen duen herrialde bakarra, baina, urteko kopurua kilogramoen mailakoa besterik ez da (Rimkus, 2004). Azkenik, aipatu behar da badirela musketa usaina duten animalia jatorriko beste zenbait molekula ere, gehienak muskonaren antzeko egitura kimikoa dutenak. Horien artean garrantzitsuenak zibetaren (*Civetticitis civetta* eta *Viverra civetta*) eta Louisianako arratoi musketadunaren (*Ondatra zibethicus rivalicius*) jariakinak dira.

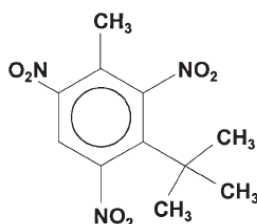


2.3. Irudia. Musketa naturalaren molekula usain-sortzaile nagusia den muskonaren egitura kimikoa eta tridimentsionala.

Ikuspuntu kimikotik, galdera garrantzitsua izan zen musketa usainaren erantzulea den molekularen egitura kimikoa identifikatzea. Ildo horretatik, 1906an H. Walbaum-ek oreinaren guruinetik zetona bat isolatzea lortu zuen (Walbaum, 1906), oreinaren jariakinean %0,5–2 arteko proportzioan dagoen konposatu kimikoa. Konposatu horri muskona izena jarri zion, baina Walbaumez ez zuen ezagutzen muskonaren egitura kimikoa. 1926an L. Ruzicka Nobel saridunak aurkitu zuen haren egitura kimikoa eta, hain zuzen ere, kimikoki, muskona 3-metil-1-ziklopentadekanona da, 15 atomoko zikloa eta $C_{16}H_{30}O$ formula molekularra duen zetona makroziklikoa (Ruzicka, 1926) (2.3. Irudia). Ruzickak, ikerketa berean, zibetona ere karakterizatu zuen —zibetaren guruinetik isolatutako musketa konposatua—. Pixkanaka, musketa usaina zuten beste zenbait konposatu natural isolatu eta identifikatu ziren, musketa makroziklikoen taldekoak guztiak (2.1. Taula). 1936an, M. Stoll-ek, Firmenich konpainiako ikertzaileak, musketa makroziklikoen usainari buruzko lehen arauak ondorioztatu zituen eta eraztun makroziklikoak 14-18 karbono eta karbonilo talde bakarra —birekin usaina desagertu egiten da— izan behar zituztela konturatu zen. Dena den, musketa naturalak laborategian sintetizatzekeo prozedurek porrot egin zuten kasurik gehienetan, lortutako etekinak urriak zirelako eta kostuak handiak (Pilz, 1997). Egun konposatu makroziklikoen bide sintetikoak optimizatu diren arren, urte askotan zehar nitromusketa eta musketa polizikliko sintetikoak era ekonomikoagoan eta errazagoan lortu dira.

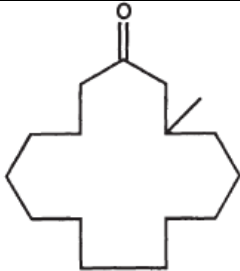

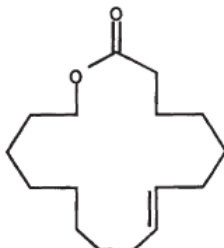
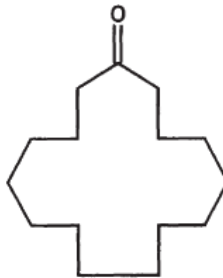
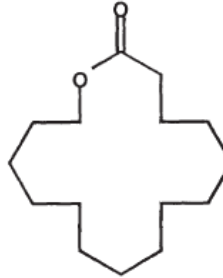
2.3. Musketa nitroaromatikoak

Musketa usaina zuen lehen molekula sintetikoa 1888an Albert Baur kimikariak lortu zuen eta musketa nitroaromatikoen taldekoa zen. Aurkikuntza guztiz zorizkoa izan zen, haren helburua TNT baino egonkorragoak izango ziren lehergaiak lortzea baitzen. Baur TNT deribatuen sintesia egiten ari zenean, pruduktuetako batek usain berezia zuela konturatu zen, musketa usaina hain zuzen ere. Beranduago, konposatu hori “Baur musketa” (*Musk Baur*) bezala ezagutu zen (2.4. Irudia) eta TNT-ren eta *tert*-butil haluro baten Friedel-Crafts alkilaziotik lortu zen (Baur, 1891).



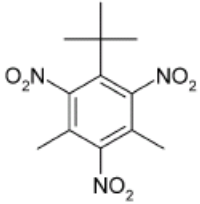
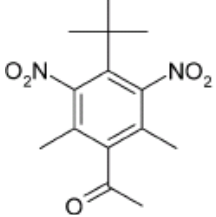
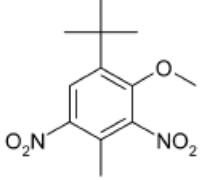
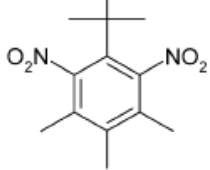
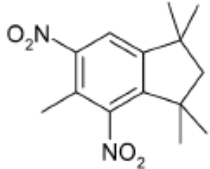
2.4. Irudia. Baur musketaren egitura kimikoa.

2.1. Taula. Jatorri naturala duten musketa makroziklikoak.

Izen arrunta / komertziala	CAS izena	CAS zenbakia	Izen kimikoa	Egitura
Muskona	3-Metilziklopentadekanona	541-91-3	3-Metilziklopentadekanona	
Zibetona	9-Ziklohepta-dezen-1-ona	542-46-1	10-Zetoziklohepta-dezenoa	
Ambrettolide	Oxazikloheptadez-8-en-2-ona	123-69-3	Ziklohexadezenolide	
Exaltone	Ziklopentadekanona	502-72-7	Ziklopentadekanona	
Exaltolide	Oxaziklohexadekan-2-ona	106-02-5	15-Pentadekanolide	

Gogoratzekoa da, 1. kapituluaren esan den bezala, lehen konposatu sintetikoa 1882an erabili zela perfume batean —kumarina—, beraz, Baurrek bere produktu berria patentatzea eta merkaturatzea erabaki zuen *Société des Produits Chimiques de Thamm et de Mulhouse* elkartearen laguntzarekin (Kraft, 2005a). Baur musketa %10 azetanilida diluzioan saltzen zen eta 500 \$/kg salneurria zuen, beraz, garaiko musketa naturalaren prezioaren erdian saltzen zen, gutxi gorabehera.

2.2. Taula. Musketa nitroaromatikoak.

Izen arrunta / komertziala	CAS izena	CAS zenbakia	Egitura
Xileno musketa (MX)	1-(1,1-Dimetiletel)-3,5-dimetil- 2,4,6-trinitrobentzenoa	81-15-2	
Zetona musketa (MK)	1-[4-(1,1-Dimetiletel)-2,6-dimetil- 3,5-dinitrofenil]-etanona	81-14-1	
Abelmosko musketa (MA)	1-(1,1-Dimetiletel)-2-metoxi-4- metil-3,5-dinitrobentzenoa	83-66-9	
<i>Musk tibetene</i> (MT)	1-(1,1-Dimetiletel)-3,4,5-trimetil- 2,6-dinitrobentzenoa	145-39-1	
<i>Musk moskene</i> (MM)	1,1,3,3,5-pentametil-4,6- dinitroindanao	116-66-5	

Arrakasta komertzial handia izan zuen Baurrek eta hurrengo urteetan ikertzen jarraitu zuen, beste hiru musketa nitroaromatiko sintetizatuz: zetona musketa (MK, *Musk Ketone*), xileno musketa (MX, *Musk Xylene*) eta abelmosko musketa (MA, *Musk Ambrette*) (Baur, 1894; Baur, 1898). Azken hiru musketa nitroaromatiko horiek merkatuan nagusitu ziren hurrengo 50 urteetan zehar lurringintzaren osagai moduan. MK egokiena zen musketa naturala ordezkatzeko, MX, berriz, garbigarrietan eta xaboietan erabiltzeko aproposena zen merkeagoa zelako eta, azkenik, MA erabiliz lore usainak lor zitezkeen. Beranduago, Givaudan konpainiak beste zenbait musketa sintetiko garatu zituen, besteak beste, *Musk tibetene* eta *Musk moskene* deiturikoak (Barbier, 1932; Fuson *et al.*, 1947). 2.2. taulan jaso dira musketa nitroaromatiko garrantzizuenak.

Usainak finkatzeko duten gaitasunagatik eta beraien usainagatik, konposatu sintetiko horiek asko erabili ziren lurringintzan eta kantitate handitan ekoiztu ziren XX. mendean. Hala ere, 80ko hamarkadan erabilera murrizten hasi zen nitromusketek lehen kritikak jaso zituztelako. Hein batean, horren arrazoia

abelmosko musketaren fototoxikotasunari eta neurotoxikotasunari buruzko txostenak izan ziren (Barbetta *et al.*, 1988). Bestalde, 1981ean lehen aldiz MK eta MA Japoniako arrainetan eta uretan detektatu ziren (Yamagishi *et al.*, 1981) eta nitromusketek ur-organismoetan bioakumulatzeko gaitasun handia zutela ikusi zen, oso iraunkorrak baitira (Hahn, 1993; Rimkus eta Wolf, 1993).

1992an Alemanian egindako ikerketa batek erakutsi zuen produktu kosmetikoen %55ak eta garbigarrien %41,5ak musketa nitroaromatikoak zituztela eta gehien erabiltzen zirenak MK eta MX zirela ondorioztatu zuten. MA, toxikoena, lagin bakarrean aurkitu zen, izan ere, ordurako FDAk eta IFRAk MA ez erabiltzearen aldeko argudioak zabaldu zituzten, bereziki azalarekin kontaktuan egon behar duten kosmetikoetan. 1995ean Europar Batasunak MA debekatu zuen fotoalergikotasun arrazoiak zirela eta. Hiru urte beranduago, debekua zabaldu egin zen eta MM eta MT konposatuak ere debekatu egin ziren. 2004an, SCCNFP batzordearen (*Scientific Committee on Cosmetic products and Non-Food Products intended for consumers*) gomendioen ondoren, MK eta MX konposatuen erabilpena mugatu egin zen. Egungo 1223/2009 araudian (European Parliament and European Council, 2009) MK eta MX nitromusketak III eranskinean daude, alegia, erabilpen mugak dituzten konposatuak dira (2.3. Taula). Bestalde, IFRAk ikuspuntu zorrotzagoa du eta azken zuzenketaren arabera —47th *Amendment*, web-orrian eskuragarri dagoena (IFRA, 2014)— MX debekatu egiten du eta MK onartzen badu ere, erabiltzekotan, MXen %0,1eko ezpurutasuna baino gutxiago duela ziurtatzea eskatzen du.

2.3. Taula. MX eta MK nitromusketen mugak, 1223/2009 araudiaren arabera.

Konposatua	Produktu mota	Kosmetikoan onar daitekeen kontzentrazio maximoa
Xileno musketa (MX)		%1,0 lurrin finetan.
		%0,4 <i>eau de cologne</i> -tan.
Zetona musketa (MK)	Produktu kosmetiko guztiak, aho-higienerako direnak izan ezik.	%0,03 beste produktuetan.
		%1,4 lurrin finetan.
		%0,56 <i>eau de cologne</i> -tan.
		%0,042 beste produktuetan.

Aipatutako SCCNFPren txostenean (SCCNFP, 2004) xileno musketa 3. kategoriako minbizi-sortzailea dela argudiatzen da, alegia, minbizi-sortzaile posiblea den arren ebaluazio positiboa egiteko nahiko ebidentzia ez dituen konposatua. Uretako organismoentzat oso toxikoa, saguei gibleko minbizia sortzeko gai eta ur-ekosistemetan epe luzeko kalteak eragiteko gai dela aipatzen da. Dena den, nitromusketen inguruan sortutako eztabaidaren, horien neurotoxikotasunari eta fototoxikotasunari buruz dauden frogen (Brunn *et al.*, 2004), ingurugiro eraginaren eta biodegradagarritasun txikiaren ondorioz, MK eta MXen erabilpena txikiagotuz joan da azken urteotan (2.4. Taula).

2.4. Taula. MK eta MX musketen industria-erabilpena tonatan (OSPAR, 2004).

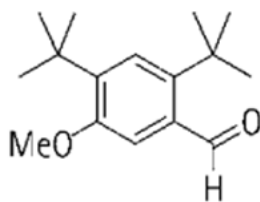
Urtea	Zetona musketa	Xileno musketa
1992	124	174
1995	61	110
1998	40	86
2000	- ^a	67
2008	-	25 ^b

^aDaturik gabe.

^bZenbatetsitako datua.

2.4. Musketa poliziklikoak

XX. mende erdialdetik hona lurrinen industriak konposatu nitroaromatikoen alternatibak bilatu ditu, eta ez bakarrik toxikotasun arrazoien ondorioz. Musketa nitroaromatikoek erreakzio fotokimikoak jasateko joera dute eta ez dira egonkorak ingurune alkalinoan, hortaz, dekolazio arazoak eman ohi zituzten eta ezin ziren erabili garrantzi handiko merkatu batean, hau da, kosmetika funtzionalean —garbigarriak eta garbitegi-produktuak, besteak beste—. Nitro talde funtzionalik ez eta musketa usaina duen konposatu garrantzitsu bat M.S. Carpenter-ek sintetizatu zuen 1948an, anbral delakoa (Carpenter *et al.*, 1951) (2.5. Irudia), nahiz eta anbrala ez zen inoiz merkaturatu. Anbrala konposatu garrantzitsua da ikuspuntu kimikotik, izan ere, nitromusketen eta musketa poliziklikoen (PCMen) arteko konposatutzat har daiteke eta, azken horien garapenaren hasiera izan zen.



2.5. Irudia. Anbral konposatuaren egitura.

Merkaturatutako nitro talderik gabeko lehen musketa K. Fuchs-ek deskribatu zuen 1951an eta urte bat beranduago erabiltzen hasi zen Phantolide (AHDI) izenarekin. Bere egitura 1955an ezagutu zen (Weber *et al.*, 1955) eta, aurretik ezagutzen ziren nitromusketak baino ezegonkorragoa zen arren, beste musketa

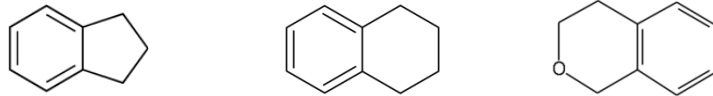
poliziklikoak aurkitzeko bidea ireki zuen, besteak beste, Traseolide (ATII), Celestolide (ADBI), Tonalide (AHTN), Versalide (ATTN) eta isokromanoaren deribatua den Galaxolide (HHCB). Azken hori musketa poliziklikoen goren-mailako aurkikuntza dela esan daiteke egonkortasunari eta hidrofobotasunari dagokionez (Kraft, 2005a). 2.5. Taulan musketa polizikliko garrantzitsuenak jaso dira.

2.5. Taula. Musketa poliziklikoak (PCM).

Izen arrunta / komertziala	CAS izena / CAS zenbakia	Izen kimikoa (Laburdura)	Egitura
Galaxolide Abbalide Pearlside	1,3,4,6,7,8-Hexahidro-4,6,6,7,8,8-hexametil-ziklopenta[γ]-2-benzopiranoa 1222-05-5	1,3,4,6,7,8-Hexahidro-4,6,6,7,8,8-hexametil-ziklopenta[g]-2-benzopiranoa (HHCB)	
Tonalide Fixolide	1-(5,6,7,8-Tetrahydro-3,5,5,6,7,8,8-hexametil-2-naftalenil)-etanona 1506-02-1	7-Azetil-1,1,3,4,4,6-hexametiltetrahidronaftalenoa (AHTN)	
Traseolide	1-[2,3-Dihidro-1,1,2,6-tetrametil-3-(1-metiletil)-1 <i>H</i> -inden-5-il]-etanona 68140-48-7	5-Azetil-1,1,2,6-tetrametil-3-isopropil-dihidroindenoa (ATII)	
Phantolide	1-(2,3-Dihidro-1,1,2,3,3,6-hexametil-1 <i>H</i> -inden-5-il)-etanona 15323-35-0	6-Azetil-1,1,2,3,3,5-hexametil-dihidroindenoa (AHDI)	
Celestolide	1-[6-(1,1-Dimetiletil)-2,3-dihidro-1,1-dimetil-1 <i>H</i> -inden-4-il]-etanona 13171-00-1	4-Azetil-1,1-dimetil-6- <i>tert</i> -butildihidroindenoa; 6-Azetil-1,1,2,3,3,5-hexametilindanoa (ADBI, AHMI)	
Versalide	1-(3-Etil-5,6,7,8-tetrahidro-5,5,8,8-tetrametil-2-naftalenil)-etanona 88-29-9	7-Azetil-1,1,4,4-tetrametil-6-etiltetrahidronaftalenoa (ATTN)	

Azpimarragarria da, bide batez, Cashmeran (DPMI) lurrina askotan musketa poliziklikoen taldean sartzen bada ere horrek ez duela musketa usaina (Kraft, 2005a). Memoria honen ikuspuntuik ATII, AHTN eta HHCB dira interes gehiena

duten musketak, atal esperimentalean aztertzen direlako. Nitromusketen kasuan gertatzen den bezala, musketa poliziklikoak ez dira naturan existitzen eta egitura kimikoari dagokionez ez dute antzekotasunik musketa naturalekin. PCMak hiru taldetan sailka daitezke deribatu motaren arabera: indanoak, tetralinak eta isokromanoak (2.6. Irudia).



2.6. Irudia. Tetralina, indanoa eta isokromanoa, hurrenez hurren.

PCMek, usain ezaugarriez gain, beste usainak finkatzeko gaitasuna dute eta horregatik dira hain konposatu interesgarriak lurringintzaren ikuspuntutik, izan ere, konposatu lurrinkorrenen atxikipena areagotzen dute eta perfumeak bere ezaugarri bereizgarriak mantentzen ditu (Sell, 2006). Musketa makrozikloen aldean, polizikloen sintesia merkeagoa da eta, nitromusketen aldean, egonkorragoak dira. Ondorioz, PCMen erabilpena handiagotzen joan da eta nitromusketena, berriz, txikiagotzen, 2.6. taulan ikus daitekeen bezala —datu eguneratuago fidagarririk ezin izan da lortu—.

2.6. Taula. Nitromusketen eta PCMen urteko erabilpen globala (tonatan).

Urtea	Nitromusketak	PCMak
1987	2.450 ^a	4.300 ^b
1996	2.000 ^a	5.600 ^c
2000	800 ^c	10.000 ^c

^aRimkus *et al.*, 1999.

^bRimkus, 1999.

^cSomogyi *eta* Kishi, 2001.

Ikuspuntu komertzialetik, Galaxolide eta Tonalide dira konposatu garrantzitsuenak, eta Traseolide eta Celestolide hirugarren eta laugarren lekuetan leudeke, hurrenez hurren. Lehen biek (HHCB eta AHTN) musketa polizikloen ekoizpenaren %95a direla zenbatetsi da eta European, 2001eko datuen arabera, 7.000-8.000 tona Galaxolide ekoiztu ziren (Gautschi *et al.*, 2001).

HHCBren sintesia M.G.J. Beets-en ikerketen emaitza izan zen, IFF (*International Flavors and Fragrances*) konpainian. Beets musketa polizikloen talde osmoforoak ikertzen ari zen, hau da, PCMk duten karbonilo taldea. Beste talde funtzional desberdin bat bilatu nahi zuen usain bera lortzeko, lurrinari egonkortasun eta hidrofobotasun handiagoa emateko. Ikerkuntzaren emaitza

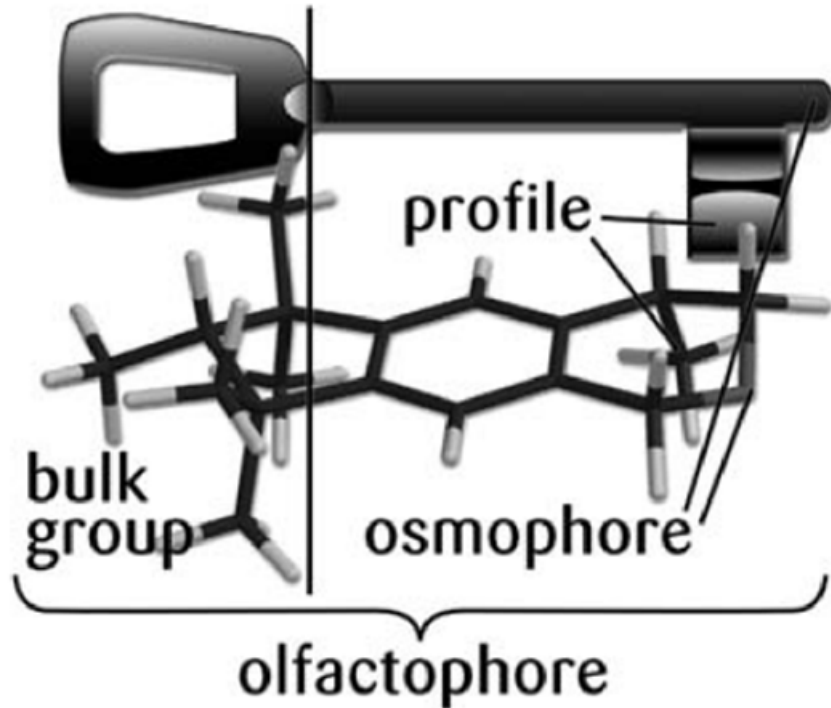
tetrahidropirano eraztun zurrunean kokatutako eter taldearen oxigeno atomoa izan zen, karbonilo taldea dagoen posizio berean jarria. Galaxolide 1965ean sintetizatu zen lehen aldiz eta hamarkada berean merkaturatu zen *Comfort* eta *Softland* leungarrietan %40rainoko kontzentrazioan gehituta, eta %27ko kontzentrazioan *Coral* garbigarrian. Lurrin finetan ere gehitu zen, esaterako, *Sophia Grojsman*-en *Trésor* izenekoak %21 Galaxolide zuen (Kraft, 2005a).

Galaxolideren usaimen-ataria —usain daitekeen kontzentrazio txikiena— 0,9 ng/L da airean eta 80 ng/L uretan. Hala ere, garrantzitsua da esatea estereoisomero desberdinek usaimen-atari desberdinak dituztela eta horrek informazio interesgarria eskaintzen duela musketa poliziklikoei buruz. Galaxolide nahaste errazemiko bezala saltzen da, nahiz eta, esan den bezala, molekula kirala den. Bide batez, PCM guztiak, Celestolide izan ezik, kiralak direla aipatu behar da. Galaxolideren kasuan, bi zentro estereogeniko ditu eta, hortaz, bi enantiomero bikote egon daitezke. Usaimen-atariei buruzko informaziotik jakin zenez, C-7 karbonoaren konfigurazioa C-4 karbonoarena baino garrantzitsuagoa zela ondorioztatu zen musketa usainari dagokionez (2.7. Taula).

2.7. Taula. Galaxolide molekularen estereoisomeroen usaimen-ataria (Fráter *et al.*, 1999).

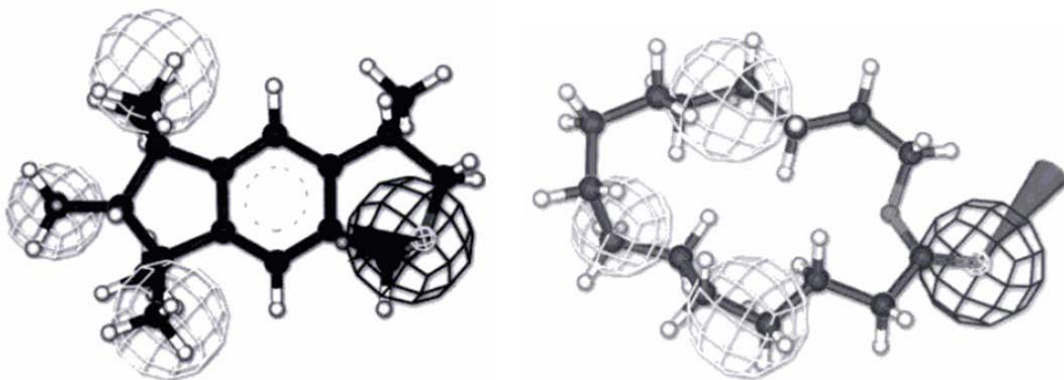
Konposatua	Usaimen-ataria (ng/L aire)
(4 <i>S</i> ,7 <i>R</i>)-HHCB	0,63
(4 <i>R</i> ,7 <i>S</i>)-HHCB	110
(4 <i>S</i> ,7 <i>S</i>)-HHCB	1,0
(4 <i>R</i> ,7 <i>R</i>)-HHCB	440

Ikerketaren egileek adierazi zutenenez, 7-metil adarkadura usain-hartzailearen zonalde hidrofoboaren inguruan kokatuta dago, formarekiko independentea dena. 1. Kapituluaz azaldu den formaren teoriar oinarrituta, hiru ondorio azaldu behar dira: 1) eter taldeak osmoforo moduan jokatzen du, molekula usain-hartzailean sartuz, 2) 4-metil adarkadurak usain-informazioa kodifikatzen du eta 3) bolumen handiagoa duen molekularen zatiak euskarri lanak egiten ditu. Hiru parametro horien konbinaketak talde olfatoroa osatzen du —giltza—, musketa usainaren hartzailea aktibatuko duena —sarraila— (Kraft, 2005a). 2.7. Irudian Galaxolide molekula dago ikusgai, giltza eta sarrailaren eremuan oinarrituta.



2.7. Irudia. (4*S*,7*R*)-HHCB molekularen irudikapena, giltza eta sarrailaren ereduaren arabera (Kraft, 2005a).

Gizakiok musketa usainarentzat hartzaile bakarra edo bat baino gehiago ditugun oraindik ez da ezagutzen. Edozein kasutan, harrigarria da kimikoki hain desberdinak diren molekulek —musketa nitroaromatikoek, polizikloek eta makrozikloek— usain berdina izatea. Amaitzeko, aipatu behar da iritzi desberdinak dauden arren, nagusiki hartzaile bakarraren teoriarekin bat datozen ereduak proposatu direla (Kansy *et al.*, 1995) (2.8. Irudia).



2.8. Irudia. Galaxolide (ezkerrean) eta pentadekano-15-laktona musketa makrozikloa (eskuinean) alderatzen dituen eredu olfatoroa. Eredu horren arabera, bi molekulek hartzaile berdina aktiba dezakete nahiz eta hasiera batean egitura kimikoak oso desberdinak diren (Kraft, 2005b).

2.5. Musketa poliziklikoen toxikotasuna

Kosmetikaren industriaren erabilpen handiaren ondorioz, PCMen —bereziki, Galaxolideren eta Tonalideren— ingurugiro ondorioak laster iritsi ziren. PCMen ezaugarri fisikokimikoak direla-eta (2.8. Taula), konposatu organiko erdilurrinkorren (SVOC, *SemiVolatile Organic Compounds*) taldean sailkatzen dira. Erabilpenari dagokionez, berriz, PPCP (*Pharmaceutical and Personal Care Products*) konposatuen taldean sailkatzen dira.

2.8. Taula. Galaxolide (HHCB), Tonalide (AHTN) eta Traseolide (ATII) konposatuen ezaugarri fisikokimikoak.

	HHCB	AHTN	ATII
Masa molekularra (u)	258,4	258,4	258,4
Irakite puntua (°C) ^a	326	356,8	392,3
log <i>K</i> _{OW} (L/L) ^b	5,9	5,7	6,3
Disolbagarritasuna uretan (mg/L) ^b	1,75	1,25	0,09
<i>H</i> (Pa · m ³ /mol)	11,3 ^b	12,5 ^b	85,1 ^c
Lurrin presioa (Pa)	0,0727 ^d	0,0608 ^d	0,0061 ^a

^aRamírez *et al.*, 2010.

^bArtola-Garicano *et al.*, 2003.

^cPaasivirta *et al.*, 2002.

^dSimonich *et al.*, 2000.

Musketa poliziklikoek egonkortasun kimiko handia, oktanol/ur banaketa koefiziente handia —horiek dira, hain zuzen ere, kosmetikoetan hain erabiliak izateko arrazoia— eta biodegradagarritasun eskasa dute (Carballa *et al.*, 2005). Ezaugarri horien ondorioz, PCMak gantz-ehunetan biokontzentratzeko eta sedimentuetan zein lurrian adsorbatzeko gaitasun handia dute. PCMak hainbat laginetan aurkitu ziren 90eko hamarkadatik aurrera arrainetan, beste uretako bizidunetan, sedimentuetan (Rimkus, 1999; Fromme *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2013) eta baita giza gantzean eta esnean ere (Liebl eta Ehrenstorfer, 1993; Rimkus eta Wolf, 1996). Jakina, egun ere PCMak ingurugiro zein giza laginetan ere detektatzen dira (Fernandes *et al.*, 2013; Hond *et al.*, 2013; Ren *et al.*, 2013) eta baita nitromusketak ere (Taylor *et al.*, 2014). Musketa poliziklikoak ingurunean amaitzeko iturri nagusienak herrietako hondakin-uren isurtegiak dira, eta jakina, PCM gehiago isurtzen dira populazioa zenbat eta handiagoa izan. Musketek ingurunean duten presentziari buruzko xehetasun gehiago Rimkus-en liburuan aurki ditzake irakurleak (Rimkus, 2004).

PCMen toxikotasunari dagokionez, eta bereziki HHCBren eta AHTNren kasuan, uretako bizidunen erresistentzia multixenobiotikoaren (MXR, *MultiXenobiotic Resistance*) inhibitzaileak direla frogatuta dago (Luckenbach *et al.*, 2004) eta baita ingurunean PNEC (*Predicted Non-Effect Concentration*)

kontzentrazioaren gainetik aurkitzen direla kasu askotan (Matamoros eta Bayona, 2006). 2.9. Taulan HHCB, AHTN eta AHDI musketa poliziklikoen zenbait datu toxikologiko jaso dira, besteak beste, LD (*Lethal Dose*) eta NOAEL (*Non Observed Adverse Effect Level*) informazioarekin.

2.9. Taula. PCMen toxikotasuna.

Toxikotasun mota	Espeziea	PCMa	Esposizioa	Efektua	Erreferentzia
Akutua eta subakutua	Arratoia	HHCB	Ahokoa	LD ₁₀ >3,25 g/kg	Ford, 1998
	Arratoia	AHTN	Dermikoa	LD ₅₀ >5 g/kg	Ford, 1998
Subkronikoa	Arratoia	HHCB	Dermikoa	Itxuraz efekturik ez.	Ford, 1998
	Arratoia	HHCB	Ahokoa	Efektu minimoak. NOAEL = 150 mg/kg	Ford, 1998
	Arratoia	AHTN	Dermikoa	Gibelaren pisua handitzen da.	Ford, 1998
Xenobiotikoak metabolizatzen dituzten entzimen indukzioa	Hamsterra	AHTN	-	CYP3A4 giza entzimaren sustratua, AHTN konposatu zitotoxikoetan bihurtzen da.	Janowski <i>et al.</i> , 1998
Epe luzeko toxikotasuna eta minbizi-sortzailea	Arratoia	HHCB, AHTN	90 egun	Itxuraz efekturik ez.	Steinberg <i>et al.</i> , 1999
Teratogenikoa eta enbriotoxikoa	Arratoia	HHCB	50-500 mg/kg eguneko	Efekturik ez. NOAEL = 50 mg/kg	Christian <i>et al.</i> , 1999
	Arratoia	AHTN	5-50 mg/kg eguneko	Efekturik ez. NOAEL = 5 mg/kg	Christian <i>et al.</i> , 1999
Efektu endokrinoak	Giza zelulak	HHCB, AHTN	Aktibitate estrogenikoaren testa	Aktibitate ahula.	Seinen <i>et al.</i> , 1999

Musketa sintetikoak feromona artifizialak bezala diseinatzen dira, alegia, gizakien arteko informazioa transferitzeko —usainaren bidez—. Hortaz, naturan existitzen ez direnez, xenobiotiko moduan aztertu behar dira. Kontuan izan behar da PCMen helburua horiek daramatzanaren usain-ezaugarriak aldatzeko

—hobetzeko, jakina— helburua dela eta beste gizakien portaera aldatzeko prestatuta daude. Feromona artifizial moduan, ingurugiroa kaltetu dezaketen ezaugarriez gain beste zenbait ere kontuan hartu behar dira (Kallenborn eta Gatermann, 2004): 1) Feromonek goi-mailako bizidunetan sortzen dituzten efektu kaltegarriak, esaterako, portaeraren aldaketa, ugaltze-aparatuan aldaketak eta abar, eta 2) goi-mailako bizidunetan feromonek sor ditzaketen aldaketa endokrinoak: enbrioaren garapena kaltetu, ugalketa-organoen disfuntzioak, eta abar (Covaci *et al.*, 2012).

Egun, PCMen toxikotasunari buruzko ikerketa asko aurki daitezke. Adibidez, Chen eta bere lankideek HHCBk eta AHTNk *Eisenia fetida* lur-zizarearentzat oso toxikoak direla frogatu dute (Chen *et al.*, 2011). 2011ko beste berrikuspen sakon batek PCMen eta beste lurrin sintetiko batzuen toxikotasunari buruzko informazio zehatza jasotzen du (Brausch eta Rand, 2011). Gizakien kasuan musketa polizikloen banaketa eta metabolismoa ondo ezagutzen ez bada ere, PCMe eta horien metabolitoek arrainen (Schreurs *et al.*, 2004), anfibioen (Dietrich eta Hitzfeld, 2004) eta beste ugaztunen (Bitsch *et al.*, 2002) hormona-sistemetan dituzten efektu kaltegarriak frogatuta daude. Horretaz gain, aipatu den bezala, badirudi toxikoak izateaz gain beste konposatu toxikoen efektua areagotzen dutela, kimiosentsibilitatea handiagotuz (Smital *et al.*, 2004).

Bestalde, ikerketa toxikologikoen aburuz, musketa polizikloen toxikotasun akutua nahiko txikia da, arratoien gibelean kalteak sortzen badituzte ere: gibelesko zelulen nekrosia, hantura, zelulen erretikulu endoplasmatikoko eta mitokondrietako kalteak eta gibelaren pisuaren handitzea, besteak beste (Steinberg *et al.*, 1999). Toxikotasun subkronikoari dagokionez, AHTNk nolabaiteko hepatotoxikotasuna eragiten du, baina ez giza-esposizioaren mailetan —esperimentuan 300 µg/kg esposizioa erabili zen, 90 egunetan zehar— (Ford, 1998). AHTNren eta HHCBren genotoxikotasunari buruzko frogak garbiak ez badaude ere, oraindik zalantzak daude puntu horretan. Izan ere, baliteke konposatu horiek genotoxikoak ez izatea baina horien metabolitoak potentzialki genotoxikoak diren konposatuak izatea.

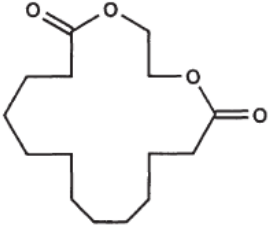

Laburbilduz, eskuragarri dauden datuen arabera musketa sintetikoaren esposizioa giza osasunarentzat kaltegarria izan daiteke nahiz eta datu gabeziaren ondorioz eztabaida zientifiko handiko ondorioa den (Brunn *et al.*, 2004; Covaci *et al.*, 2012; Taylor *et al.*, 2014). Europar Batasunak, SCCNFP batzordearen iritzietan oinarrituta —kontuan izan SCCNFP batzordea egun SCCS (*Scientific Committee on Consumer Safety*) dela— (SCCNFP, 2002a; SCCNFP 2002b; SCCS, 2014) musketa poliziklo batzuen erabilpena onartu du —HHCB, esaterako— eta beste batzuenak debekatu egin du 1223/2009 araudiaren bidez eta aplikazio batzuetarako bakarrik onartzen ditu —AHTNren kasuan, %12 kontzentrazioetik gora arriskutsua izan daitekeela onartzen du SCCNFPk— (European Parliament and European Council 2009).

2.6. Musketa makroziklikoak eta etorkizuneko erronkak

Kapituluaren hasieran musketa naturalen atalean azaldu den bezala, musketa makroziklikoen (MCM) garapena 1926ean hasi zen Ruzickak muskonaren egitura kimikoa deskribatu zuenean (Ruzicka, 1926). Animalia jatorriko musketez gain, landare jatorrikoak ere aurkitu ziren, 15-17 karbonoko musketa makroziklikoak horiek ere. Musketa naturalak, azken finean MCMak zirela ikusi ahal izan zen, baina, azaldu den bezala, hasiera batean laborategiko ekoizpena ez zen ekonomikoki bideragarria.

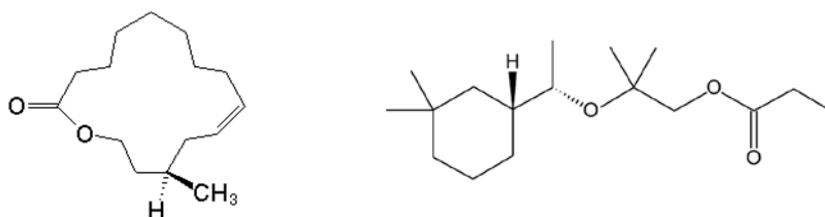
Hala ere, haien ezaugarri bereziak direla-eta —fotoegonkorrak, usain-finkatzaileak, ingurune alkalinoan egonkorak, lurrin kalitate ona, eta abar— musketa makroziklikoak oso interesgarriak ziren lurringintzarentzat. 2.1. Taulan jasotako MCM naturalez gain, laborategian beste zenbait musketa berri sintetizatzea lortu zen, adibidez, etilen brasilato eta Habanolide deiturikoak (2.10. Taula).

2.10. Taula. Musketa makrozikliko sintetikoak.

Izen arrunta / komertziala	CAS izena	CAS zenbakia	Izen kimikoa	Egitura
Musk T, Musk NN, Astratone	1,4-Dioxaziklo- heptadekano- 5,17-diona	105-95-3	Etilen brasilatoa	
Habanolide Globalide	Oxaziklohexa- dezen-2-ona	34902-57-3	Oxaziklohexa- -dezen-2-ona	

MCM horietatik ezagunena etilen brasilato dilaktona ziklikoa da, sintesi erraz eta ekonomikoa duena. Horregatik, hori bai erabili dela kosmetikan MCM moduan. Baina, dena den, orokorrean musketa makroziklikoen sintesia garestia da eta hainbat pausotako erreakzio kimikoak eskatzen dituzte. Ondorioz, nitromusketak eta musketa poliziklikoak izan dira nagusi merkatuan —1996 aurretik, adibidez, musketa makroziklikoak musketa guztien %5a ziren (Sommer, 2004)—. Hala ere,

laborategiko sintesi teknikan eman diren aurrerakuntzei esker eta beste musketa sintetikoek legediak jarritako mugen ondorioz, konposatu makroziklikoak geroz eta erabiliagoak dira kosmetikan. Makroziklikoen kasuan, oraingoz ez dago erabilpen mugarik legediaren ikuspuntutik. Egun, Muszenone eta Nirvanolide musketa makroziklikoak (2.9. Irudia) musketa modernoaren muina dira eta, egun, nitromusketak eta PCMak ordezkatzeko erabiltzen dira.

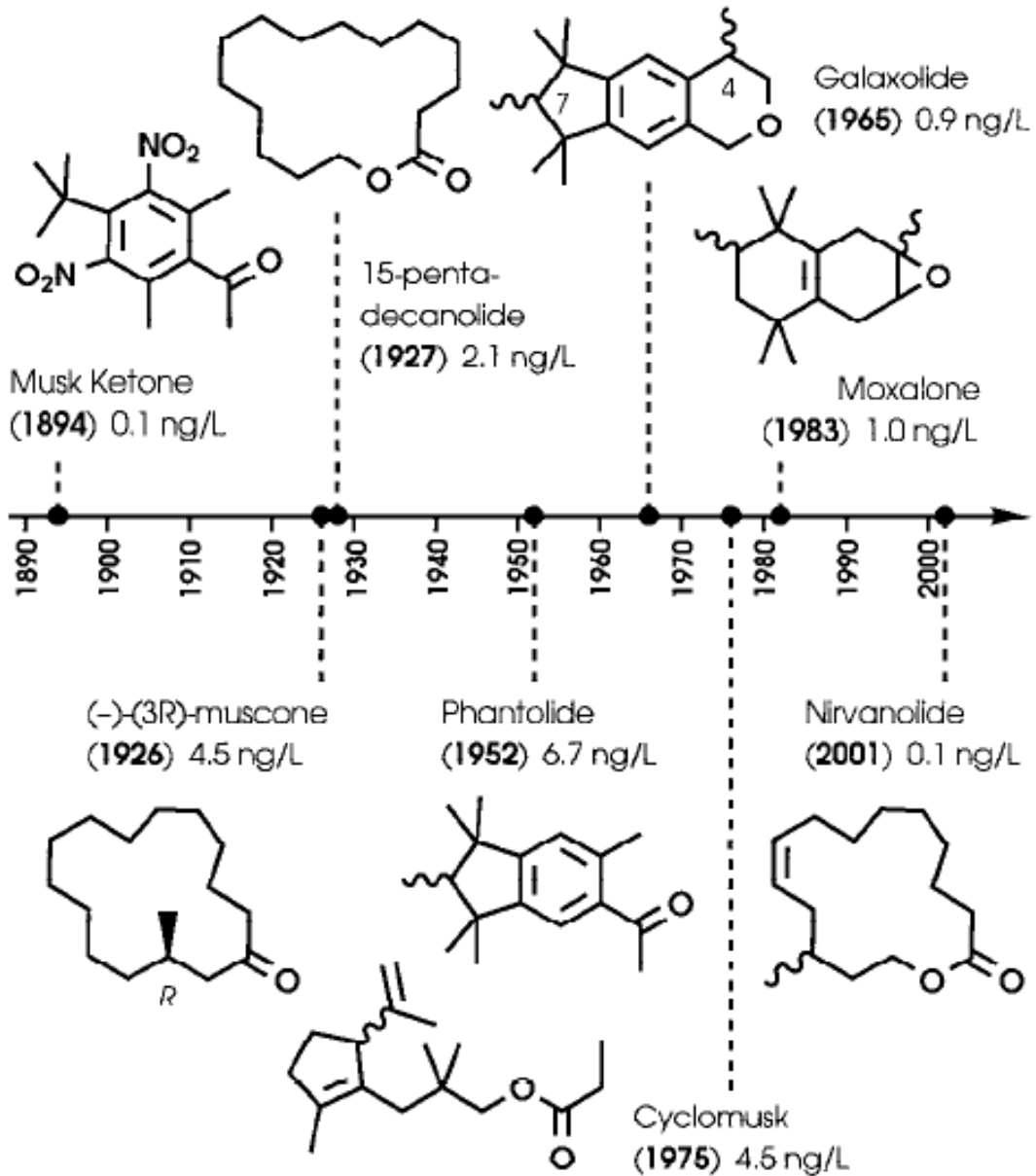


2.9. Irudia. Nirvanolide (ezkerrean) eta Helvetolide (eskuinean).

Azkenik, aipatu behar da musketa makroziklikoak baino aurreratuagoak ere garatzen ari direla ikertzaileak, musketen laugarren belaunaldia deritzona. Horiek musketa aliziklikoak dira —Cyclomusk eta Helvetolide, kasu— (Eh, 2004; Birkbeck, 2010). 2.10. Irudian musketa sintetikoen eboluzioa ikus daiteke, 1890etik hona.

2.7. Musketen analisia kosmetikoetan

Musketa usaina duten lurrinak kosmetikoetan analizatzeko garrantzi berezia du (Bicchi *et al.*, 2006), konposatu horien albo-ondorioak direla-eta, are gehiago nitromusketen kasurako, toxikoagoak baitira. AHTN determinatzeko lehenengotariko metodoa Wisneski eta bere lankideek proposatu zuten GC erabilita (Wisneski *et al.*, 1982). 1985erako, nitromusketa gehienak TLC (*Thin Layer Chromatography*) edo LC-UV/Vis erabiliz determina zitezkeen lurrin finetan (Bruze *et al.*, 1985) eta, beranduago, GC teknikak ere garatu ziren (Sommer, 1993). Eymann eta bere lankideak izan ziren lehenak nitromusketak eta musketa poliziklikoak kosmetikoetan kuantifikatzen (Eymann *et al.*, 1999).



2.10. Irudia. Musketa sintetikoaren eboluzioa. Parentesien artean merkaturatzeko data adierazten da. Irudia: Kraft eta Fráter, 2001.

Hurrengo urteetan egindako ikerkuntzek ere GC erabili ohi zuten baina, kasu horretan MS detektagailua gehituta (Roosens *et al.* 2007), horrela, zainketa pertsonalerako produktuetan (PCP, *Personal Care Products*) MX, MK, HHCB eta AHTN kuantifikatzeko gai izan ziren egileak. Lan interesgarri horretan 82 produktu kosmetiko aztertu zituzten —horietako 19 perfumeak— eta lortutako emaitzak kosmetikoaren erabilpenarekin elkartu zituzten esposizio-patrioiak lortzeko. Kosmetikoetan musketa makroziklikoak determinatzeko metodo analitikoaren kasuan, GC-MS metodologiak proposatu dira gehienetan (Sommer eta Juhl, 2004; Reiner eta Kannan, 2006). Aipagarria da, PCMei dagokienez, elektroforesi kapilarra erabiliz lau PCM kiralen banaketa enantiomerikoa lortu

dela (Martinez-Girón *et al.*, 2010). Era berean, Sanchez-Prado eta bere lankideek GC-MS erabiliz musketen eta beste konposatuaren aldibereko banaketa lortzeko metodo eraginkorra lortu zuten (Sanchez-Prado *et al.*, 2011). 2.11 Taulan azken urteotan musketen analisiari buruz argitaratu diren zenbait artikulu interesgarri jaso dira.

2.11. Taula. Produktu kosmetikoetan musketak analizatzeko metodoen laburpena.

Laginak	Analitoak	Metodo analitikoaren laburpena	Erref.
Gelak, ilarako produktuak, xaboiak, azalerako produktuak, desodoranteak, hortzetako pastak	DPMI, ADBI, AHMI, HHCB, AHTN, MA, MX, MM, MT, MK	Erauzketa pausoa GC-MS	Homem <i>et al.</i> , 2013
Perfumeak	AHTN, HHCB, ATII	Aurretratamendurik ez NAMEKC-DAD ^a	Lopez-Gazpio <i>et al.</i> , 2012
Hortzetako pastak, ilarako produktuak, xaboiak, azalerako kremak, makillaje produktuak	HHCB, AHTN, MK, MX, HHCB-laktona	Disolbatzaile organikoekin erauzketa SPE ^b GC-MS	Lu <i>et al.</i> , 2011
Perfumeak	DPMI, ADBI, HHCB, AHMI, AHTN, ATII, MA, MK, MM, MT, MX, Ambrettolide	Aurretratamendurik ez GC-MS	Sanchez-Prado <i>et al.</i> , 2011
Perfumeak	HHCB, AHMI, AHTN, ATII	Hexanoarekin erauzketa SPE CE	Martinez-Girón <i>et al.</i> , 2010
Hortzetako pastak, ilarako produktuak, xaboiak, gelak, azalerako kremak, desodoranteak	DPMI, ADBI, HHCB, AHMI, AHTN, ATII, MK, MX	Silize-zutabearen garbiketa GC-MS	Zhang <i>et al.</i> , 2008
Perfumeak, ilarako produktuak, gelak, azalerako kremak, desodoranteak	HHCB, AHTN, MK, MX	Hexanoarekin erauzketa SPE GC-MS	Roosens <i>et al.</i> , 2007
Perfumeak, ilarako produktuak, gelak, desodoranteak	HHCB, AHTN, HHCB-laktona	Hexanoarekin erauzketa GC-MS	Reiner eta Kannan, 2006

^a*Nonaqueous Micellar Electrokinetic Chromatography – Diode Array Detector*

^b*Solid Phase Extraction*

2.8. Resumen traducido: Almizcles

1. Introducción

Desde la Antigüedad se han utilizado glándulas y secreciones animales como elementos muy valiosos en perfumería. Ya durante la Dinastía Sung (siglos X a XIII) los comerciantes chinos intercambiaban seda y armas por estas secreciones aromáticas, que se valoraban incluso más que el oro. El almizcle (*musk*) es uno de ellos, denominación que se utiliza para designar un amplio grupo de fragancias y que proviene del nombre de un animal, el ciervo almizclero (*Moschus moschiferus*, Figura 2.1.)

Pie de figura 2.1. (2.1. Irudia): Ciervo almizclero (Moschus moschiferus). Figura: R.A. Hill, 2007.

Las fragancias de almizcle pueden dividirse en tres grandes grupos, que se analizarán a continuación: almizcles nitroaromáticos (NMs, *Nitro-aromatic Musks*), almizcles policíclicos (PCMs, *Polycyclic Musks*) y almizcles macrocíclicos (MCMs, *Macrocyclic Musks*). Compuestos representativos de los dos primeros grupos han sido y son utilizados ampliamente en la industria, añadiéndolos a cosméticos (p. ej. perfumes, jabones y cremas) y a detergentes. La detección de nitroalmizcles en peces y humanos (leche y grasa) inició un debate público sobre el uso de estas fragancias. Los compuestos policíclicos fueron reemplazando poco a poco a los nitroaromáticos, que también se detectaron en muestras humanas y ambientales (Sommer, 2004).

2. Almizcles naturales

El almizcle natural es una secreción glandular del ciervo almizclero macho (*Moschus moschiferus*) y ha sido utilizado como fragancia durante siglos. El ciervo almizclero es similar al ciervo común, que mide aproximadamente 60 cm y pesa entre 10 y 13 kg. Habita en los bosques de montañas de al menos 13 países del sur y del este de Asia (India, Tíbet, China y Mongolia, entre otros), y en la parte este de Rusia. El intenso olor de esta secreción es utilizado por el ciervo para marcar territorio y para atraer a las hembras a larga distancia. Para obtener la secreción el animal tiene que ser cazado y matado (Rimmel, 1988). Una vez sacrificado el animal se retira la glándula situada entre el abdomen y los genitales (Figura 2.2.), que una vez limpia y secada al sol puede abrirse para extraer con alcohol la fragancia, que se usaba directamente en perfumería una vez diluida oportunamente.

Pie de figura 2.2. (2.2. Irudia): Glándulas del ciervo almizclero.

El almizcle natural ya era conocido en la antigua China y era un producto de extraordinaria importancia cultural, además de ser utilizado como droga y medicamento. A pesar de su elevado coste, el almizcle natural fue utilizado en perfumería hasta 1979, año en el que la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES, por sus siglas en inglés) y leyes nacionales complementarias protegieron al ciervo almizclero de la extinción. El comercio de almizcle proveniente de Afganistán, Bután, India, Myanmar, Nepal y Pakistán se prohibió y las importaciones provenientes de otros países están restringidas y controladas. No obstante, el almizcle continúa siendo utilizado en la medicina tradicional china en cantidad superior a la permitida por la CITES, a razón de 500-1.000 kg anuales suponiendo la muerte de 100.000 animales. En la Unión Europea, después de la prohibición de comercio con China y Rusia en 1999, se ha erradicado el uso de almizcle natural, siendo Francia el único país que lo utiliza, aunque la cantidad anual estaría en el rango de pocos kilogramos.

Desde un punto de vista químico, la pregunta de cuál es el compuesto responsable del característico olor a almizcle siempre estuvo presente en la mente de los científicos de aromas y fragancias, con la idea de que esto podría posibilitar su síntesis en el laboratorio. La respuesta la encontró en 1906 H. Walbaum de Schimmel & Co., la mayor industria productora de fragancias de la época, cuando consiguió aislar una cetona de fórmula $C_{16}H_{30}O$ de la glándula del ciervo almizclero (Walbaum, 1906). Llamó muscona a dicho compuesto, causante principal del olor a almizcle y cuyo contenido en la glándula está entre 0,5 y 2%. No obstante, Walbaum desconocía la estructura química de la muscona y no fue hasta 1926 cuando L. Ruzicka la pudo determinar llegando a la conclusión de que la muscona era 3-metilciclopentadecan-1-ona, un compuesto macrocíclico (Ruzicka, 1926). También caracterizó en el mismo estudio la civetona, extracto con olor a almizcle proveniente de la civeta, como cicloheptadecen-1-ona, confirmando por síntesis ambas estructuras. La elucidación estructural de estos y otros compuestos similares provenientes de animales y de plantas (Ambrettolide, Exaltolide, Exaltone) fue el descubrimiento de un nuevo tipo de compuestos: los almizcles macrocíclicos

La importancia de estas fragancias macrocíclicas estimuló el desarrollo de rutas sintéticas mejoradas, para satisfacer las exigencias de la industria de las fragancias. No obstante, los compuestos macrocíclicos no cumplieron las expectativas que en ellos se habían puesto, ya que el coste seguía siendo elevado, debido en parte a los escasos rendimientos (Pilz, 1997). No ha sido hasta muchos años después cuando los compuestos macrocíclicos han podido competir con los almizcles nitroaromáticos o policíclicos, mucho más económicos y sencillos de obtener.

3. Almizcles nitroaromáticos

El primer almizcle sintético, perteneciente al grupo de almizcles nitroaromáticos, fue sintetizado por Albert Baur en 1888, años antes de las investigaciones sobre almizcles macrocíclicos naturales a las que se hacía referencia en el apartado anterior. La síntesis, o más bien, el descubrimiento del olor de la molécula fue absolutamente casual. Y es que Baur pretendía buscar nuevos explosivos, derivados del trinitrotolueno (TNT), cuando se percató de que de uno de los productos que había obtenido emanaba un olor agradable, dulce y almizclado. Se trataba del que más tarde se conocería como almizcle de Baur (*Musk Baur*) sintetizado a partir de la alquilación vía reacción de Friedel-Crafts del TNT con un haluro de *tert*-butilo (Baur, 1891).

El almizcle de Baur se introdujo en el mercado como solución de acetanilida al 10%, que costaba en aquella época en torno a 500 \$/kg, reduciendo a la mitad el coste del almizcle natural. El éxito comercial fue tal que llevó a Baur a continuar sus investigaciones, descubriendo tres nuevos compuestos: el almizcle de cetona (MK, *Musk Ketone*), el almizcle de xileno (MX, *Musk Xylene*) y el almizcle de abelmosco (MA, *Musk Ambrette*) (Baur, 1894; Baur, 1898). Estos tres almizcles nitroaromáticos dominaron el mercado durante los siguientes 50 años.

Por su olor y su capacidad como fijadores en perfumería, y especialmente por su bajo coste, estos compuestos sintéticos fueron muy apreciados y se produjeron en grandes cantidades a lo largo del siglo XX. No obstante, a partir de la década de los 80 su producción empezó a disminuir, debido a que comenzaron las voces críticas con respecto a los nitroalmizcles. Esto se debió en parte a una serie de informes sobre la fototoxicidad y neurotoxicidad de compuestos como el almizcle de abelmosco (Barbetta *et al.*, 1988). Por otra parte, en 1981 el almizcle de cetona y el de xileno fueron detectados por primera vez en peces y aguas de ríos en Japón (Yamagishi *et al.*, 1981), poniendo de manifiesto su potencial de bioacumulación en organismos acuáticos y su persistencia (Hahn, 1993; Rimkus y Wolf, 1993).

Tras varios informes de la FDA llegaron a resultados similares, la industria de las fragancias mostró la conformidad con la recomendación que había hecho en 1985 la IFRA de no utilizar almizcle de abelmosco en cosméticos que fueran a estar en contacto con la piel, siendo utilizada sólo en algunos casos aislados. Siguiendo las recomendaciones del SCCNFP, la Unión Europea ha impuesto límites al uso de almizcle de cetona y de xileno, que están incluidos en el anexo III de sustancias cuyo uso está restringido (European Parliament and European Council, 2009). Por su parte, la IFRA es algo más estricta en sus recomendaciones, prohibiendo el uso de almizcle de xileno como fragancia (IFRA 47th Amendment de 2013) y especificando que el almizcle de cetona sólo se deberá utilizar si contiene menos de un 0,1% de almizcle de xileno como excipiente (IFRA, 2014).

En el informe del SCCNFP (*Scientific Committee on Cosmetic products and Non-Food Products intended for consumers*) de 2004 (SCCNFP, 2004) se clasifica el

almizcle de xileno como cancerígeno de categoría 3, es decir, como sustancia cuyo posible efecto cancerígeno en el hombre es preocupante, pero de la que no se dispone de información suficiente para realizar una evaluación satisfactoria, aunque produce tumores en el hígado de ratones. También se indica que es un compuesto muy tóxico para los organismos acuáticos, y puede producir efectos adversos a largo plazo en ecosistemas acuáticos. Sobre el almizcle de cetona no existen estudios sobre su carcinogenicidad en el informe, aunque por su similitud con MX se clasifica del mismo modo. El intenso debate generado en lo referente a los nitroalmizcles, así como su demostrada toxicidad (neurotoxicidad) (Brunn *et al.*, 2004), fototoxicidad y el impacto ambiental que causan por su escasa biodegradabilidad y bioacumulación han hecho que MK y MX hayan ido cayendo en desuso en la industria.

4. Almizcles policíclicos

A mediados del siglo XX, la industria de las fragancias ya buscaba alternativas a los compuestos nitroaromáticos, aunque no precisamente por su toxicidad. El hecho es que los compuestos nitro presentaban una elevada reactividad fotoquímica y no eran estables en medios alcalinos, por lo que causaban problemas de decoloración y no podían ser utilizados en algunos productos de perfumería funcional (detergentes y productos de lavandería), un mercado de enorme potencial. En 1948 M.S. Carpenter sintetizó el primer compuesto libre de grupos nitro con olor a almizcle, conocido como Ambral (Carpenter *et al.*, 1951) aunque nunca llegó a comercializarse. Este compuesto, así como la estructura del almizcle mosqueno, que puede considerarse el puente entre los nitroalmizcles y los almizcles policíclicos (PCMs), llevó a los científicos a investigar otro tipo de estructuras que pudieran ser introducidas al mercado.

El primer compuesto libre de grupos nitro en comercializarse fue descubierto por K. Fuchs en 1951 y se introdujo al mercado un año más tarde con el nombre de Phantolide (AHDI), que fue el precursor de una larga serie de PCMs, mostrados en la tabla 2.5.: Traseolide (ATII), Celestolide (ADBI), Tonalide (AHTN), Versalide (ATTN) y el almizcle derivado del isocromano Galaxolide (HHCB) como culminación de la evolución en cuanto a estabilidad e hidrofobicidad (Kraft, P., 2005a). Este grupo de compuestos es el que más interesa desde el punto de vista de la presente tesis, pues son tres de ellos (ATII, HHCB y AHTN) los que se determinarán en perfumes en la parte experimental.

Encabezado de la Tabla 2.5. (2.5. Taula): Almizcles policíclicos (PCMs). Izen arrunta / komertziala: Nombre común / comercial; CAS izena: Nombre CAS; CAS zenbakia: número CAS; Izen kimikoa (laburdura): Nombre químico (abreviatura); Egitura: Estructura.

Los PCMs tienen unas propiedades olfativas atractivas, ya que además de aportar su característico olor a un perfume son capaces de fijar otros olores. Esta capacidad fijadora es muy importante en las composiciones cosméticas, pues ayuda a que los compuestos más volátiles queden retenidos durante más tiempo y el perfume no pierda sus características (Sell, 2006).

Comparados con los almizcles macrocíclicos, la síntesis de PCMs es más barata y comparados con los nitroalmizcles los PCMs son superiores en términos de estabilidad, por lo que su uso ha ido en aumento al mismo tiempo ha decrecido la producción de nitroalmizcles. Desde el punto de vista comercial, Galaxolide (HHCB) y Tonalide (AHTN) son los compuestos más relevantes, seguidos por Traseolide (ATII) y Celestolide (ADBI). Se estima que los dos primeros aglutinan el 95% de la producción de almizcles policíclicos. En 2001 (no se han obtenido datos fiables más actualizados) el volumen de producción de HHCB rondaba las 7.000-8.000 toneladas (Gautschi *et al.*, 2001).

5. Toxicidad de los almizcles policíclicos

Como consecuencia del uso masivo en la industria cosmética de PCMs y especialmente de Galaxolide y Tonalide, su impacto ambiental no tardó en llegar. A causa de su excelente estabilidad química, reducida biodegradabilidad y elevado coeficiente de reparto octanol/agua, como muestra de su gran capacidad de bioconcentración en tejidos grasos y adsorción a suelos y sedimentos, los PCMs se han bioacumulado en peces y otros organismos acuáticos, sedimentos (Rimkus, 1999; Fromme *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2013), así como en grasa y leche humana (Liebl y Ehrenstorfer, 1993; Rimkus y Wolf, 1996). Información más extensa y detallada sobre la presencia de almizcles sintéticos en el medio ambiente puede encontrarse en el recomendable libro editado por Rimkus (Rimkus, 2004).

En cuanto a la toxicidad de los PCMs, y especialmente de Galaxolide y Tonalide, existen estudios que demuestran su papel como inhibidores de la resistencia multixenobiótica (MXR, *MultiXenobiotic Resistance*) en organismos acuáticos (Luckenbach *et al.*, 2004). Estudios recientes sobre el riesgo medioambiental han determinado que su concentración está por encima de la PNEC (*Predicted No-Effect Concentration*) (Matamoros y Bayona, 2006). Existen investigaciones sobre la toxicidad de los PCMs en distintos organismos; por ejemplo, se ha determinado que HHCB y AHTN son altamente tóxicos para la lombriz de tierra (*Eisenia fetida*) (Chen *et al.*, 2011). Otra revisión de 2011 aporta información sobre los niveles de toxicidad de PCMs y otras fragancias sintéticas en peces e invertebrados (Brausch y Rand, 2011). Aunque los datos sobre la distribución y el metabolismo de PCMs en humanos son escasos (Brunn *et al.*, 2004), sí que existen evidencias sobre el efecto que causan los almizcles policíclicos y sus metabolitos en el sistema de comunicación hormonal en peces (Schreurs *et al.*, 2004), anfibios (Dietrich y Hitzfeld, 2004) y mamíferos (Bitsch *et al.*, 2002), y además podrían acelerar o

aumentar los efectos de la exposición a otros compuestos químicos tóxicos, aumentando la quimiosensibilidad (Smital *et al.*, 2004).

Estudios toxicológicos concluyen, no obstante, que la toxicidad aguda es relativamente baja para los almizcles policíclicos, aunque produce daños en el hígado de las ratas: necrosis de células del hígado, inflamación, daños en el retículo endoplasmático celular y en las mitocondrias y un aumento del peso relativo del hígado (Steinberg *et al.*, 1999). En cuanto a la toxicidad subcrónica, AHTN presenta una cierta hepatotoxicidad en ratas aunque no a las concentraciones de exposición (Ford, 1998). Como conclusión, teniendo en cuenta todos los datos disponibles, la exposición a almizcles sintéticos podría suponer un riesgo para la salud humana, aunque debido a la escasez de evidencias científicas resulta un tema de gran controversia (Brunn *et al.*, 2004; Covaci *et al.*, 2012; Taylor *et al.*, 2014). Por su parte, tras el informe de evaluación del comité SCCNFP (SCCNFP, 2002a; SCCNFP, 2002b; SCCS, 2014), la Unión Europea ha restringido el uso de algunos PCMs (European Parliament and European Council, 2009).

6. Almizcles macrocíclicos y retos del futuro

Los almizcles macrocíclicos (MCM, *MacroCyclic Musk*) comenzaron a desarrollarse con la caracterización estructural de la muscona por parte de Ruzicka en 1926 (Ruzicka, 1926), que ya se ha mencionado con anterioridad en el apartado de los almizcles naturales. Y es que los almizcles naturales de los que se ha hablado son en realidad MCMs de origen natural, pero su estructura química se pudo elucidar y fue posible sintetizarlos en el laboratorio. A grandes rasgos, la síntesis de compuestos macrocíclicos era compleja y en la mayoría de los casos requerían reacciones de múltiples etapas. Debido a estos costes relativamente elevados y a la posibilidad del mercado de acceder a otros almizcles (NMs y PCMs) su importancia estuvo limitada. En 1996 sólo el 5% de compuestos sintéticos de almizcle producidos correspondía a MCMs (Sommer, 2004).

Por último, en cuanto a las nuevas fronteras en la síntesis de almizcles, se espera que la industria de las fragancias ponga un énfasis especial en el desarrollo de almizcles macrocíclicos y de otras familias de almizcles. Uno de los grupos prometedores de cara al futuro es el de los almizcles alicíclicos, con Cyclomusk y Helvetolide como sus máximos exponentes (Kraft *et al.*, 2000). En la Figura 2.10. se muestra la evolución de las fragancias de almizcle hasta la actualidad. El futuro mostrará qué nuevos compuestos serán los que satisfagan las necesidades de la industria de las fragancias del tan deseado olor a almizcle.

Pie de figura 2.10. (2.10. Irudia): Evolución de los almizcles sintéticos, entre paréntesis se indica la fecha de comercialización. Figura: Kraft y Fráter, 2001.

Tabla 2.11. Resumen de métodos para el análisis de almizcles en productos cosméticos.

Muestras	Analitos	Resumen del método analítico	Ref.
Geles, productos para el pelo, jabones, productos para la piel, desodorantes, pastas dentífricas	DPMI, ADBI, AHMI, HHCB, AHTN, MA, MX, MM, MT, MK	Extracción GC-MS	Homem <i>et al.</i> , 2013
Perfumes	AHTN, HHCB, ATII	Sin pretratamiento NAMEKC-DAD ^a	Lopez-Gazpio <i>et al.</i> , 2012
Pastas dentífricas, productos para el pelo, jabones, productos para la piel, productos de maquillaje	HHCB, AHTN, MK, MX, HHCB-lactona	Extracción con disolventes orgánicos SPE ^b GC-MS	Lu <i>et al.</i> , 2011
Perfumes	DPMI, ADBI, HHCB, AHMI, AHTN, ATII, MA, MK, MM, MT, MX, Ambrettolide	Sin pretratamiento GC-MS	Sanchez-Prado <i>et al.</i> , 2011
Perfumes	HHCB, AHMI, AHTN, ATII	Extracción con hexano SPE CE	Martinez-Girón <i>et al.</i> , 2010
Pastas dentífricas, productos para el pelo, jabones, geles, cremas para la piel, desodorantes	DPMI, ADBI, HHCB, AHMI, AHTN, ATII, MK, MX	Limpieza en columna de sílice GC-MS	Zhang <i>et al.</i> , 2008
Perfumes, productos para el pelo, geles, cremas para la piel, desodorantes	HHCB, AHTN, MK, MX	Extracción con hexano SPE GC-MS	Roosens <i>et al.</i> , 2007
Perfumes, productos para el pelo, geles, desodorantes	HHCB, AHTN, HHCB-lactona	Extracción con hexano GC-MS	Reiner eta Kannan, 2006

^a*Nonaqueous Micellar Electrokinetic Chromatography – Diode Array Detector*

^b*Solid Phase Extraction*

7. Análisis de almizcles en cosméticos

La determinación de almizcles tiene una importancia especial debido a los efectos secundarios que pueden causar (Bicchi *et al.*, 2006), especialmente los nitroalmizcles, mencionados con anterioridad. Uno de los primeros métodos analíticos para la determinación de AHTN fue propuesto por Wisneski y

colaboradores (Wisneski *et al.*, 1982) utilizando GC. La mayoría de nitroalmizcles se podían determinar por TLC (*Thin Layer Chromatography*) o LC-UV/VIS en fragancias finas (Bruze *et al.*, 1985) y posteriormente por GC en cosméticos (Sommer, 1993). En 1999 se cuantificaron por primera vez de forma simultánea almizcles nitroaromáticos y policíclicos (Eymann *et al.*, 1999) en productos para el cuidado personal (PCPs, *Personal Care Products*). Otras investigaciones más recientes también se sirven también de GC para la separación, aunque incorporando el detector de masas, para la determinación de MX, MK, HHCB y AHTN en productos para el cuidado personal (Roosens *et al.*, 2007). Para la determinación de almizcles macrocíclicos en cosméticos, también se han propuesto métodos de GC-MS (Sommer y Juhl, 2004; Reiner y Kannan, 2006). Cabe destacar también la enantioseparación de cuatro PCMs quirales (Martinez-Girón *et al.*, 2010) y la separación simultánea de PCMs y otros ingredientes lograda por Sanchez-Prado y colaboradores (Sanchez-Prado *et al.*, 2011). Se recoge en la tabla 2.11. una revisión de metodologías analíticas para la determinación de almizcles publicadas desde 2006.

2.9. Erreferentziak / Referencias

Artola-Garicano, E.; Borkent, I.; Hermens, J.L.M.; Vaes, W.H.J.: *Removal of Two Polycyclic Musks in Sewage Treatment Plants: Freely Dissolved and Total Concentrations*, Environmental Science and Technology, 37, 3111-3116, 2003.

Barbetta, L.; Trowbridge, T.; Eldib, I.A.: *Musk Aroma Chemical Industry*, Perfumer & Flavorist, 13, 60-61, 1988.

Barbier, H.: *Les tert-Butyl-Cymènes et leurs Produits de Nitration*, Helvetica Chimica Acta, 15, 592-596, 1932.

Baur, A.: *Studien über den Künstlichen Moschus*, Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft, 24, 2832-2843, 1891.

Baur, A.: *Über die Phenole des Butyltoluols und Dessen Aether*, Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft, 27, 1614-1619, 1894.

Baur, A.: *Über Keton Moschus*, Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft, 31, 1344-1349, 1898.

Bicchi, C.; Rubiolo, P.; Cordero, C.: *Separation Science in Perfume Analysis*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 384, 53-56, 2006.

Birkbeck, A.A.: *Challenges in the Synthesis of Natural and Non-Natural Volatiles*. In Herrmann, A.: *The Chemistry and Biology of Volatiles*, Wiley, West Sussex, 2010, 173-202.

Bitsch, N.; Dudas, C.; Körner, W.; Failing, K.; Biselli, S.; Rimkus, G.G.; Brunn, H.: *Estrogenic Activity of Musk Fragrances Detected by the E-Screen Assay Using Human MCF-7 Cells*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 43, 257-264, 2002.

Brausch, J.M.; Rand, G.M.: *A Review of Personal Care Products in the Aquatic Environment: Environmental Concentrations and Toxicity*, Chemosphere, 82, 1518-1532, 2011.

Brunn, H.; Bitsch, N.; Amberg-Müller, J.: *Toxicology of Synthetic Musk Compounds in Man and Animals*. In Rimkus, G.G.: *Synthetic Musk Fragrances in the Environment*, Springer, Berlin, 2004, 259-280.

Bruze, M.; Edman, B.; Niklasson, B.; Moller, H.: *Thin Layer Chromatography and High Pressure Liquid Chromatography of Musk Ambrette and Other Nitromusk Compounds Including Photopatch Studies*, *Photodermatology*, 2, 295-302, 1985.

Carballa, M.; Omil, F.; Lema, J.M.: *Removal of Cosmetic Ingredients and Pharmaceuticals in Sewage Primary Treatment*, *Water Research*, 41, 2139-2150, 2005.

Carpenter, M.S.; Easter, W.M.; Wood, T.F.: *Nitro Musks I. Isomers, Homologs and Analogs of Musk Ambrette*, *Journal of Organic Chemistry*, 16, 586-617, 1951.

Chen, C.; Zhou, Q.; Liu, S.; Xiu, Z.: *Acute Toxicity, Biochemical and Gene Expression Responses of the Earthworm *Eisenia fetida* Exposed to Polycyclic Musks*, *Chemosphere*, 83, 1147-1154, 2011.

Christian, M.S.; Parker, R.M.; Hoberman, A.M.; Diener, R.M.; Api, A.M.: *Developmental Toxicity Studies of Four Fragrances in Rats*, *Toxicology Letters*, 111, 169, 1999.

Covaci, A.; Geens, T.; Roosens, L.; Ali, N.; Van den Eede, N.; Ionas, A.C.; Malarvannan, G.; Dirtu, A.C.: *Human Exposure and Health Risks to Emerging Organic Contaminants. In Barceló, D.: Emerging Organic Contaminants and Human Health, The Handbook of Environmental Chemistry*, Springer, Heidelberg, 2012, 243-305.

Dietrich, D.R.; Hitzfeld, B.C.: *Bioaccumulation and Ecotoxicity of Synthetic Musks in the Aquatic Environment. In Rimkus, G.G.: Synthetic Musk Fragrances in the Environment*, Springer, Berlin, 2004, 233-244.

Eh, M.: *New Alicyclic Musks: The Fourth Generation of Musk Odorants*, *Helvetica Chimica Acta*, 1, 1975-1984, 2004.

European Parliament; European Council: *Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on Cosmetic Products (recast)*, *Official Journal of the European Union*, L342, 59-209, 2009.

Eymann, W.; Roux, B.; Zehring, M.: *Rapid Determination of Nitro Musk and Polycyclic Musk Compounds in Cosmetics with Gas Chromatography*, *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung*, 90, 318-324, 1999.

Fernandes, D.; Dimastrogiovanni, G.; Blázquez M.; Porte, C.: *Metabolism of the Polycyclic Musk Galaxolide and its Interference with Endogenous and Xenobiotic*

Metabolizing Enzymes in the European Sea Bass (Dicentrarchus labrax), Environmental Pollution, 174, 214-221, 2013.

Ford, F.A.: *The Safety of Nitromusks in Fragrances. A Review*, Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 94, 192-268, 1998.

Fráter, G.; Müller, U.; Kraft, P.: *Preparation and Olfactory Characterization of the Enantiomerically Pure Isomers of the Perfumery Synthetic Galaxolide*, Helvetica Chimica Acta, 82, 1656-1665, 1999.

Fromme, H.; Otto, H.; Pilz, K.: *Polycyclic Musk Fragrances in Different Environmental Compartments in Berlin (Germany)*, Water Research, 35, 121-128, 2001.

Fuson, R.C.; Mills, J.; Klose, T.G.; Carpenter, M.S.: *The Structures of Musk Ketone and Musk Tibetene*, Journal of Organic Chemistry, 12, 587-595, 1947.

Gautschi, M.; Bajgrowicz, J.A.; Kraft, P.: *Fragrance Chemistry, Milestones and Perspectives*, Chimia, 55, 379-387, 2001.

Hahn, J.: *Occurrence of Musk Xylene in Fish*, Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 89, 175, 1993.

Homem, V.; Silva, J.A.; Cunha, C.; Alves, A.; Santos, L.: *New Analytical Method for the Determination of Musks in Personal Care Products by Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe Extraction Followed by GC-MS*, Journal of Separation Science, 36, 2176-2184, 2013.

Hond, E.D.; Paulussen, M.; Geens, T.; Bruckers, L.; Baeyens, W.; David, F.; Dumont, E.; Loots, I.; Morrens, B.; de Belleaux, B.N.; Nelen, V.; Schoeters, G.; Larebeke, N.V.; Covaci, A.: *Biomarkers of Human Exposure to Personal Care Products: Results from the Flemish Environment and Health Study (FLESH 2007-2011)*, Science of the Total Environment, 463-464, 102-110, 2013.

International Fragrance Association (IFRA), <http://www.ifraorg.org>, 2014 (last access: 2014/07/01).

Janzowski, C.; Burkart, M.; Vetter, A.; Eisenbrand, G.: *In Vitro Toxicity and Microsomal Metabolism of the Polycyclic Musk Fixolide and Crysolide*, Lebensmittelchemie, 52, 71, 1998.

Kallenborn, R.; Gatermann, R.: *Synthetic Musk in Ambient and Indoor Air*. In Rimkus, G.G.: *Synthetic Musk Fragrances in the Environment*, Springer, Berlin, 2004, 85-104.

Kansy, M.; Ulmschneider, M.; van de Waterdeemd, H.: *3D Structural Databases in the Olfactophore Generation of Musk Odor*. In Sanz, F.; Giraldo, J.; Manaut F.: *QSAR and Molecular Modelling: Concepts, Computational Tools and Biological Applications*, Prous Science Publishers, Barcelona, 1995, 633-638.

King, A.H.: *The Musk Trade and the Near East in the Early Medieval Period*, ProQuest LLC, Ann Arbor, 2007.

Kraft, P.: *Aroma Chemicals IV: Musks*. In Rowe, D.J.: *Chemistry and Technology of Flavors and Fragrances*, Blackwell Publishing Ltd, Oxford, 2005a, 144-168.

Kraft, P.: "Brain Aided" Musk Design. In Kraft, P.; Swift, K.A.D.: *Perspectives in Flavor and Fragrance Research*, Wiley-VCH, Weinheim, 2005b, 127-144.

Kraft, P.; Fráter, G.: *Enantioselectivity of the Musk Odor Sensation*, Chirality, 13, 388-394, 2001.

Liebl, B.; Ehrenstorfer, S.: *Nitro Musks in Human Milk*, Chemosphere, 27, 2253-2260, 1993.

Lopez-Gazpio, J.; Garcia-Arrona, R.; Ostra, M.; Millán, E.: *Optimization and Validation of a Nonaqueous Micellar Electrokinetic Chromatography Method for Determination of Polycyclic Musks in Perfumes*, Journal of Separation Science, 35, 1344-1350, 2012.

Lu, Y.; Yuan, T.; Wang, W.; Kannan, K.: *Concentrations and Assessment of Exposure to Siloxanes and Synthetic Musks in Personal Care Products from China*, Environmental Pollution, 159, 3522-2528, 2011.

Luckenbach, T.; Corsi, I.; Epel, D.: *Fatal Attraction: Synthetic Musks Fragrances Compromise Multixenobiotic Defense Systems in Mussels*, Marine Environmental Research, 58, 215-219, 2004.

Martinez-Girón, A.B.; Crego, A.L.; Gonzalez, J.M.; Marina M.L.: *Enantiomeric Separation of Chiral Polycyclic Musks by Capillary Electrophoresis: Application to the Analysis of Cosmetic Samples*, Journal of Chromatography A, 1217, 1157-1165, 2010.

Matamoros, V.; Bayona, J.M.: *Elimination of Pharmaceutical and Personal Care Products in Subsurface Flow Constructed Wetlands*, Environmental Science and Technology, 40, 5811-5816, 2006.

OSPAR: *OSPAR Background Document on Musk Xylene and Other Musks*, OSPAR Commission, 2004.

Paasivirta, J.; Sinkkonen, S.; Rantalainen, A.L.; Broman, D.; Zebuhr, Y.: *Temperature Dependent Properties of Environmentally Important Synthetic Musks*, Environmental Science and Pollution Research International, 9, 345-355, 2002.

Pilz, W.: *SEPAWA Conference Proceedings*, 43, 1997.

Ramírez, N.; Marcé, R.M.; Borrull, F.: *Development of a Thermal Desorption Gas Chromatography-Mass Spectrometry Method for Determining Personal Care Products in Air*, Journal of Chromatography A, 1217, 4430-4438, 2010.

Reiner, J.L.; Kannan, K.: *A Survey of Polycyclic Musks in Selected Household Commodities from the United States*, Chemosphere, 62, 867-873, 2006.

Ren, Y.; Wei, K.; Liu, H.; Sui, G.; Wang, J.; Sun, Y.; Zheng, X.: *Occurrence and Removal of Selected Polycyclic Musks in Two Sewage Treatment Plants in Xi'an, China*, Frontiers of Environmental Science & Engineering, 7, 166-172, 2013.

Rimkus, G.G.: *Polycyclic Musk Fragrances in the Aquatic Environment*, Toxicology Letters, 111, 37-56, 1999.

Rimkus, G.G.: *Synthetic Musk Fragrances in the Environment*, Springer, Berlin, 2004.

Rimkus, G.G.; Wolf, M.: *Residues and Contaminants in Fish from Aquaculture, Part 2, Detection of Musk Xylene and Musk Ketone in Fish*, Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 89, 171-175, 1993.

Rimkus, G.G.; Wolf, M.: *Polycyclic Musk Fragrances in Human Adipose Tissue and Human Milk*, Chemosphere, 33, 2033-2043, 1996.

Rimkus, G.G.; Gatermann, R.; Huhnerfuss, H.: *Musk Xylene and Musk Ketone Amino Metabolites in the Aquatic Environment*, Toxicology Letters, 111, 5-15, 1999.

Rimmel, E.: *Das Buch des Parfums*, Verlag Ullstein, Berlin, 1988.

Roosens, L.; Covaci, A.; Neels, H.: *Concentrations of Synthetic Musk Compounds in Personal Care and Sanitation Products and Human Exposure Profiles Through Dermal Application*, Chemosphere, 69, 1540-1547, 2007.

Ruzicka, L.: *Zur Kenntnis des Kohlenstoffringes VII, Über die Konstitution des Muscons*, Helvetica Chimica Acta, 9, 715-729, 1926.

Sanchez-Prado, L.; Llompart, M.; Lamas, J.P.; Garcia-Jares, C.; Lores, M.: *Multicomponents Analytical Methodology to Control Phthalates, Synthetic Musks, Fragrance Allergens and Preservatives in Perfumes*, Talanta, 85, 370-379, 2011.

Schreurs, R.H.M.M.; Legler, J.; Artola-Garicano, E.; Sinnige, T.L.; Lanser, P.H.; Seinen, W.; van der Burg, B.: *In Vitro and in Vivo Antiestrogenic Effects of Polycyclic Musks in Zebrafish*, Environmental Science and Technology, 38, 997-1002, 2004.

Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS), http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/index_en.htm, 2014 (last access: 2014/07/03).

Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products intended for Consumers (SCCNFP): *Opinion of the SCCNFP Concerning AHTN*, SCCNFP/0609/02, 2002a.

Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products intended for Consumers (SCCNFP): *Opinion of the SCCNFP Concerning HHCB*, SCCNFP/0610/02, 2002b.

Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products intended for Consumers (SCCNFP): *Opinion of the SCCNFP Concerning Musk Xylene and Musk Ketone*, SCCNFP/0817/04, 2004.

Seinen, W.; Lemmen, J.G.; Pieters, R.H.H.; Verbruggen, E.M.J.; van der Burg, B.: *AHTN and HHCB Show Weak Estrogenic, but no Uterotrophic Activity*, Toxicology Letters, 111, 161, 1999.

Sell, C.: *The Chemistry of Fragrances*, 2nd ed., Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2006.

Simonich, S.; Begley, W.M.; Debaere, G.; Eckhoff, W.S.: *Trace Analysis of Fragrance Materials in Wastewater and Treated Wastewater*, Environmental Science and Technology, 34, 959-965, 2000.

Smital, T.; Luckenbach, T.; Sauerborn, R.; Hamdounb, A.M.; Vega, R.L.; Epel, D.: *Emerging Contaminants-Pesticides, PPCPs, Microbial Degradation Products and Natural Substances as Inhibitors of Multixenobiotic Defense in Aquatic Organisms*, Mutation Research, 552, 101-117, 2004.

Sommer, C.: *Gas Chromatographic Determination of Nitro Musk Compounds in Cosmetics and Detergents*, Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 89, 108-111, 1993.

Sommer, C.: *The Role of Musk and Musk Compounds in the Fragrance Industry*. In Rimkus, G.G.: *Synthetic Musk Fragrances in the Environment*, Springer, Berlin, 2004, 1-16.

Sommer, C.; Juhl, H.: *Analysis of Macrocyclic Musks in Alcohol-Containing Cosmetics*, Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 100, 224, 2004.

Somogyi, L.P.; Kishi, A.: *Aroma Chemicals and the Flavor and Fragrance Industry*, SRI International, California, 2001.

Steinberg, P.; Fischer, T.; Arand, M.; Park, E.; Elmadfa, I.; Rimkus, G.G.; Brunn, H.; Dienes, H.P.: *Accute Hepatotoxicity of the Polycyclic Musk 7-Acetyl-1,1,3,4,4,6-hexamethyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene (AHTN)*, Toxicology Letters, 111, 151, 1999.

Taylor, K.M.; Weisskopf, M.; Shine, J.: *Human Exposure to Nitro Musks and the Evaluation of their Potential Toxicity: An Overview*, Environmental Health, 13, 1-7, 2014.

Walbaum, H.: *Das Natürliche Moschusaroma*, Journal für Praktische Chemie, 73, 488-493, 1906.

Wang, M.; Peng, C.; Chen, W.; Markert, B.: *Ecological Risks of Polycyclic Musk in Soils Irrigated with Reclaimed Municipal Wastewater*, Ecotoxicology and Environmental Safety, 97, 242-247, 2013.

Weber, S.H.; Spoelstra, D.B.; Polak, E.H.: *The Structure of tert-Amilated p-Cymene. A New Synthesis of Polyalkylindans. I.*, Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas, 74, 1179-1196, 1955.

Wisneski, H.H.; Ronald, R.L.; Davis H.M.: *Gas Chromatographic Determination of Synthetic Musk (7-Acetyl-6-ethyl-1,1,4,4-tetramethyltetralin) in Fragrances*, Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 65, 598, 1982.

Yamagishi, T.; Miyazaki, T.; Horii, S.; Kaneko, S.: *Identification of Musk Xylene and Musk Ketone in Freshwater Fish Collected from the Tama River, Tokyo*, Bulletin of Environmental and Contamination and Toxicology, 26, 656, 1981.

Zhang, X.; Yao, Y.; Zeng, X.; Qian, G.; Guo, Y.; Wu, M.; Sheng, G.; Fu, J.: *Synthetic Musks in the Aquatic Environment and Personal Care Products in Shanghai, China*, Chemosphere, 72, 1553-1558, 2008.

— 3 —

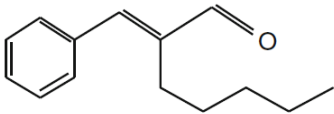
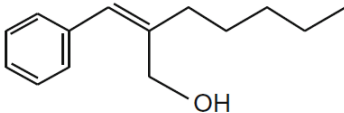
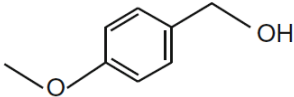
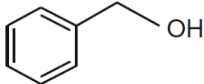
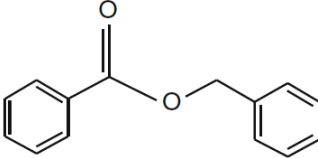
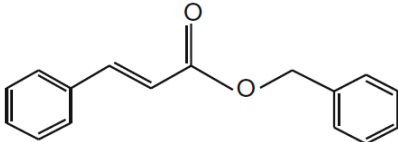
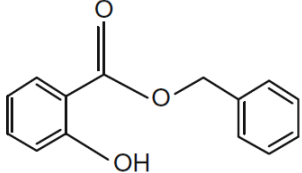
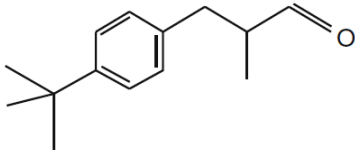
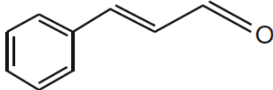
Lurrin alergenokoak, kontserbagarriak eta ultramore-iragazkiak

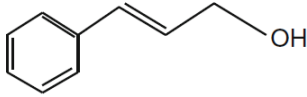
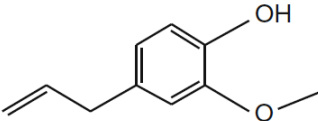
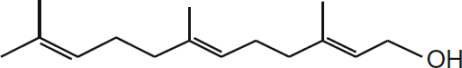
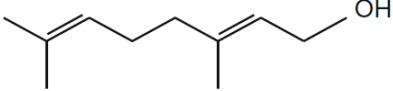
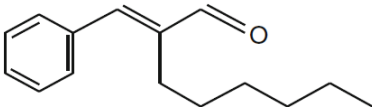
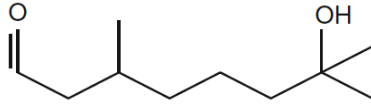
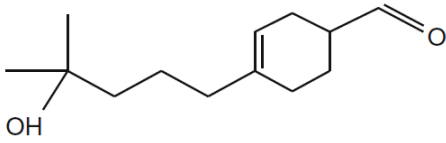
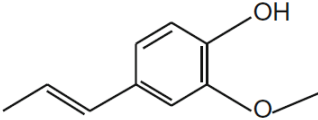
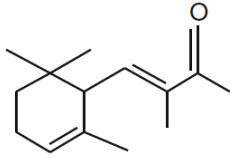
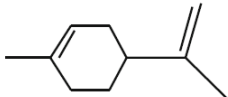
3.1. Lurrin alergenokoak

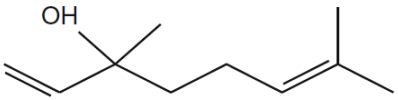
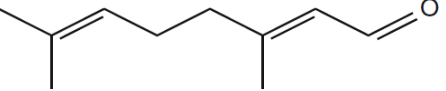
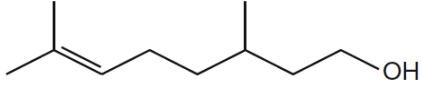
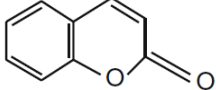
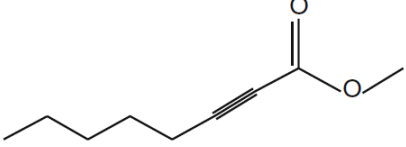
Lehen kapituluari aipatu den bezala, Europako araudiak kosmetikoetan dauden osagaiak etiketan azaldu behar direla ezartzen du. Kasu askotan, dena den, eta lurrinen kasura mugatuz, osagai horiek ehundaka konposatu kimikoz osatuta egon daitezke. Horren ondorioz eta praktikotasunari eutsiz, zenbaitetan “perfume” edo “aroma” hitzarekin osagai guztiak jasota ager daitezke etiketan. Hori onartzen bada ere, 2003an Europar Batasunak 2003/15/EC zuzentarauean (European Parliament and European Council, 2003) 26 substantzia alergenoko identifikatu zituen (3.1. Taula), PAS (*Potentially Allergenic Substances*) horiek egun 1223/2009 araudiaren III eranskinean daude (European Parliament and European Council, 2009) eta, beraz, erabilpen mugak eta baldintzak dituzte. Zehazki, substantzia horiek etiketan azaldu behar dira kontzentrazioa %0,001 baino handiagoa bada kosmetiko iraunkorren kasuan (*leave-on products*) eta %0,01 baino handiagoa bada eliminatzeakoak diren produktu kosmetikoen kasuan (*rinse-off products*).

PASei buruzko lehen txostena 1999an argitaratu zuen SCCNFP —egun SCCS eta, 2004tik 2008ra, SCCP (*Scientific Committee on Consumer Products*)— delako batzordeak. Txosten horretan (SCCNFP, 1999) ordura arteko bibliografia aztertu zen eta, 26 substantzia alergenoko mugak jartzea proposatu zen. Txosten horren ondorioa izan zen lehenago aipatutako 2003/15/EC zuzentaraua. 26 substantzia alergenokoetatik, 24 konposatu kimiko lurrunkorrek dira eta beste biak estraktu naturalak dira, alegia, definitu gabeko osagaiak dituzten nahasteak. Hain zuzen ere, *Evernia furfuracea* eta *Evernia prunastri* goroldioen estraktuak dira. Goroldio horien estraktu naturaletan berez alergenokoak ez diren baina degradazioz konposatu alergenokoak ematen dituzten substantziak daudela frogatu da, esaterako atranorina eta kloroatranorina (Bernard *et al.*, 2003).

3.1. Taula. 26 PAS substantzia alergenok.

Izena(k)	Izena(k) (ingelesez)	CAS	Egitura
Amil zinamala ^a	Amyl cinnamal	122-40-7	
Amilzinamil alkohola ^a	Amylcinnamyl alcohol	101-85-9	
Anis alkohola / Anisil alkohola	Anise alcohol / Anisyl alcohol	105-13-5	
Bentzil alkohola	Benzyl alcohol	100-51-6	
Bentzil bentzoatoa	Benzyl benzoate	120-51-4	
Bentzil zinamatoa ^a	Benzyl cinnamate	103-41-3	
Bentzil salizilatoa	Benzyl salicylate	118-58-1	
Liliala ^a / Butilfenil metilpropionala	Lilial / Butylphenyl methylpropional	80-54-6	
Zinamala ^a	Cinnamal	104-55-2	

Zinamil alkohola ^a	Cinnamyl alcohol	104-54-1	
Eugenola	Eugenol	97-53-0	
Farnesola ^a	Farnesol	4602-84-0	
Geraniola	Geraniol	106-24-1	
Hexil zinamala ^a	Hexyl cinnamal	101-86-0	
Hidroxizitronelala ^a	Hydroxycitronellal	107-75-5	
Lirala / Hidroxiisohexil 3- ziklohexeno karboxaldehidoa	Lyril / Hydroxyisohexyl 3-cyclohexene carboxaldehyde	31906-04- 4	
Isoeugenola ^a	Isoeugenol	97-54-1	
Alfa-isometil ionona ^a / Alfa zetona	Alpha-isomethyl ionone / Cetone alpha	127-51-5	
Limonenoa ^a	Limonene	5989-27-5	

Linalola ^a	Linalool	78-70-6	
Zitrala ^a	Citral	5392-40-5	
Zitronelola ^a	Citronellol	106-22-9	
Kumarina	Coumarin	91-64-5	
Metil 2-oktinoatoa / Metilheptin karbonatoa	Methyl 2-octynoate / Methylheptin carbonate	111-12-6	
<i>Evernia prunastri</i> (Estraktua)		90028-68-5	
<i>Evernia furfuracea</i> (Estraktua)		90028-67-4	

^aNahaste isomerikoak erabiltzen dira lurrinetan (E/Z nahiz R/S isomeroak, kasuak kasu).

Kosmetikoetan, alergenoei buruzko informazioa ematea garrantzitsua da kontsumitzaileentzat, bereziki ukipen-alergien diagnosian lagungarria delako eta, horrela, alergia duten kontsumitzaileek produktu kosmetiko horien erabilpena saihets dezakete. Jakina, helburu hori ez da betetzen “perfume” edo “aroma” izen generikoak erabiltzen direnean eta, beraz, 2003/15/EC zuzentaraua aurrerapen interesgarria izan zen. Era berean, 26 PASEi buruzko informazio toxikologikoa egun ere interes handikoa da alergia dituzten gaixoen kudeatze klinikoa errazten duelako. 2012an, SCCS batzordeak beste berrikuspen txosten bat argitaratu zuen (SCCS, 2012) PASEi buruzko informazioa eguneratzeko. Txostenean informazio kliniko, epidemiologiko eta esperimental berria aztertu zen eta berrikuspenaren ondoren, 1999ko txostenean aipatutakoa oraindik ere indarrean zegoela adierazi zuen batzordeak. Hala ere, 26 PASEtaz gainera beste konposatu asko ere alergenoko izan daitezkeela proposatzen da —82 konposatu dokumentatu dira, 54 konposatu bakun eta 28 estraktu, hain zuzen ere—. Bestalde, araudian ezarritako mugak egokiak diren ere berrikusi zuten eta, eskuragarri zegoen informazioaren arabera, ezarritako mugak egokiak dira, kontzentrazioa horiek —alergia %0,01 eta %0,001, produktu motaren arabera— alergenoen maila jasagarriak direlako.

3.2. Taula. PASen sailkapenak (Furlanetto *et al.*, 2010; SCCS, 2012) eta log K_{ow} balioak (Tsiallou *et al.*, 2012).

PAS	SCCS zerrenda	Sailkapen kimikoa	log K_{ow}
Amil zinamala	A ^a	Karbonilikoa	4,80
Amilzinamil alkohola	A ^b	Alkohola	4,80
Anisil alkohola	B	Alkohola	1,10
Bentzil alkohola	A	Alkohola	1,08
Bentzil bentzoatoa	B	Esterra / Laktona	3,97
Bentzil zinamatoa	B	Esterra / Laktona	3,65
Bentzil salizilatoa	A	Esterra / Laktona	4,31
Liliala	B	Karbonilikoa	4,07
Zinamala	A	Karbonilikoa	2,22
Zinamil alkohola	A	Alkohola	1,93
Eugenola	A	Fenola	2,20
Farnesola	B	Alkohola	5,31
Geraniola	A	Alkohola	3,28
Hexil zinamala	B	Karbonilikoa	4,82
Hidroxizitronelala	A	Karbonilikoa / alkohola	1,54
Lirala	A	Karbonilikoa / alkohola	2,53
Isoeugenola	A	Fenola	2,45
Alfa-isometil ionona	B	Karbonilikoa	4,41
Limonenoa	B	Hidrokarburoa	4,57
Linalola	B	Alkohola	1,54
Zitrara	A	Karbonilikoa	1,52
Zitronelola	B	Alkohola	3,38
Kumarina	A	Esterra / Laktona	1,39
Metil 2-oktinoatoa	B	Esterra / Laktona	2,60

^aA: Ohikoenak diren alergenoen zerrendakoa (13 PAS).

^bB: Hain ohikoak ez diren alergenoen zerrendakoa (11 PAS).

26 PASEi dagokienez, 1999an proposatutako bi zerrendak bere horretan mantentzea erabaki zuen SCCSk. A zerrendan ohikoenak diren alergenak

jasotzen dira —guztira 13— eta B zerrendan, berriz, hain ohikoak ez direnak —beste 11 PASak—, zerrenda horietan estraktuak ez dira jaso. Zerrenda horietaz gainera, talde kimikoen arabera sailkapena ere aurki daiteke bibliografian (Furlanetto *et al.*, 2010) eta bi sailkapen horiek erabiliko dira aurrerantzean. Aipatutako bi sailkapenak eta PASen log K_{ow} balioak (Tsiallou *et al.*, 2012) 3.2. taulan jasota daude.

Azaldu den bezala, konposatu alergenoko gehiago dauden arren, PAS izenarekin taulan azaltzen diren 26 horiek identifikatuko dira soilik. Zenbait kasutan hori nahasgarria gerta daiteke, bibliografian metileugenola eta pinenoa PAS moduan identifikatzen direlako. Metileugenola —93-15-2 CAS zenbakia duen konposatua— ere 1223/2009 araudiaren III eranskinean jasota dago (European Parliament and European Council, 2009), eta askotan 27. PAS substantzia moduan hartzen da, baina, bere mugak eta erabilpen baldintzak ez dira beste PASen berdinak eta beste talde batean sailkatu behar da.

Europar Batasuneko araudiaz gainera, AEBetan ere lurri alergenoei buruzko mugak ezarri dira. Bestalde, herrialde bakoitzak dituen araudiak osatzeko RIFM institutuak lurrinei buruzko azterketak egin eta informazio zientifikoa zabaltzen du. Era berean, IFRAk lurrinen erabilpenari buruzko gidak osatzen ditu RIFMren aholkuen arabera, 1. kapitulu aipatu den bezala. Dena den, garrantzitsua da gogoratzea gomendio horiek betetzea ez dela derrigorrezkoa eta horregatik da ezinbestekoa Europako araudia. Egun, lurrinak produktu askotan aurki daitezke, eta ez bakarrik erabilpen kosmetikoa dutenak; hain zuzen ere, elikagaietan, edarrietan, garbiketa produktuetan eta etxeko beste hainbat produktutan aurki daitezke (Chaintreau, 2007; Sgorbini *et al.*, 2010; Tsiallou *et al.*, 2012). Kontsumitzaileek produktu horiekin duten kontaktu estua dela-eta, ezinbestekoa da osagaien eta lurrinen segurtasuna kontrolpean izatea eta bereziki produktu kosmetikoen kasuan, horiek baitira lurri gehien dituzten produktuak.

3.1.1. Alergenak eta segurtasuna

Ukipen-alergia osasun arazo garrantzitsua da, eta neurri handi batean bere ondorioak arinagoak dira produktuen etiketan konposatu alergenoen presentzia azaltzen bada (3.1. Irudia). Zentzu horretan, kosmetikoei buruzko araudiak produktuei zenbait test egitea eskatzen du horiek merkaturatu baino lehen. Horien artean, hainbat substantzia talde aztertzen dira, hala nola metal astunak —beruna, artsenikoa, merkurioa eta kadmioa, besteak beste—, pestizidak, ingurugiro-toxinak eta jakina, substantzia alergenak.

Substantzia alergenoen testak bereziki garrantzitsuak dira, izan ere aspalditik ezaguna da hainbat gizabanakok substantzia jakin batzuen aurrean duten erreakzio alergikoa. Substantzia alergenoren frogak konplexuak izan ohi dira, izan

ere substantzia alergenikoei buruzko informazioa mugatua da. Konposatu kimiko espezifikoak zein kontzentrazioetik gora sortzen dituzten alergiak ere ezezaguna izaten da kasu askotan. Hori gutxi balitz, substantzia motak eta kontzentrazioak ondorio oso desberdinak izan ditzakete kasu kliniko bakoitzean (Kryger, 2011).



3.1. Irudia. Kosmetiko honen etiketan zenbait PAS identifikatu dira: *Butylphenyl Methylpropional*, *Alpha Isomethyl Ionone*, *Citronellol*, *Coumarin* eta *Linalool*, hain zuzen ere. Informazio hori oso baliagarria da alergia duten kontsumitzaileentzat.

Lurrinen erabilpenaren ondorioz sortutako alergiak askotan dokumentatu dira —SCCSren txostenean jaso direnak, adibidez (SCCS, 2012)—. Kosmetikoen erabilpenaren ondorioz sortutako gaixotasun arazoak normalean dermatologikoak izaten dira, nagusiki ekzemak. Ekzema horiek kosmetikoa zuzenean azalean aplikatzeagatik agertu ohi dira, eta gehienetan, eskuak, besapeak eta aurpegia izataten dira atalik kaltetuenak (Klaschka, 2013). Lurrin alergenok, gainera, arnas aparatuko arazoak —asma, esaterako— areagotu ditzakete efektu narritagarriak dituztelako. Gainera, zefalea, mukosen asaldura eta beste zenbait alergia eragiteko gai dira (SCCNFP, 1999; Rumchev *et al.*, 2004). Efektu horien ondorioz, beste gaixotasunekin eragin sinergikoa izan dezakete bai PASek eta baita beste lurrinek ere, gaixotasunaren arazoak areagotuz (Magnano *et al.*, 2009).

Arazo horiek larriagoak dira umeez erabiltzen dituzten produktuen kasuan —kosmetikoak, jostailuak eta abar—, lurrinak eliminatzeko mekanismo fisiologikoak garatu gabe dituztelako. Jaio ondoren organo garrantzitsuenak oraindik garatzen ari direnez, umeez ez dituzte mekanismo metaboliko guztiz funtzionalak eta ez dira gai toxinak era eraginkorrean eliminatzeko, hortaz,

sistema endokrinoaren edo immunologikoaren aurkako erasoekiko babes eskasagoa dute. Gainera, umeen kasuan ohikoa da horretarako prestatuta ez dauden produktuak irenstea —jostailuak, esate baterako— (Masuck *et al.*, 2011; Sanchez-Prado *et al.*, 2013).

Lehen kapituluaz azaldu den bezala, produktu kosmetikoen eta horien osagaien kalitate-kontrola ezinbestekoa da kontsumitzaileen segurtasuna bermatzeko. Era horretan, merkaturatzen den kosmetikoak debekatutako osagairik ez duela ziurtatzen da eta, alergenoen kasuan, beraien presentzia etiketan aipatzen da kontzentrazioa araudiak ezarritakoa baino handiagoa bada. PASEi dagokienez, 2003/15/EC zuzentaraua (European Parliament and European Council, 2003) indarrean egon denetik larruazala sentikor bihur dezaketen alergenoen analisia erronka handia bihurtu da eta 24 PASen determinazioak kapitulu osoak hartzen ditu literatura zientifikoan —PAS diren bi estraktu naturalen analisia ere garrantzitsua da baina, horiek bereizirik aztertu ohi dira—. Aipatzekoa da zuzentaraua indarrean egon baino bi urte lehenago ez zegoela baliozko metodo analitikorik PASak monitorizatzeko, ez kosmetikotan, ezta kosmetikoen lehengaietan ere (Chaintreau, 2007).

3.1.2. Lurrin alergenoen analisia

Kimikoki definituta dauden 24 PASak konposatu talde oso desberdinetakoak dira, hala nola alkoholak, esterrak, laktonak, fenolak eta abar, 3.2. taulan azaldu den bezala. Dena den, ezaugarri lurrinkorrek dituztenez, GC teknika da analito horien analisisan gehien erabili dena. Alergenoak kimikoki desberdinak izanik, detektagailu unibertsala beharrezkoa da —FIDA, esate baterako—, baina, horrek selektibotasun eza ere dakar, izan ere, kosmetikoetan erabiltzen diren perfume kontzentratuak ehundaka osagai izan ditzakete eta horiek kontzentrazio tarte desberdinetan egon daitezke — $\mu\text{g}/\text{kg}$ -tik hasi eta %20ra bitarte, adibidez—. Ondorioz, askotan detektagailu selektiboagoak erabiltzen dira PASak kuantifikatzeko eta, zalantzarik gabe, gehien erabili dena MS detektagailua da. MS detektagailua erabilia ere kuantifikazioen arazorik handienetakoa koeluzio arazoak dira, alegia, konposatu bat baino gehiago detektagailura une berean iristea. Hori saihesteko, MS detektagailuak SIM (*Selected Ion Monitoring*) edo EIC (*Extracted Ion Chromatogram*) moduan erabiltzeko metodoak garatu dira, nahiz eta ezinena den positibo eta negatibo faltsuak guztiz eliminatzea. Arazo horren aurrean, beste konponbide batzuk aurkitu behar izan dira, esaterako, GCxGC teknika multidimentsionalak edo aurretratamendu pausoak garatzea.

Larruazala sentikor bihur dezaketan alergenoen arazoa aurreikusita, Rastogik lehen aldiz proposatu zuen 11 PAS kuantifikatzeko metodo bat, Europako

araudiak konposatu horiek aipatu aurretik. Metodo horretan (Rastogi, 1995), SPE aurretratatamendua eta GC banaketa kromatografikoa proposatu zuen —GC-MS identifikazioa egiteko eta GC-FID kuantifikazioa egiteko—. Lehen lan horretan lan bikoitza egin behar zen lurrin alergeno bakoitza analizatzeko: alde batetik identifikazioa eta bestetik kuantifikazioa. Gainera, metodoak huts egiten zuen koeluzio arazoak konpontzerakoan eta arazoak ematen zituen osagai asko zituzten laginen kasuan (Chaintreau, 2007). Rastogi berak urte batzuk geroago metodoari moldaketa batzuk egin eta 24 PAS kuantifikatzeko metodologia proposatu zuen (Rastogi, 2002). Bigarren metodoak hobekuntza garrantzitsuak ekarri zituen, esate baterako, kosmetikoetaz gainera beste produktuetan ere aplikagarria zela. Laginaren aurretratatamendua produktuaren arabera baten ere, kasu guztietan metanola erabiltzen zen erauzketa egiteko eta ondoren lixibiatua silize gelezko zutabe batean purifikatzen zen GCan injektatu baino lehen. Hala ere, MS detektagailua eskaneatzen osoan (*full scan*) erabili behar zen identifikaziorako eta EIC motan kuantifikaziorako eta horrek SIMek baino selektibitate eskasagoa du. GC-MS eta SIM kuantifikazioa Ellendt eta bere lankideek lortu zuten eta 24 PAS kuantifikatu zituzten desodoranteetan (Ellendt *et al.*, 2001). SIM erabiltzeari esker, %98-106ko berreskurapenak eta 2 mg/L-ko detekzio muga (LOD, *Limit Of Detection*) lortu zuten. Hala ere metodoak arazoak ematen zituen lurrin nahaste konplexuen analisisian positibo faltsuak ematen zituelako, geroago ikusi zen bezala (Chaintreau *et al.*, 2003).

Aipatutako azken lan horretan hobekuntza garrantzitsuak egin ziren PASen analisisian, perfume kontzentratuak zuzenean injektatzeko metodoa proposatu baitzen (Chisvert *et al.*, 2013a). Chaintreau eta bere lankideek ikerketan azaltzen dutenez, garrantzitsua da PASak analizatzerakoan kromatografoen garbiketa zorrotza egitea, laginen arteko kutsadura gertatzea oso erraza delako konposatu ez-lurrinkorren ondorioz. Aipagarria da metodo hori IFRAk PASen determinaziorako metodo ofizial moduan aukeratu zuela (Chaintreau *et al.*, 2003; IFRA, 2007), bi gomendio adieraziz koeluzioen eta migrazio denboren aldaketen kasurako.

Antzeko estrategia ere deskribatu zen bibliografian lurrinen lehengaiak eta perfumeak aztertzeke (Leijs *et al.*, 2005). Kasu horretan, ikertzaileek bi injektoreko GCa erabili zuten, bakoitza polartasun desberdineko zutabe bati konektatuta, koeluzioen ondorioz gertatzen diren identifikazio arazoak saihesteko. Jakina, metodo horren kuantifikazio muga (LOQ, *Limit of Quantification*) aurreko metodoena baino askoz ere txikiagoa da. GC-MS azkarra (*fast GC-MS*) teknika ere erabili da 24 alergenak identifikatzeko (Mondello *et al.*, 2007) eta horrela, zutabe motzak eta estuak erabiliz 5 minutu azpiko denboran PASak kuantifikatzea lortu zuten, koeluzio arazoak guztiz konpondu ez bazituzten ere.

3.3. Taula. Produktu kosmetikoetan PASak analizatzeko metodoen laburpena.

Laginak	PAS kopurua	Metodo analitikoaren laburpena	Erref.
Kosmetikoak eta zainketa pertsonalerako produktuak	24	MMSPD ^a GC-MS/MS	Celeiro <i>et al.</i> , 2014
Kosmetikoak eta zainketa pertsonalerako produktuak	8	Aurretratamendurik ez MEKC-DAD	Lopez-Gazpio <i>et al.</i> , 2014
Jostailuak	48 ^b	Erauzketa GC-MS/MS	Lv <i>et al.</i> , 2013
Umeentzako kosmetikoak	24	MSPD ^c GC-MS/MS	Sanchez-Prado <i>et al.</i> , 2013
Kosmetikoak	24	DHS ^d GC-MS	Devos <i>et al.</i> , 2012
Hondakin-urak	21	DLLME ^e GC-MS	Tsiallou <i>et al.</i> , 2012
Umeen listua	24	DHS GC-MS	Masuck <i>et al.</i> , 2011
Kosmetikoak	24	MSPD GC-MS	Sanchez-Prado <i>et al.</i> , 2011
Kosmetikoak	24	HS ^f GC-qMS	del Nogal Sánchez <i>et al.</i> , 2010
Zainketa pertsonalerako produktuak	18	MEEKC ^g	Furlanetto <i>et al.</i> , 2010
Kremak	13	DC-STE ^h GC-MS	Sgorbini <i>et al.</i> , 2010

^a*Micro-Matrix-Solid-Phase Dispersion*

^b*Jostailuen kasuan 66 alergenok jasotzen ditu 2009/48/EC araudiak*

^c*Matrix-Solid-Phase Dispersion*

^d*Dynamic Headspace*

^e*Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*

^f*Headspace-programmed temperature vaporization*

^g*Microemulsion Electrokinetic Chromatography*

^h*Direct Contact Sorptive Tape Extraction*

Laginen garbiketa lortzeko, zenbait aurretratamendu proposatu dira, hala nola SBSE (*Stir Bar Sorptive Extraction*), SPME (*Solid Phase Microextraction*) SPD-
PLE (*Solid-Phase Dispersion-Pressurized Liquid Extraction*) eta MSPD (*Matrix*

Solid-Phase Dispersion) (Chisvert *et al.*, 2013a). Aurretratamendu horiei buruzko xehetasun guztiak literatura zientifikoan aurki ditzake irakurleak (Chaintreau, 2007; Wang, 2013). Aipagarria da Sanchez-Prado eta bere lankideen ikerketa, izan ere laginen aurretratamendurik eskatzen ez duen —diluzioa bakarrik— GC-MS metodoa garatu dute (Sanchez-Prado *et al.*, 2011).

Erabateko GC delakoaren (*Comprehensive GC*) eta erabateko GCxGC kromatografia bidimentsional teknika berriak ere PASen analisisian aplikatu da eta, koeluzioaren arazoari aurre egiteko metodo egokia dela dirudi (Chisvert *et al.*, 2013a). Teknika nahiko berria da, 90eko hamarkadan lehen aldiz proposatutakoa, hain zuzen ere (Liu eta Phillips, 1991). GCxGC-FID erabiliz 24 PAS eta beste bi konposatu banatu ahal izan ziren (Shellie *et al.*, 2004). Lehen metodoek aurrekoekiko hobekuntza txikiak ekarri bazituzten ere, geroago garatutako GCxGC-MS teknikek koeluzio arazoak txikitu eta selektibitate onak lortu zituzten, banaketa denbora luzeagoak behar diren arren (Debonneville eta Chaintreau, 2004). Badira teknika bidimentsional konplexuagoak ere PASak analizatzeko, esate baterako GCxGC-(TOF)MS (LECO, 2004) —TOF (*Time Of Flight*) motako MS detektagailua erabiliz— eta GCxGC-qMS (Cordero *et al.*, 2007). Teknika horiek hobekuntza handia suposatzen badute ere, gehienak garestiegiak dira errutinako kalitate-kontrolako analisisetan aplikatzeko (Chaintreau, 2007). Laburpen modura, 3.3. taulan azken urteotan PASen analisiari buruz argitaratu diren zenbait artikulua jaso dira.

Esandakoaren arabera, argi ikusten da gas-kromatografia izan dela teknika erabiliena PASen kuantifikazioa egiterakoan. 2013ko berrikuspen bibliografiko sakonaren arabera (Chisvert *et al.*, 2013a), ordura arte bi ikerketa bakarrik aurkitu dira PASak determinatzeko GC ez den teknika bat erabiltzen dutenak. Lehenak likido-kromatografia eta ultramore detektagailua erabiltzen ditu (Villa *et al.*, 2007). C-18 zutabe kromatografikoa erabiltzen dute ikertzaileek eta azetonitrilo/ur disolbatzaile gradientea. Laginen aurretratamendua sinplea da, izan ere diluzio, sonikazio eta iragazketa pausoak nahikoak dira injekzioa egin aurretik. Metodoaren koeluzio arazoak alde batera utziz, teknika interesgarria da MS detektagailu garestiak eskuragarri ez daudenean. Bigarren ikerketak, aldiz, mikroemulsio kromatografia elektroinetikoa (MEEKC, *Microemulsion Electrokinetic Chromatography*) eta UV detektagailua erabiltzen dute, baina, kasu horretan 18 PAS analizatzen dituzte soilik, eta ez 24ak (Furlanetto *et al.*, 2010).

3.2. Kontserbagarriak

Produktuen egonkortasuna bermatzeko erabiltzen diren substantziak dira kontserbagarriak eta produktu askotan gehitzen dira, hala nola kosmetikoetan, zainketa pertsonalerako produktuetan (PCP, *Personal Care Products*), etxeko beste

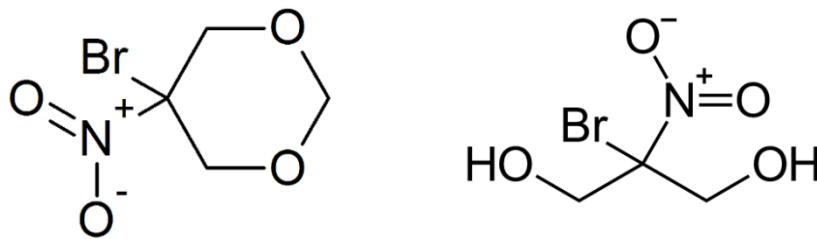
hainbat produktutan, farmakoetan eta elikagaietan. Konposatu kimiko antimikrobianoek mikroorganismoen hazkuntzaren aurkako funtzio garrantzitsua dute baina, badira produktu kosmetikoak hondatzen dituzten beste zenbait kanpofaktore —airea, eguzki-izpiak— eta kosmetikoak horien aurka babesteko kontserbagarri antioxidatzaileak ere erabiltzen dira. Europako 1223/2009 araudiaren arabera (European Parliament and European Council, 2009), kontserbagarriak produktu kosmetikoetan gerta daitekeen mikroorganismoen garapena inhibitzea helburu duten substantziak dira eta araudiaren V eranskinean azaldu behar dira —dagozkien mugak eta erabilpen-baldintzak adierazita— kosmetikoetan erabili ahal izateko, lehen kapituluaz azaldu den bezala. Beraz, produktu kosmetikoak eguzki-izpietatik edo oxidaziotik babesteko erabiltzen diren substantziak ez dira kontserbagarritzat hartzen Europako araudian. Testu honetan ordea, kontserbagarrien taldean aztertuko dira. Jarraian produktu kosmetikoetan ohikoenak diren kontserbagarri motak aztertuko dira.

3.2.1. Kontserbagarri antimikrobianoak

Ura duten PCPetan eta kosmetikoetan hazkuntza mikrobianoa saihesteko substantziak gehitzea derrigorrezkoa da bakterioek eta ondoek sortutako kalteak ez gertatzeko. Zenbait kasutan, kutsadura mikrobianoak ezaugarri organoleptikoen aldaketa bakarrik eragingo du baina, beste zenbaitetan, kontsumitzailearen segurtasuna arriskuan egon daiteke. Hori kontrolatzeko, bi kontzentrazio erabiltzen dira kontserbagarriei dagokienez, alde batetik MIC delakoak (*Minimum Inhibitory Concentration*) organismoen hazkuntzarik ez egotea ziurtatzen duen kontserbagarriaren kontzentrazio txikiena da. Bestetik, MBC kontzentrazioak (*Minimum Biocidal Concentration*) mikroorganismoen hazkuntza 24 orduz saihesten duen kontzentrazioa da (Polati *et al.*, 2007). Jakina, kosmetiko bati kontserbagarriak gehitzearen ondorioz albo-ondorio kaltegarriak ager daitezke, bai kosmetikoa aplikatzen den unean bertan eta baita epe luzeagoan. Literatura zientifikoan kontserbagarriek sortutako hainbat albo-efektu deskribatu dira, hala nola larruazalaren narritadura eta aktibitate estrogenikoa (DHI, 2007; Shaw eta deCatanzaro, 2009). Era berean, bibliografian jasota dago zenbait kontserbagarri giza minbizi-induktoreak izan daitezkeela (Jensen *et al.*, 2005; Darbre eta Harvey, 2008; Darbre eta Harvey, 2014) eta ondorioz, kontserbagarrien erabiltzearen garrantzitsua da bi parametro horiek kontuan hartzea: kosmetikoan mikroorganismoen aktibitatea kontrolatu behar da, baina, kontsumitzailearentzat albo-ondorioak ahalik eta txikienak izan behar dira.

Kontuan izan behar da, zenbait kontserbagarriaren kasuan, substantziaren deskonposaketaren ondorioz konposatu toxikoak ager daitezkeela. Hori gertatzen da, esaterako, 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxanoaren eta 2-bromo-2-nitropropanoaren

kasuan —bronidox eta bronopol, hurrenez hurren (3.2. Irudia)—, izan ere kontserbagarri horien deskonposaketa prozesuaren ondoren agente nitrosatzaileak agertzen dira. Agente nitrosatzaileek amina alifatikoekin erreakzionatzen dutenean —amina horiek xanpuen ohiko osagaiak dira, hala nola dietanolamina (DEA), trietanolamina (TEA) eta monoetanolamina (MEA)— nitrosamina minbizisortzaileak ematen dituzte, eta larruazala erraz zeharka dezakete (Matyska *et al.*, 2000). Europako araudiak bronidox eta bronopol konposatuak onartzen ditu, gehienez %0,1eko kontzentrazioan, baina nitrosaminen sorrera saihesta dagoela ziurtatu behar da.

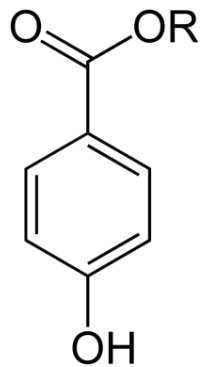


3.2. Irudia. Bronidox (ezkerrean) eta bronopol (eskuinean) kontserbagarrien egitura kimikoa.

Adibide gisara aipatutako kasu horretaz gainera, badira kontserbagarrien toxikotasunari buruzko beste hainbat ikerketa (Polati *et al.*, 2007) eta, hortaz, ezinbestekoa da kontsumitzaileen segurtasuna bermatuko duten araudiak garatzea. Kosmetikoen kasuan geroz eta osagai kopurua handiagoa erabiltzen denez, eta osagai askori buruzko informazio gabezia handia denez, gehienetan elikagaien eta farmakoen kasurako garatutako arauetara jo behar izaten da. Kosmetikoen kasuan, hala ere, araudia ez da hain zorrotza eta 1223/2009 aipatzen den moduan, kosmetikoek seguruak izan behar dute baldintza normal eta zentzuzkoetan erabiltzen direnean —*cosmetic products should be safe under normal or reasonably foreseeable conditions of use* (European Parliament and European Council, 2009)—. Esan bezala, Europar Batasunean V eranskinean jasota daude onartutakoak eta kontzentrazio maximoak ere finkatuta daude. Kontuan izan behar da, horretaz gainera, substantzia batzuk kontserbagarri funtzioa eta beste funtzioen bat izan dezaketela, eta horren arabera araudiak ezarritako mugak desberdinak izan daitezkeela. Normalean, kontserbagarri antimikrobianoen kontzentrazio maximoak kosmetiko motaren arabera dira bakterioen eta onddoen garapena desberdina delako ingurune bakoitzean. Gainera, kontserbagarriek kosmetikoan ondorio organoleptikorik ez izatea bilatzen da,

eraginkorra izatea, eta pH desberdinetan aktibitate egokia izatea, beraz, kontserbagarri asko, eta oso desberdinak, aurki daitezke produktu kosmetikoetan.

Kontserbagarri antimikrobianoak talde kimiko garrantzitsuenaren arabera sailkatu ohi dira bibliografian (Polati *et al.*, 2007). Lehen taldea, azido organikoei eta haien gatzari eta esterrei dagokiena da. Talde horretan sailkatzen dira azido dehidroazetikoak, azido sorbikoak, azido propionikoak eta bere gatzak, azido salizilikoak, eta baita azido bentzoikoak eta bere gatzak eta alkil esterrak ere. Literatura zientifikoan gehien aztertu diren kontserbagarriak ere talde honetakoak dira, alegia, azido 4-hidroxibentzoikoak eta bere alkil esterrak: parabenoak. Parabenoak 1223/2009 araudiaren V eranskineko 12. sarreran aurki daitezke eta egitura kimiko komuna duten konposatu multzo handia dira (3.3. Irudia), hala nola metilparabenoa, etilparabenoa, propilparabenoa, butilparabenoa eta isobutilparabenoa. Aipatutakoak gehien erabiltzen diren arren, badira beste zenbait bai araudian jasota eta baita literaturan aztertutakoak ere.



3.3. Irudia. Parabenoen egitura orokorra, non R dagokion alkil taldea den.

Azido 4-hidroxibentzoikoak eta bere esterrak eraginkorrak dira mikroorganismoen aktibitatea murrizteko eta, gainera, aktibitate hori are handiagoa da alkil taldearen karbono kopurua handitu ahala. Era berean, alkil katea luzatzen den heinean ur-disolbagarritasuna urriagoa da. Parabenoak espektro zabaleko antimikrobianoak dira, baina beraien aktibitatea nahiko selektiboa denez, askotan parabeno nahasteak erabiltzen dira kosmetikoetan. 1223/2009 araudiak %0,4ko kontzentrazio maximoa ezartzen du banako parabenoentzat eta %0,8koa parabeno nahasteen kasuan. Europako batzordeek parabenoak seguruak direla behin eta berriz adierazi duten arren (SCCS, 2010; SCCS 2013), zalantzarik gabe horiek dira alarma gehien sortu duten kontserbagarriak eta oso ohikoa da produktu kosmetiko askoren etiketan

parabenorik ez dutela adierazten duten sinboloak edo testuak aurkitzea (3.4. Irudia), kontsumitzaileentzat erakargarriagoak izango direlakoan.

Bestalde, azken urteotan egindako ikerketen arabera, parabenoek aktibitate estrogenikoa dute (Darbre eta Harvey, 2014), nahiz eta toxikotasun akutua txikia den. Parabenoen luzaroko erabileraren ondorioz xurgapen dermiko nabarmena gerta daitekeela frogatu da eta hori bularreko minbiziarekin erlazionatu da (Barr *et al.*, 2012). Era berean, parabenoak produktu askotan daudenez ekosistemetara ere iritsi dira, hala nola ibaietako uretara, hondakin-uretara eta beste hainbat ingurunetara (Brausch eta Rand, 2011; Darbre eta Harvey, 2014). Egun, Danimarkan parabenoen erabilera lehen aldiz debekatu egin da, baina propilparabenoa eta butilparabenoa bakarrik debekatu dira eta umeentzako produktuen kasurako bakarrik. Europako beste herrialde batzuek ere, Frantzia kasu, parabenoen aurkako neurriak hartu dituzte haien legedietan (Dolzan *et al.*, 2013).

Azido organiko eta esterren kontserbagarri taldeari amaiera emateko, karbamatoaren eratorriak ere aipatu behar dira, adibidez, iodopropinilbutilkarbamatoa. Kontserbagarri horri muga nahiko zorrotzak ezarri dizkio Europako araudiak eta umeentzako produktuetan guztiz debekatuta dago.

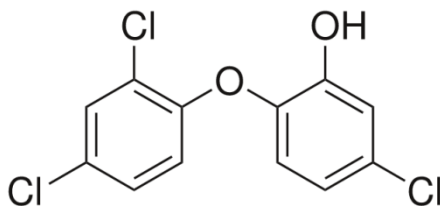


3.4. Irudia. Parabenoen inguruan sortutako alarmaren ondorioz, oso ohikoa da produktu kosmetiko askotan parabenoak ez dituztela adierazten duten sinboloak egotea.

Beste kontserbagarri talde garrantzitsua formaldehidoarena eta kontserbagarri formaldehido-askatzaileena da. Formaldehidoa kontserbagarri moduan gehien erabiltzen den aldehidoa da —oximetileno edo formalina izenarekin ere ezagutzen da—. Merkea da eta uretan disolbagarritasun nahiko altua du, hortaz, ura duten kosmetikoetan asko erabiltzen da, hala nola xanpuak, gelak eta xaboiak. Formaldehidoaren toxikotasuna aski frogatuta dago eta begietako narritadurak,

erredura sentrazioa, eztula, goragalea eta alergia sortzailea da. Kontzentrazio handiagoan buruko mina eta asma eragiteko gai dela ere adierazi da (Agner *et al.*, 1999; Polati *et al.*, 2007). Horretaz gainera, formaldehidoa minbizi sortzailea izan daitekeela frogatu da eta, Suedia eta Japonian, adibidez, debekatuta dago kosmetikoen osagai bezala erabiltzea. Europar Batasunaren kasuan, %0,2 formaldehido baino gehiago duten produktuak ez direla seguruak adierazi da, nahiz eta kontzentrazio baxuagoan formaldehidoa onartzen den (SCCNFP, 2002a; SCCNFP, 2002b). Bestalde, kontserbagarri batzuk formaldehidoa sor dezakete disolbatzaile akuoso polarretan, formaldehido-askatzaile deritzen (*formaldehyde-releasers*) kontserbagarriak. Horietakoak dira, esaterako, bronopola, diazolidinil urea, imidazolidinil urea, bentzilhemiformala, sodio hidroximetilglizinatoa eta Quaternium-15 delakoa —kimikoki, metenamin-3-kloroalilkloruroa—, besteak beste (Polati *et al.*, 2007). Formaldehidoa askatzeko duten gaitasuna kontuan hartuta, formaldehido-askatzaileei ere 1223/2009 araudiak mugak ezartzen dizkie.

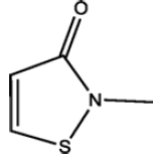
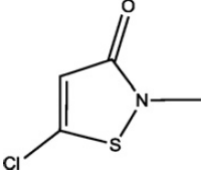
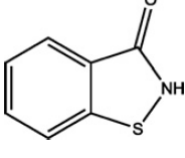
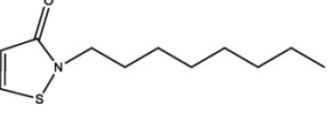
Fenolak eta fenolen deribatuak, hala nola fenola bera, *o*-fenilfenola, *p*-kloro-*m*-kresola, klorofenoa eta triklosana kontserbagarri talde garrantzitsua dira. Triklosana hidroxifenil eterraren deribatua da (3.5. Irudia) eta lurrinkortasun eta disolbagarritasun ertaina du uretan. Espektro zabaleko kontserbagarri antimikrobianoa da eta gaitasun biozida handia du bakterio, onddo eta legamien aurka (Singer *et al.*, 2002). Triklosana asko erabiltzen da kosmetikan eta zainketa pertsonaleko beste produktuetan egonkortasun termiko handia eta antimikrobiano eraginkorra delako, nahiz eta egunotan triklosana ezaugarri toxikoekin erlazionatzen hasi den. Aipatzekoa da azken urteotan egindako ikerketek triklosana minbiziarekin erlazionatzen dutela animalietan (Lee *et al.*, 2014). Hori garrantzitsua da triklosana hainbat giza laginetan aurkitu dela kontuan hartzen bada, esaterako, gernuan, odolean eta esnean. Triklosanaz gainera, bere deskonposaketa produktuak —klorofenolak, dioxinak eta konposatu polikloratuak— ere toxikoak direla frogatu da (Bedoux *et al.*, 2012). Dena den, SCCPk eta SCCSk araudiak ezarritako mugetan erabiltzen bada, triklosana segurua dela adierazi zuten duela urte batzuk egindako berrikuspenetan (SCCP, 2008; SCCS, 2011).



3.5. Irudia. Triklosan kontserbagarri antimikrobianoaren egitura kimikoa.

Isotiazolinona motako kontserbagarriak (3.4. Taula) ere biozida eraginkorrak dira eta ur inguruneko produktu askotan erabiltzen dira hazkuntza mikrobianoa saihesteko. 2*H*-Isotiazolin-3-onaren deribatu heteroziklikoak dira eta sufrea duen zati aktiboa dute, tiol taldeak oxidatzeko gai dena. Gaitasun horri esker bakterio eta ondo askoren aurkako babesa ematen die etxeko, indutriako eta kosmetikako produktuei (Collier *et al.*, 1990). Egun, metilisotiazolinona nahaste bat erabiltzen da gehien kosmetikan, hain zuzen ere, 2-metil-3-isotiazolinonaren eta 5-kloro-2-metil-3-isotiazolinonaren 3:1 nahastea; Kathon edo ProClin izen komertzialarekin saltzen dena. Kontzentrazio txikiak nahikoak direnez eraginkortasun handia lortzeko, industria kosmetikoan Kathon asko erabiltzen da urez kentzekoak nahiz larruzalean mantentzekoak diren produktuetan.

3.4. Taula. Isotiazolinona motako kontserbagarriak.

Izena	Izena (ingelesez)	CAS	Egitura
2-Metil-3-isotiazolinona	2-Methyl-3-isothiazolinone	2682-20-4	
5-Kloro-2-metil-3-isotiazolinona	5-Chloro-2-methylisothiazolinone	26172-55-4	
1,2-Bentzisotiazolinona	1,2-Benzisothiazolinone	2634-33-5	
2-Oktil-3-isotiazolinona	Benzyl alcohol	26530-20-1	

Isotiazolinonen erabilera asko handitu da azken urteotan (Alvarez-Rivera *et al.*, 2012) eta, ondorioz, sor ditzaketen albo-ondorioei buruzko ardura sortu da. 1,2-Bentzisotiazolinona eta 2-oktil-3-isotiazolinona ere industrian asko erabiltzen diren kontserbagarriak dira, baina kosmetikan ezin dira erabili ez daudelako 1223/2009 araudiaren V eranskinean. 2-Metil-3-isotiazolinona eta 5-kloro-2-metil-3-isotiazolinona substantzia alergenokoak direla gauza jakina da (Isaksson *et al.*, 2004; Admani *et al.*, 2014) eta baita ur-ekosistemei kalteak eragiteko gai direla

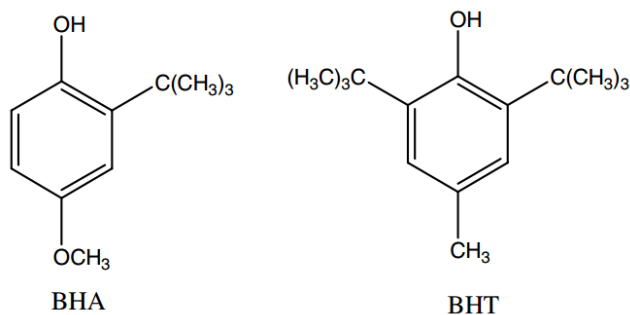
(Bellas, 2006). Europako 1223/2009 araudian isotiazolinonen kontzentrazio maximoak ezarrita daude —%0,0015 3:1 nahastearen kasuan eta %0,01 metilisotiazolinonaren kasuan— eta kontzentrazio horiek kontsumitzaileentzat seguruak direla bermatzen dute SCCSren azken berrikuspenek (SCCS, 2009; SCCS 2013). Hala ere, beste zenbait ikerketek isotiazolinonak uste baino toxikoagoak direla adierazi dute, ezaugarri neurotoxikoak dituztelako epe-luzeko kontaktuaren ondorioz (Vinayak *et al.*, 2014).

Beste kontserbagarri antimikrobiano taldeak ere badira, adibidez, aminak, amidak, piridinak eta bentzalkonio gatzak —triklokarbana, hexamidina, dibromohexamidina, klorohexidina, bentzalkonio kloruroa, metenamina, zetilpiridinio kloruroa, dikloro-*N*-metil azetamida eta abar—, alkoholak eta alkoholen deribatuak —fenoxietanola, fenoxiisopropanola, diklorobenzil alkohola, klorobutanola, alkohol bentzilikoa, besteak beste—, imidazol deribatuak —klinbazola, imidazolidinurea, diazolidinil urea eta abar— eta beste hainbat kontserbagarri —adibidez, bronidox eta metildibromo glutaronitriloa— (Polati *et al.*, 2007).

3.2.2. Kontserbagarri antioxidatzaileak

Antioxidatzaileek oxigenoaren ondorioz gertatutako erreakzioak saihestea dute helburu. Produktu kosmetikoen osagaiak zahartzea oztopatzen dute, adibidez, gantzak, olioak, surfaktanteak, perfumeak eta abar. Kontserbagarri antioxidatzaileek normalean talde erreduzitzaileak eta erradikal askeak harrapatzeko agenteak izaten dituzte. Kosmetikoetan erabiltzen diren antioxidatzaile asko daude: azido zitrikoa, azido galikoa eta bere esterrak, azido tiotikoa, azido glikolikoa, azido nordihidroguaiaietikoa eta abar. Hala ere, zalantzarik gabe erabilienetakoak hidroxitolueno butilatua (BHT, *Butylated HydroxyToluene*) eta hidroxianisol butilatua (BHA, *Butylated HydroxyAnisole*) dira (3.6. Irudia).

Kosmetikan ez ezik, BHA eta BHT elikagaien eta farmakoen industrian erabiltzen dira, baina, albo-ondorio esanguratsuak dituztela aipatu behar da. BHTk biriketako ehunak kaltetzeko gai dela frogatu da (Lanigan eta Yamarik, 2002; Prakash *et al.*, 2013) eta BHAK ugalketa sistemaren azpigarapena induzi dezakela frogatu da (Jeong *et al.*, 2005). Era berean, aipatzekoa da antioxidatzaile horiek minbizi-sortzaileak diren edo ez zalantzan dagoela: ikerketa batzuk minbiziarekin erlazionatzen dituzte (Ito *et al.*, 1985), beste batzuk erlaziorik ez dutela babesten dute (Botterweck *et al.*, 2000) eta minbiziaren aurka onak direla adierazten duenik ere bada (Williams eta Iatropoulos, 1996).



3.6. Irudia. BHAREN eta BHTREN egitura kimikoa. BHAK bi isomero ditu *tert*-butil taldearen kokapenaren arabera: 2-BHA eta 3-BHA.

3.2.3. Kontserbagarrien analisia

Lehenago aipatu den bezala, kontsumitzaileen segurtasuna bermatzeko garrantzitsua da kosmetikoetan erabil daitezkeen kontserbagarriak araututa egotea eta zein baldintzetan egin daitekeen adieraztea. Horretaz gainera, garrantzitsua da arauak betzen direla kontrolatzeko metodo analitikoak egotea. Europar Batasunean, badira zenbait metodo analitiko ofizial kontserbagarriak aztertzeko, baina ez guztien kasuan. Metodo ofizialen laburpena bibliografian aurki dezake irakurleak (Polati *et al.*, 2007). Aipatzeko da parabenoak analizatzeko metodo ofiziala likido-kromatografian oinarritzen dela eta interesekoak diren beste azido organikoena, aldiz, gas-kromatografian —azido salizilikoa, bentzoikoa, 4-hidroxibentzoikoa eta sorbikoa, besteak beste—.

Kontserbagarrien kuantifikazioa askotan prozesu konplexua izaten da, kosmetikoaren arabera erauzketa edo aurretratamendu teknikak erabili behar direlako. Banaketa kromatografikoaren kasuan, dena den, zenbaitetan posible da laginak disolbatzaile egokiarekin diluituz analisiak egitea. Erauzketa edo diluzio pauso horretan gehien erabiltzen diren disolbatzaileak hexanoa, metanola, etil eterra, etil azetatoa eta azetona dira; eta gehien erabilitako aurretratamenduak, aldiz, irabiaketa, zentrifugazioa eta ultrasonikazioa dira. Parabenoen aplikatutako aurretratamenduei buruzko berrikuspen sakona eta eguneratua bibliografian aurki daiteke (Cabaleiro *et al.*, 2014).

Teknika analitiko instrumentalei dagokienez, kontserbagarrien analisiari buruzko berrikuspen zorrotza bibliografian aurki daiteke (Polati *et al.*, 2007) eta bertan 1980 eta 2006 urteen artean egindako ikerketen laburpena ikusgai dago. Gehien erabili den teknika likido-kromatografia da, UV detektagailuarekin. TLC eta elektroforesi kapilarra (CE, *Capillary Electrophoresis*) ere erabili izan dira,

esaterako, parabenoak determinatzeko (Blanco *et al.*, 2008; Dolzan *et al.*, 2013). Era berean, CE teknika geroz eta erabiliagoa da kontserbagarri desberdinen aldibereko analisia lortzeko, izan ere teknika oso apoposa da konposatu hidrofoboan eta hidrofiloan aldibereko banaketa kromatografikoa lortzeko. Horretarako surfaktantea gehitu behar da elektrolito disoluzioan, baina hori sakonago aztertuko da hurrengo kapitulan. Azken urteotan —2008tik aurrera— produktu kosmetikoetan kontserbagarriak determinatzeko garatutako metodo analitiko batzuk 3.5. taulan jaso dira.

3.5. Taula. Kontserbagarriak analizatzeko metodoen laburpena.

Laginak	Aztertutako kontserbagarriak (kopurua)	Metodo analitikoaren laburpena	Erref.
Kosmetikoak eta ur laginak	Parabenoak (2)	DLLME UV	Khani <i>et al.</i> , 2014
Kosmetikoak	Parabenoak Azido organikoak (7)	MEKC-UV	Lopez-Gazpio <i>et al.</i> , 2014
Kosmetikoak Farmakoak	Parabenoak Azido organikoak Fenolaren deribatuak (11)	HPLC-UV	Aoyama <i>et al.</i> , 2013
Kosmetikoak	Parabenoak (4)	CZE-UV	Dolzan <i>et al.</i> , 2013
Umeentzako produktuak	Parabenoak Antioxidatzaileak Besteak (13)	MSPD GC-MS/MS	Sanchez-Prado <i>et al.</i> , 2013
Kosmetikoak	Parabenoak Azido organikoak (7)	CZE-UV	Xue <i>et al.</i> , 2013
Kosmetikoak eta etxerako produktuak	Isotiazolinonak (4)	HPLC-MS/MS	Alvarez-Rivera <i>et al.</i> , 2012
Kosmetikoak	Parabenoak Azido organikoak (10)	MEKC-UV	Cheng <i>et al.</i> , 2012
Kosmetikoak	Parabenoak Antioxidatzaileak (8)	SPME GC-MS	Yang <i>et al.</i> , 2010
Ur-laginak	Parabenoak (6)	NACE ^a -UV	Blanco <i>et al.</i> , 2008

^a*Nonaqueous Capillary Electrophoresis*

3.3. Ultramore-iragazkiak

Eguzki-izpien %6,5a erradiazio ultramoreari (UV) dagokio, alegia, 100-400 nm tarteko uhin-luzerakoari. Lurrazalera iristen den erradiazio ultramore horren %98a A-motako erradiazio ultramore da (UVA) eta %2a B-motako erradiazio ultramoreari dagokio (UVB). UVA izpiek 320-400 nm tarteko uhin-luzera dute. UVB izpiak, berriz, 290-320 nm-ko uhin-luzerakoak dira. Kontuan izan behar da uhin-luzera zenbat eta txikiagoa izan izpia orduan eta energetikoagoa dela eta, beraz, UVB izpiek energia gehiago dutela UVA izpiek baino. Zorionez, UVC izpiak —100-290 nm-koak— ez dira iristen lurrazalera atmosferak blokeatzen dituelako, UVB izpien zati garrantzitsu batekin batera (Chisvert eta Salvador, 2007). Hala ere, erradiazio ultramore parametro askoren menpe dago, esaterako, latitudea, urtaroa, eguneko ordua, baldintza meteorologikoak eta ozono-geruza. Adibidez, udako egunetan erradiazio ultramorearen UVB osagaia %3,5era irits daiteke (Fourtanier *et al.*, 2012).

UV erradiazioak efektu terapeutikoak ditu eguzkipeko egonaldi laburren kasuan, D bitaminaren ekoizpen endogenoa handitzen duelako. Bitamina horri esker kaltzioaren absortzioa areagotu egiten da eta ondorioz, zenbait patologia saihesten daitezke —osteoporosia, kasu—. Horretaz gainera, baditu beste hainbat efektu on artritiden prebentzioan, odol-presioaren erregulazioan eta muskuluen indarrean. Bestalde, beltzarandutako azala edertasunaren eredu izan ohi da gizabanako kaukasiarretan. Aitzitik, gauza jakina da azken hamarkadetan erradiazio ultramore gehiago iristen ari dela lurrazalera, nagusiki ozono-geruza estratosferikoak jasandako kalteak direla eta. Horren ondorioz, UV erradiazioak sortzen dituen kalteekin lotutako gaixotasunak areagotu egin dira: azaleko minbizia, fotodermatosia, orbanak, narritadurak eta azaleko immunologia-sistemaren kaltea (Chisvert *et al.*, 2013b).

UVB erradiazioa UVA baino kaltegarriagoa zela uste zen arren —arrazoi energetikoaren ondorioz—, aspalditik ezagutzen da UVA izpiek azalean gehiago barneratzeko gaitasuna dutela (Bruls *et al.*, 1984). Alde batetik, UVA erradiazioa oxigeno-espezie erreaktiboak (ROS, *Reactive Oxygen Species*) ekoizteko gai da, kromoforo exogenoekin edo endogenoekin elkarrekintza duenean; ROS horiek gai dira DNA, zelulak, ehunak eta odol-hodiak kaltetzeko (Mouret *et al.*, 2011). Bestetik, UVB erradiazioak —UVAren antzera— immunitate-sistema apaltzea dakar eta badakigu azaleko minbiziaren eragilea dela, melanoma barne.

Azaldutakoaren ildotik, ikusi izan da ezinbestekoa dela azalaren UVA eta UVB izpien peko egonaldia murriztea, eguzki-izpiak denbora luzez jasotzen direnean; horretarako, eguzki-kremak eta antzeko produktu kosmetikoak erabili ohi dira. Eguzki-kremen konposizioan badaude hainbat konposatu kimiko, ultramore-iragazki izenekoak, eta erradiazio ultramore azalera iristea saihesten dutenak.

3.6. Taula. UV-iragazkien sailkapena.

Izena	Egitura	Adibideak
Bentzofenonaren deribatuak ^a		Bentzofenona-1 (BZ1) Bentzofenona-2 (BZ2) Bentzofenona-3 (BZ3) Bentzofenona-4 (BZ4)
Azido 4-aminobentzoikoen deribatuak (PABA) ^a		Etilhexil dimetil PABA (EDP) Pentil dimetil PABA (PDP) PEG25 PABA (P25)
Salizilatoak		Etilhexil salizilatoa (ES) Homosalatoa (HS) TEA salizilatoa (TS)
Zinamatoak		Zinoxatoa (CX) Diisopropil metil zinamatoa (DMC) Azido ferulikoa (FA)
Kanforren deribatuak		Bentziliden kanfor azido sulfonikoa (BCS, irudian) 3-Bentziliden kanforra (3BC)
Triazinaren deribatuak		Dietilhexil butamido triazona (DBT) Etilhexil triazona (ET)
Bentzotriazolaren deribatuak		Drometrisol trisiloxanoa (DRT, irudian)
Bentzimidazolaren deribatuak		Fenilbentzimidazol azido sulfonikoa (PBS, irudian)

^aErradikalei buruzko argibideak: Chisvert eta Salvador, 2007.

Konposatu kimiko horiek organikoak edo ez-organikoak izan daitezke; organikoak gai dira UV erradiazioa xurgatzeko eta ez-organikoak UV erradiazioa islatzeko. Egun, UV-iragazkiak ez dira eguzki-kremetan bakarrik erabiltzen eta beste hainbat produktutan ere gehitzen dira: *aftershave* produktuak, lozio hidratatzaileak, xanpuak, zahartzearen aurkako produktuak eta abar. Kontsumitzaileen segurtasuna bermatzeko, herrialde askok UV-iragazki moduan erabil daitezkeen konposatu kimikoak arautu dituzte, eta haien kontzentrazio maximoak ezarri dituzte, lurrinekin eta kontserbagarriekin egin den bezala. Europar Batasunaren kasuan, 1223/2009 VI eranskinean badago UV-iragazki moduan erabil daitezkeen 27 konposatuen zerrenda, eta iragazki bakoitzaren kontzentrazio maximoa zein den adierazten da. Hala ere, haietako bat —azido 4-aminobentzoikoa— 2013an debekatu zen, eta beraz, 26 konposatu dira guztira.

UV-iragazkiak talde kimikoaren arabera sailkatuta honako hauek bereiz daitezke (Chisvert eta Salvador, 2007): bentzofenonaren deribatuak, azido 4-aminobentzoikoaren deribatuak, salizilatoak, zinamotoak, kanferraren deribatuak, triazinaren deribatuak, bentzotriazolaren deribatuak eta bentzimidazolaren deribatuak (3.6. Taula). Gehienek talde ionizagarriak dituzte egituran —SO₃H eta COOH, kasu—, ur-disolbagarritasun egokia izateko.

3.3.1. Ultramore-iragazkien analisisia

Eguzkitarako produktuetan dauden UV-iragazkiak determinatzea garrantzitsua da kontsumitzaileen segurtasuna eta produktuen eraginkortasuna bermatzeko. UV-iragazkien analisisia nagusiki hiru tekniken bidez egin da bibliografian; kromatografia, espektroskopia eta teknika elektrokimikoak. 2006ko ekainera arte egindako berrikuspen bibliografikoan (Chisvert eta Salvador, 2007) teknika horien erabilpena %78, %18 eta %4 izan dela ikusi zuten, hurrenez hurren. Beraz, kromatografia da teknika analitikorik arruntena eta, jakina, UV-iragazkien ezaugarri fisikokimikoen ondorioa da hori.

Banaketa kromatografikoen kasuan, likido-kromatografia, gas-kromatografia eta geruza fineko kromatografia (TLC, *Thin Layer Chromatography*) dira ohikoenak, baina, LC da gehien erabili dena. Likido-kromatografiak lurrunkortasun altuak dituzten konposatuak kuantifikatzeko teknika aproposa da eta UV-iragazki gehienak talde horretan sailkatzen dira. Hala ere, badira gas-kromatografian oinarritzen diren metodoak ere, normalean MS detektagailua izaten dutenak (Haunschmidt *et al.*, 2011; Sánchez-Brunete *et al.*, 2011). LCri dagokionez, aldiz, UV detektagailuak —DAD motakoak, esaterako— ohikoagoak dira, UV iragazkiek UV absortzio handia dutelako (Liu eta Wu, 2011; Vosough *et al.*, 2012). LC banaketak lortzeko, hainbat disolbatzaile organiko erabil daitezke eluitzaile moduan, hala nola azetonitriloa, metanola, tetrahidrofuranoa, etanola

eta ura (Chisvert eta Salvador, 2007). Aipatzekoa da inguruneari kalterik egiten ez dioten disolbatzaile organikoak erabiliz lortutako 18 UV-iragazkien banaketa (Salvador eta Chisvert, 2005). Bestalde, 2004ean lehen aldiz lortu zen LC eta MS detektagailua akoplatzea UV-iragazkiak kuantifikatzeko (Hauri *et al.*, 2004). Geruza fineko kromatografia ere iragazkien kuantifikaziora aplikatu bada ere, egunotan elektromigrazio-teknikak gorantz ari dira. Aipatzekoak dira esparru horretan zonako elektroforesi kapilarra (Maijó *et al.*, 2013), kromatografia elektrozinetiko mizelarra (Deng *et al.*, 2011) eta mikroemultsio kromatografia elektrozinetikoa (Klampfl eta Leitner, 2003).

3.4. Aldibereko analisisia

Azken urteotan intereseko esparrua da hainbat osagai aldiberean kuantifikatu ahal izatea. Era horretan, analisi bakarrean kapitulu honetan aipatu diren konposatuak kuantifikatzea errazagoa da errutinako analisisietan. Literaturan erronka horri aurre egiten dioten zenbait ikerketa aurki daitezke, eta horietako batzuk 3.7. taulan jasota daude. Ikus daitekeenez, metodo analitiko gehienek MS detektagailua erabiltzen dute analisi konplexu horiek egiteko, baina, detektagailu eta teknika instrumental sinpleago eta merkeagoen bidez ere aldibereko banaketa kromatografikoa lor daiteke —MEKC-DAD eta HPLC-DAD, kasu—.

3.7. Taula. Lurrin alergenoen (PAS), kontserbagarrien (kon.) eta ultramore-iragazkien (UV-ir.) aldibereko analisirako metodoak.

Laginak	Analitoak			Teknika instrumentala	Erref.
	PAS	Kon.	UV-ir.		
Giza gernua	–	X	X	HPLC-MS/MS	Asimakopoulos <i>et al.</i> , 2014
Kosmetikoak eta PCPak	X	X	–	GC-MS/MS	Celeiro <i>et al.</i> , 2014
Kosmetikoak eta PCPak	X	X	–	MEKC-DAD	Lopez-Gazpio <i>et al.</i> , 2014
Giza gernua	–	X	X	UHPLC-MS/MS	Vela-Soria <i>et al.</i> , 2014
Umeentzako kosmetikoak	X	X	–	GC-MS/MS	Sanchez-Prado <i>et al.</i> , 2013
Ur-laginak	–	X	X	UHPLC-MS/MS	Gracia-Lor <i>et al.</i> , 2012
Kosmetikoak	–	X	X	GC-MS	Haunschmidt <i>et al.</i> , 2011
Eguzkitarako produktuak	–	X	X	HPLC-DAD	Kim <i>et al.</i> , 2011
Perfumeak	X	X	–	GC-MS	Sanchez-Prado <i>et al.</i> , 2011
Giza esnea	–	X	X	GC-MS; LC-MS	Schlumpf <i>et al.</i> , 2010

3.5. Resumen traducido: Fragancias alérgenas, conservantes y filtros ultravioleta

1. Fragancias alérgenas

Como se ha mencionado en el capítulo 1, el reglamento europeo exige que la presencia de ciertos ingredientes esté indicada en la etiqueta de los cosméticos. No obstante, y en lo referente a las fragancias, estas se incluyen en la etiqueta con el nombre genérico “perfume” o “aroma”, ya que la fragancia puede llegar a estar compuesta por cientos de ingredientes. A pesar de que eso está permitido en ciertos casos, la directiva europea 2003/15/EC (European Parliament and European Council, 2003) identificó 26 fragancias alérgenas (Tabla 3.1.), denominadas PAS (*Potentially Allergenic Substances*). Las sustancias PAS, que actualmente están incluidas en el anexo III del reglamento 1223/2009, tienen un uso restringido y su presencia debe indicarse en la etiqueta si su concentración excede el 0,001% en cosméticos de duración prolongada (*leave-on products*) y si excede el 0,01% en cosméticos de eliminación por aclarado (*rinse-off products*).

Encabezado de la tabla 3.1. (3.1. Taula): 26 Sustancias alérgenas PAS. Izena(k): Nombre(s); Izena(k) (ingelesez): Nombre(s) (en inglés); Egitura: Estructura.

El primer informe sobre las PAS fue publicado en 1999 por parte del SCCNFP (SCCNFP, 1999), y se revisó la bibliografía referente a dichas sustancias. En sus conclusiones, se propuso establecer límites al uso de 26 sustancias debido a su potencial alérgeno. De estas 26 sustancias, 24 son compuestos químicos volátiles y 2 son extractos naturales de dos variedades de musgo. La información aportada en las etiquetas es esencial para los consumidores que padecen alergia de contacto, ya que ayuda tanto en el diagnóstico como en la prevención de dicha alergia. En 2012 el SCCP (*Scientific Committee on Consumer Products*) revisó la información toxicológica concerniente a las PAS (SCCP, 2012); concluyendo que las decisiones tomadas por el SCCNFP en 1999, aún son válidas y correctas.

Las PAS se clasifican de acuerdo al SCCP en dos listas: la lista A incluye las 13 PAS de uso más habitual y la lista B las 11 fragancias alérgenas cuyo uso no es tan común. Además, estos alérgenos pueden clasificarse según los grupos químicos, como muestra de la gran variedad de grupos funcionales que están presentes. Estas dos clasificaciones se han recogido en la tabla 3.2.

Encabezado de la tabla 3.2. (3.2. Taula): Clasificación de las PAS (Furlanetto et al., 2010; SCCS, 2012) y sus log K_{ow} (Tsiallou et al., 2012). SCCS zerrenda: Lista SCCS; Sailkapen kimikoa: Clasificación química.

1.1. Alérgenos y seguridad

La alergia de contacto es un problema de salud que afecta a gran parte de la población y el correcto etiquetado de los productos cosméticos puede prevenir sus efectos (Figura 3.1.). Entre las pruebas que se han de realizar a los cosméticos antes de su comercialización, los tests concernientes a las PAS son importantes, debido a los diversos efectos que estas sustancias puede provocar en los consumidores (SCCS, 2012).

Pie de figura 3.1. (3.1. Irudia): En la etiqueta de este cosmético se han identificado las siguientes PAS: Butylphenyl Methylpropional, Alpha Isomethyl Ionone, Citronellol, Coumarin eta Linalool. Esta información es muy útil para los consumidores que padecen alergia.

Los efectos en la salud causados por el uso de cosméticos normalmente son dermatológicos, principalmente eczemas. Estos son causados por la aplicación de cosméticos sobre la piel y las partes del cuerpo más afectadas suelen ser brazos, axilas y cara (Klaschka, 2013). Además, las fragancias alérgenas pueden ser perjudiciales si se padecen enfermedades respiratorias como asma u otras (SCCNFP, 1999; Rumchev *et al.*, 2004; Magnano *et al.*, 2009). El peligro de las PAS se ve especialmente agudizado en el caso de productos para bebés, ya que su sistema inmunológico no está completamente desarrollado (Masuck *et al.*, 2011; Sanchez-Prado *et al.*, 2013).

Desde la entrada en vigor de la directiva 2003/15/EC, la determinación de las PAS ha sido un reto importante para la química analítica, siendo destacable que dos años antes de su entrada en vigor no se disponía de ningún método fiable para su cuantificación (Chaintreau, 2007).

1.2. Análisis de fragancias alérgenas

Como se ha expuesto en la tabla 3.2., las 24 PAS (los dos extractos naturales no se tendrán en cuenta al tratarse de mezclas complejas e indefinidas químicamente) pertenecen a familias químicas muy diversas. Por otra parte, al ser todas ellas sustancias relativamente volátiles, la cromatografía de gases es la técnica instrumental más ampliamente utilizada para su cuantificación. Para poder determinar de forma simultánea todas, o la mayor parte, de las PAS es necesario acoplar un detector universal a la técnica de separación, como por ejemplo el detector FID, a pesar de que la selectividad se ve perjudicada. También hay que tener en cuenta el amplio rango de concentraciones en los que están presentes los ingredientes empleados en cosmética, que pueden variar de $\mu\text{g}/\text{kg}$ a porcentajes del 20%. Uno de los detectores más utilizados, además del FID, es sin duda el detector MS, a pesar de que en ambos casos uno de los puntos débiles de la separación

cromatográfica es la coelución de varios compuestos. El empleo de técnicas multidimensionales (GCxGC) o la aplicación de técnicas de pretratamiento y limpieza han solucionado en parte este problema.

La determinación de fragancias alérgicas se llevó a cabo por primera vez en 1995, incluso antes de que las PAS fueran incluidas en el reglamento europeo. En el método propuesto (Rastogi, 1995) se consiguieron separar 11 PAS por medio de SPE-GC y detectores MS y FID para la identificación y para la cuantificación, respectivamente. El método es bastante laborioso, ya que requiere dos separaciones cromatográficas por cada muestra analizada, una para la identificación y otra para la cuantificación de las PAS; además, el método no evita los problemas de coelución, como se demostró más adelante (Chaintreau, 2007). Posteriormente, el propio Rastogi mejoró el método de determinación de PAS, pudiendo cuantificar las 24 en una única separación cromatográfica (Rastogi, 2002).

Otro método descrito posteriormente (Chaintreau *et al.*, 2003) aportó mejoras interesantes al proceso de cuantificación, ya que en dicho método los perfumes concentrados son inyectados directamente en el GC. No obstante, los autores detallan que es esencial para el correcto funcionamiento del método limpiar de manera exhaustiva el equipo para que no tengan lugar problemas de contaminación. Cabe destacar que este método fue el propuesto por la IFRA como método oficial para la determinación de PAS en perfumes (IFRA, 2007), incluyendo dos recomendaciones para evitar los problemas derivados de la coelución de analitos.

En la literatura se han descrito también diversos procedimientos para el pretratamiento de las muestras, como por ejemplo SBSE (*Stir Bar Sorptive Extraction*), SPME (*Solid Phase Microextraction*) SPD-PLE (*Solid-Phase Dispersion-Pressurized Liquid Extraction*) y MSPD (*Matrix Solid-Phase Dispersion*) (Chisvert *et al.*, 2013a). El lector puede encontrar más detalles sobre el pretratamiento de productos cosméticos en la bibliografía especializada (Chaintreau, 2007; Wang, 2013).

Una de las técnicas más novedosas utilizada en la cuantificación de PAS es la denominada GC completa (*Comprehensive GC*) o bien su variante multidimensional (GCxGC) (Chisvert *et al.*, 2013a). Esta técnica es relativamente reciente, que en la década de los 90 se utilizó por primera vez para la separación de PAS (Liu y Phillips, 1991). También se ha conseguido cuantificar PAS por medio de GCxGC-FID (Shellie *et al.*, 2004). A pesar de que estos primeros trabajos no supusieron una ventaja importante respecto a los que ya estaban disponibles, posteriormente se desarrollaron métodos basados en GCxGC-MS que minimizaron los problemas de coelución y falta de selectividad (Debonneville y Chaintreau, 2004) También existen técnicas más complejas como puede ser la GCxGC-(TOF)MS (LECO, 2004) o la GCxGC-qM (Cordero *et al.*, 2007) que si bien son excelentes desde el punto de vista analítico, su elevado coste hace muy difícil su aplicación al análisis de rutina (Chaintreau, 2007).

En la tabla 3.3. se resumen los métodos más recientes desarrollados para la determinación de PAS, en los que se puede ver claramente que la GC es la técnica más común. De hecho, una extensa revisión de 2013 (Chisvert *et al.*, 2013a) menciona que existen únicamente dos investigaciones relativas a la cuantificación de PAS por métodos que no estén basados en la cromatografía de gases. El primero se basa en la cromatografía de líquidos (Villa *et al.*, 2007) y un pretratamiento sencillo de las muestras (dilución, sonicación y filtración); y el segundo, utiliza la cromatografía electrocinética en microemulsión (MEEKC, *Microemulsion Electrokinetic Chromatography*), aunque sólo cuantifica 18 de los 24 PAS (Furlanetto *et al.*, 2010).

Encabezado de la tabla 3.3. (3.3. Taula): Resumen de métodos para analizar PAS en productos cosméticos. Laginak: Muestras; PAS kopurua: Número de PAS; Metodo analitikoaren laburpena: Resumen del método analítico; Erref.: Ref.; Kosmetikoak: Cosméticos; Zainketa pertsonalerako produktuak: Productos para el cuidado personal; Jostailuak: Juguetes; Umeentzako kosmetikoak: Cosméticos para niños; Hondakin-urak: Aguas residuales; Umeen listua: Saliva de niños; Kremak: Cremas.

2. Conservantes

Los conservantes se añaden en una amplia variedad de productos, como por ejemplo cosméticos, PCPs, fármacos y productos de alimentación para garantizar su estabilidad. Los compuestos químicos antimicrobianos evitan el crecimiento de microorganismos en los productos, y los antioxidantes los protegen frente a otros factores (como el aire o los rayos solares) que alteran sus propiedades. En lo referente al reglamento europeo, sólo los antimicrobianos son considerados conservantes, a pesar de que en este texto no se hará esa distinción. En el caso del reglamento 1223/2009, los conservantes autorizados están recogidos en el anexo V, así como sus límites y condiciones de uso (European Parliament and European Council, 2009).

2.1. Conservantes antimicrobianos

En los PCPs y cosméticos que contienen agua es imprescindible añadir conservantes que los protejan del crecimiento de microorganismos como bacterias y hongos. En algunos casos, la contaminación microbiana sólo afecta a las propiedades organolépticas del producto; pero por lo general, esta contaminación puede poner en riesgo la salud del consumidor (Polati *et al.*, 2007). Por otra parte, la adición de conservantes puede provocar efectos secundarios en los consumidores, ya sea a corto o a largo plazo. La literatura científica recoge numerosos ejemplos de efectos secundarios causados por los conservantes, como pueden ser la irritación de

la piel o cierta actividad estrogénica (DHI, 2007; Shaw y deCatanzaro, 2009). También hay pruebas que apuntan que algunos conservantes pueden ser inductores del cáncer en humanos (Jensen *et al.*, 2005; Darbre y Harvey, 2008; Darbre y Harvey, 2014). Por ello, es de gran importancia controlar esos dos parámetros, es decir, evitar el crecimiento microbiano en cosméticos y evitar que los conservantes empleados causen efectos secundarios en la salud de los consumidores.

Los conservantes antimicrobianos se suelen clasificar dependiendo de sus grupos funcionales químicos más importantes (Polati *et al.*, 2007). En primer lugar, se encuentran los ácidos orgánicos y sus sales y ésteres. En este grupo se incluyen el ácido dehidroacético, ácido sórbico, ácido salicílico, ácido propiónico y sus sales, y también el ácido benzoico y sus sales y alquil ésteres. Sin duda estos últimos compuestos son los conservantes más estudiados, conocidos por el nombre de parabenos. Los parabenos son los alquil ésteres del ácido 4-hidroxibenzoico (Figura 3.3.)

Pie de figura 3.3. (3.3. Irudia): Estructura general de los parabenos, donde R corresponde al grupo alquilo.

Los más comunes son el metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, butilparabeno e isopropilparabeno, aunque también se incluyen algunos otros en la 12ª entrada del anexo V del reglamento 1223/2009. Los parabenos son conservantes antimicrobianos muy eficaces, por lo que se han incluido en una gran variedad de cosméticos, productos para el cuidado personal, etc. Según el reglamento europeo, su concentración máxima autorizada es del 0,4% (de manera independiente) y del 0,8% (como mezcla de parabenos). A pesar de que los comités europeos se han pronunciado de manera reiterada sobre su seguridad (SCCS, 2010; SCCS, 2013), son sin duda los conservantes que más alarma han generado y es habitual encontrar productos en cuya etiqueta se indica que no contienen parabenos (Figura 3.4).

Esta preocupación se debe en parte a algunos estudios donde han mostrado que los parabenos tienen cierta actividad estrogénica (Darbre y Harvey, 2014), también se han relacionado con el cáncer de mama (Barr *et al.*, 2012) y con el perjuicio al medio ambiente (Brausch y Rand, 2011; Darbre y Harvey, 2014). Actualmente, países como Dinamarca y Francia han tomado medidas legales en contra de los parabenos con prohibiciones parciales más severas que las indicadas en el reglamento europeo (Dolzan *et al.*, 2013).

Otro grupo de conservantes son el formaldehído (también denominado oximetileno o formalina) y los compuestos liberadores de formaldehído. El formaldehído es relativamente barato y soluble en agua, por lo que se ha utilizado de manera generalizada en PCPs, a pesar de que su toxicidad está demostrada (Agner *et al.*, 1999; Polati *et al.*, 2007). Cabe mencionar que debido a sus efectos

potencialmente cancerígenos su uso está actualmente prohibido en Suecia y Japón. En el caso de la Unión Europea, se permite una concentración de formaldehído del 0,2% como máximo ya que el SCCNFP consideró, tras las oportunas revisiones de la literatura científica, que su uso es seguro por debajo de dicha concentración (SCCNFP, 2002a; SCCNFP, 2002b). También hay que considerar que otros compuestos, denominados liberadores de formaldehído, son capaces de generar formaldehído en su degradación, por lo que también están controlados por el reglamento de cosméticos.

Los fenoles y derivados del fenol son otro amplio grupo de conservantes entre los que se encuentran el *o*-fenilfenol, el *p*-cloro-*m*-cresol y el triclosan, entre otros. El triclosan es un derivado del hidroxifenil éter (Figura 3.5.). Es un conservante antimicrobiano de amplio espectro y de gran capacidad biocida contra hongos, bacterias y levaduras (Singer *et al.*, 2002). Su uso ha sido también muy amplio en diversos productos del hogar y del cuidado personal. Se ha detectado su presencia en muestras humanas como la orina, el suero o la leche materna (Lee *et al.*, 2014), y se han encontrado evidencias de su toxicidad en humanos.

Pie de figura 3.5. (3.5. Irudia): Estructura química del conservante antimicrobiano triclosan.

Las isotiazolinonas son otro grupo de biocidas efectivos, ampliamente utilizados en productos acuosos para evitar el crecimiento microbiano (Alvarez-Rivera *et al.*, 2012) (Tabla 3.4.). Actualmente se emplean como mezcla 3:1 de la 2-metil-3-isotiazolinona y de la 5-kloro-2-metil-3-isotiazolinona, mezcla denominada Kathon o ProClin, y cuya concentración máxima está regulada por el reglamento europeo (0,0015%). Su toxicidad, así como su acumulación en los ecosistemas ha sido mostrada en diversos estudios (Isaksson *et al.*, 2004; Admani *et al.*, 2014) y algunos investigadores han advertido recientemente que la neurotoxicad de las isotiazolinonas (Vinayak *et al.*, 2014) podría ser bastante mayor de lo que apuntan los informes del SCCS (SCCS, 2009; SCCS, 2013).

Encabezado de la tabla 3.4. (3.4. Taula): Conservantes del grupo de las isotiazolinonas. Izena: Nombre; Izena (ingelesez): Nombre (en inglés); Egitura: Estructura.

2.2. Conservantes antioxidantes

Los antioxidantes son aquellos compuestos cuya función es prevenir la acción de las sustancias oxidantes en los cosméticos. Algunos ingredientes presentes en los productos cosméticos, como las grasas, los aceites o los perfumes pueden sufrir cierto envejecimiento que los grupos reductores de los antioxidantes pueden ayudar a prevenir. En cosmética se utilizan antioxidantes tales como ácido cítrico, ácido

gálico y sus ésteres, ácido tióctico, ácido glicólico, etc. No obstante, sin lugar a dudas los antioxidantes más comunes en cosmética son el hidroxitolueno butilado (BHT, *Butylated HydroxyToluene*) y el BHA (*Butylated HydroxyAnisole*) (Figura 3.6.). También existen indicios de la toxicidad de estos antioxidantes (Lanigan y Yamarik, 2002; Jeong *et al.*, 2005; Prakash *et al.*, 2013) aunque el debate sobre su posible incidencia en algunos tipos de cáncer no está clara (Ito *et al.*, 1985; Williams y Iatropoulos, 1996; Botterweck *et al.*, 2000).

Pie de figura 3.6. (3.6. Irudia): Estructura química del BHA y BHT. El BHA tiene dos isómeros (2-BHA y 3-BHA) dependiendo de la posición del grupo tert-butilo.

2.3. Análisis de conservantes

Como se ha mencionado con anterioridad en el caso de las PAS, es necesario establecer mecanismos analíticos de control para el seguimiento de productos cosméticos comercializados y para garantizar la seguridad de los consumidores. En la Unión Europea, existen algunos métodos oficiales para el análisis de algunos conservantes y cuyo resumen puede encontrarse en la bibliografía (Polati *et al.*, 2007). Entre los métodos oficiales, destaca el destinado a la determinación de parabenos basado en LC y algunos otros basados en GC para la determinación de ácidos orgánicos (principalmente, salicílico, benzoico, 4-hidroxibenzoico y sórbico).

En general, el análisis de conservantes en cosméticos resulta complejo debido a que suele ser necesario un pretratamiento o una limpieza de la muestra, a pesar de que en algunos casos es posible la inyección directa del cosmético en el equipo cromatográfico, previa dilución. En lo referente a los parabenos, que son probablemente los más estudiados, existe una extensa y actualizada revisión sobre técnicas de pretratamiento de muestras (Cabaleiro *et al.*, 2014).

En cuanto a la técnica instrumental más común, destaca la cromatografía de líquidos con detector ultravioleta (Polati *et al.*, 2007); aunque también la electroforesis capilar se ha utilizado en los últimos años para la determinación de conservantes (Blanco *et al.*, 2008; Dolzan *et al.*, 2013). Esto es debido a que la electroforesis capilar es una técnica especialmente útil para separar compuestos de variada hidrofobicidad de manera simultánea. Una revisión de los estudios publicados recientemente puede verse en la tabla 3.5.

Encabezado de tabla 3.5. (3.5. Taula): Resumen de métodos para el análisis de conservantes. Laginak: Muestras; Aztertutako kontserbagarriak (kopurua): Conservantes analizados (número); Metodo analitikoaren laburpena: Resumen del método analítico; Erref.: Ref.; Kosmetikoak: Cosméticos; Ur-laginak: Muestras de agua; Umeentzako produktuak: Productos para niños; Etxerako produktuak: Productos para el hogar.

3. Filtros ultravioleta

El 6,5% de los rayos solares que alcanza la corteza terrestre corresponde a la radiación ultravioleta, de la cual el 98% es de tipo A (UVA) y el otro 2% de tipo B (UVB). Los rayos UVA son aquellos cuya longitud de onda está en el rango 320-400 nm y los UVB están en el rango 290-320 nm (Chisvert y Salvador, 2007). A pesar de ello, la radiación ultravioleta depende también de otros factores, como pueden ser la latitud, la hora del día, las condiciones climáticas etc. Por ejemplo, los días de verano la radiación UVB (la más peligrosa) puede alcanzar el 3,5% (Fourtanier *et al.*, 2012)

Si bien la radiación tiene ciertos efectos beneficiosos para la salud, como el aumento de la producción de vitamina D (que ayuda a la absorción de calcio) o la mejora de enfermedades como la osteoporosis, tiene también efectos perjudiciales. El cáncer de piel, la fotodermatosis, ciertas irritaciones cutáneas o los riesgos asociados al sistema inmunológico de la piel están claramente correlacionados con la radiación ultravioleta (Chisvert *et al.*, 2013b).

Por lo mencionado, resulta esencial proteger la piel de la radiación solar, especialmente en casos de exposición prolongada al sol. Para ello, las cremas solares contienen una serie de sustancias, denominadas filtros ultravioleta que ayudan a evitar que la radiación UVA y UVB llegue a la piel. Estos compuestos químicos, que pueden ser orgánicos o inorgánicos, absorben o reflejan (respectivamente) la radiación. Son muchos los productos para el cuidado personal, además de las cremas solares, los que tienen este tipo de sustancias entre sus ingredientes: lociones para después del afeitado (*aftershaves*), lociones hidratantes, champús, productos contra el envejecimiento, etc. En el caso de la Unión Europea, el anexo VI del reglamento 1223/2009 recoge un listado de 26 sustancias que pueden ser empleadas como filtros UV, entre las que destacan los derivados de la benzofenona, derivados del ácido 4-aminobenzoico, salicilatos, cinamatos, derivados de la triacina, derivados del benzotriazol y derivados del bencimidazol (Tabla 3.6.) (Chisvert y Salvador, 2007).

Encabezado de tabla 3.6. (3.6. Taula): Clasificación de los filtros UV.

3.1. Análisis de filtros ultravioleta

La identificación y cuantificación de filtros UV se ha llevado a cabo principalmente por cromatografía, espectroscopía y técnicas electroquímicas. Según una extensa revisión de los estudios publicados hasta junio de 2006 (Chisvert y Salvador, 2007), los porcentajes correspondientes a cada técnica son el 78%, 18% y 4%, respectivamente. En cuanto a las técnicas de separación cromatográfica, LC, GC y TLC son las más utilizadas, aunque la primera es sin duda la más común. Esto se debe a que los filtros UV son relativamente poco volátiles y su alta absorción UV

los hace idóneos para su determinación por detectores DAD. A pesar de ello, también existen algunos estudios basados en GC-MS (Haunschmidt *et al.*, 2011; Sánchez-Brunete *et al.*, 2011). Además, también se ha conseguido la separación de filtros UV por técnicas basadas en la electromigración, técnicas tales como la electroforesis capilar zonal (Maijó *et al.*, 2013), la cromatografía electrocinética micelar (Deng *et al.*, 2011) o la cromatografía electrocinética en emulsión (Klampfl y Leitner, 2003).

4. Análisis simultáneo

Uno de los retos de las técnicas instrumentales disponibles actualmente es el análisis simultáneo de los ingredientes de cosmética mencionados a lo largo de este capítulo, ya que facilitaría el análisis rutinario de PCPs. En la literatura científica existen algunos estudios que lo han llevado a cabo y que se han resumido en la tabla 3.7. Como puede observarse, la mayoría de dichos estudios se basan en detectores de MS, aunque también es posible lograrlo con técnicas más simples como MEKC-DAD o HPLC-DAD.

Encabezado de tabla 3.7. (3.7. Taula): Métodos para el análisis simultáneo de fragancias alérgicas (PAS), conservantes (kon.) y filtros UV (UV-ir.). Laginak: Muestras; Analitoak: Analitos; Teknika instrumentala: Técnica instrumental; Erref.: Ref.

3.6. Erreferentziak / Referencias

Admani, S.; Matiz, M.D.C.; Jacob, M.D.S.E.: *Methylisothiazolinone: A Case of Perianal Dermatitis Caused by Wet Wipes and Review of an Emerging Pediatric Allergen*, *Pediatric Dermatology*, 31, 350-352, 2014.

Agner, T.; Flyvholm, M.; Menné, T.: *Formaldehyde Allergy: A Follow-Up Study*, *American Journal of Contact Dermatitis*, 10, 12, 1999.

Alvarez-Rivera, G.; Dagnac, T.; Lores, M.; Garcia-Jares, C.; Sanchez-Prado, L.; Lamas, J.P.; Llopart, M.: *Determination of Isothiazolinone Preservatives in Cosmetics and Household Products by Matrix Solid-Phase Dispersion Followed by High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*, *Journal of Chromatography A*, 1270, 41-50, 2012.

Aoyama, A.; Doi, T.; Tagami, T.; Kajimura, K.: *Simultaneous Determination of 11 Preservatives in Cosmetics by High-Performance Liquid Chromatography*, *Journal of Chromatographic Science*, 1-6, 2013.

Asimakopoulos, A.G.; Wang, L.; Thomaidis, N.S.; Kannan, K.: *A Multi-Class Bioanalytical Methodology for the Determination of Bisphenol A Diglycidyl Ethers, p-Hydroxybenzoic Acid Esters, Benzophenone-Type Ultraviolet Filters, Triclosan, and Triclocarban in Human Urine by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*, *Journal of Chromatography A*, 1324, 141-148, 2014.

Barr, L.; Metaxas, G.; Harbach, C.A.J.; Savoy, L.A.; Darbre, P.D.: *Measurement of Paraben Concentrations in Human Breast Tissue at Serial Locations Across the Breast from Axilla to Sternum*, *Journal of Applied Toxicology*, 32, 219-232, 2012.

Bedoux, G.; Roig, B.; Thomas, O.; Dupont, V.; Le Bot, B.: *Occurrence and Toxicity of Antimicrobial Triclosan and by-Products in the Environment*, *Environmental Science and Pollution Research*, 19, 1044-1065, 2012.

Bellas, J.: *Comparative Toxicity of Alternative Antifouling Biocides on Embryos and Larvae of Marine Invertebrates*, *Science of the Total Environment*, 367, 573-585, 2006.

Bernard, G.; Gimenez-Arnau, E.; Rastogi, S.C.; Heydorn, S.; Johansen J.D.; Menné, T.; Goossens, A.; Andersen, K.; Lepoittevin, J.-P.: *Contact Allergy to Oak Moss: Search for Sensitizing Molecules Using Combined Bioassay-Guided Chemical*

Fractionation, GC-MS, and Structure-Activity Relationship Analysis, Archives of Dermatological Research, 295, 229-235, 2003.

Blanco, E.; Casais, M. del C.; Mejuto, M. del C.; Cela, R.: *Simultaneous Determination of p-Hydroxybenzoic Acid and Parabens by Capillary Electrophoresis with Improved Sensitivity in Nonaqueous Media*, Electrophoresis, 29, 3229-3238, 2008.

Botterweck, A.A.M.; Verhagen, H.; Goldbohm, R.A.; Kleinjans, J.; van der Brandt, P.A.: *Intake of Butylated Hydroxyanisole and Butylated Hydroxytoluene and Stomach Cancer Risk: Results from Analyses in the Netherlands Cohort Study*, Food and Chemical Toxicology, 38, 599-605, 2000.

Brausch, J.M.; Rand, G.M.: *A Review of Personal Care Products in the Aquatic Environment: Environmental Concentrations and Toxicity*, Chemosphere, 82, 1518-1532, 2011.

Bruls, W.A.; Slaper, H.; van der Leun, J.C.; Berrens, L.: *Transmission of Human Epidermis and Stratum Corneum as a Function of Thickness in the Ultraviolet and Visible Wavelengths*, Photochemistry and Photobiology, 40, 485-494, 1984.

Cabaleiro, N.; de la Calle, I.; Bendicho, C.; Lavilla, B.I.: *An Overview of Sample Preparation for the Determination of Parabens in Cosmetics*, Trends in Analytical Chemistry, 57, 34-46, 2014.

Celeiro, M.; Guerra, E.; Lamas, J.P.; Lores, M.; Garcia-Jares, C.; Llompart, M.: *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, 1-14, 2014.

Chaintreau, A.: *Analytical Methods to Determine Potentially Allergenic Fragrance-Related Substances in Cosmetics*. In Salvador, A.; Chisvert, A.: *Analysis of Cosmetic Products*, Elsevier, The Netherlands, 2007, 257-275.

Chaintreau, A.; Joulain, D.; Marin, C.; Schmidt, C.-O.; Vey, M.: *GC-MS Quantification of Fragrance Compounds Suspected to Cause Skin Reactions*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 6398-6403, 2003.

Cheng, Y.-C.; Wang, C.-C.; Chen, Y.-L.; Wu, S.-M.: *Large Volume Sample Stacking with EOF and Sweeping in CE for Determination of Common Preservatives in Cosmetic Products by Chemometric Experimental Design*, Electrophoresis, 33, 1443-1448, 2012.

Chisvert, A.; López-Nogueroles, M.; Salvador, A.: *Essential Oils: Analytical Methods to Control the Quality of Perfumes*. In Ramawat, K.G.; Mérillon, J.M.: *Natural Products*, Springer, Heidelberg, 2013a, 3287-3310.

Chisvert, A.; Salvador, A.: *UV Filters in Sunscreens and Other Cosmetics. Regulatory Aspects and Analytical Methods*. In Salvador, A.; Chisvert, A.: *Analysis of Cosmetic Products*, Elsevier, The Netherlands, 2007, 83-120.

Chisvert, A.; Tarazona, I.; Salvador, A.: *A Reliable and Environmentally-Friendly Liquid-Chromatographic Method for Multi-Class Determination of Fat-Soluble UV Filters in Cosmetic Products*, *Analytica Chimica Acta*, 790, 61-67, 2013b.

Collier, P.J.; Ramsey, A.J.; Austin, P.; Gilbert, P.: *Growth Inhibitory and Biocidal Activity of Some Isothiazolinone Biocides*, *Journal of Applied Bacteriology*, 69, 569-577, 1990.

Cordero, C.; Bicchi, C.; Joulain, D.; Rubiolo, P.: *Identification, Quantitation and Method Validation for the Analysis of Suspected Allergens in Fragrances by Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography Coupled with Quadrupole Mass Spectrometry and with Flame Ionization Detector*, *Journal of Chromatography A*, 1150, 37-49, 2007.

Darbre, P.D.; Harvey, P.W.: *Paraben Esters: Review of Recent Studies of Endocrine Toxicity, Absorption, Esterase and Human Exposure, and Discussion of Potential Human Health Risks*, *Journal of Applied Toxicology*, 28, 561-578, 2008.

Darbre, P.D.; Harvey, P.W.: *Parabens Can Enable Hallmarks and Characteristics of Cancer in Human Breast Epithelial Cells: A Review of the Literature with Reference to New Exposure Data and Regulatory Status*, *Journal of Applied Toxicology*, 34, 925-938, 2014.

Debonneville, C.; Chaintreau, A.: *Quantitation of Suspected Allergens in Fragrances: Part II. Evaluation of Comprehensive Gas Chromatography-Conventional Mass Spectrometry*, *Journal of Chromatography A*, 1027, 109-115, 2004.

Del Nogal Sánchez, M.; Pérez-Pavón, J.L.; Moreno Cordero, B.: *Determination of Suspected Allergens in Cosmetic Products by Headspace-Programmed Temperature Vaporization-Fast Gas Chromatography-Quadrupole Mass Spectrometry*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397, 2579-2591, 2010.

Deng, Z.; Han, L.; Zhang, J.; Wu, Y.: *Analysis of Benzophenones in Environmental Water Samples after Topical Skin Application Using Dispersive Liquid-Liquid Microextraction and Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography*, Analytical Methods, 3, 2848-2853, 2011.

Devos, C.; Ochiai, N.; Sasamoto, K.; Sandra, P.; David, F.: *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, 207-215, 2012.

DHI Water and Environment: *Study on Enhancing the Endocrine Disrupter Priority List with a Focus on Low Production Volume Chemicals, Revised Report to DG Environment*, ERA/53559, Hershholm, 2007.

Dolzan, M.D.; Spudeit, D.A.; Azevedo, M.S.; Costa, A.C.O.; Leal de Oliveira, M.A.; Micke, G.A.: *A Fast Method for Simultaneous Analysis of Methyl, Ethyl, Propyl and Butylparaben in Cosmetics and Pharmaceutical Formulations Using Capillary Zone Electrophoresis with UV Detection*, Analytical Methods, 5, 6023-6029, 2013.

Ellendt, K.; Hempel, G.; Köbler, H.: *Analysis of Sensitizing Fragrances by Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, SÖFW Journal, 127, 29-34, 2001.

European Parliament; European Council: *Directive 2003/15/EC of the European Parliament and of the Council of 27 February 2003 Amending Council Directive 76/768/EEC on the Approximation of the Laws of the Member States Relating to Cosmetic Products*, Official Journal of the European Union, L66, 26-35, 2003.

European Parliament; European Council: *Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on Cosmetic Products (recast)*, Official Journal of the European Union, L342, 59-209, 2009.

Fourtanier, A.; Moyal, D.; Seite, S.: *UVA Filters in Sun-Protection Products: Regulatory and Biological Aspects*, Photochemical & Photobiological Science, 11, 81-89, 2012.

Furlanetto, S.; Orlandini, S.; Giannini, I.; Pasquini, B.; Pinzauti, S.: *Microemulsion Electrokinetic Chromatography: An Application for the Simultaneous Determination of Suspected Fragrance Allergens in Rinse-Off Products*, Talanta, 83, 72-77, 2010.

Gracia-Lor, E.; Martínez, M.; Sancho, J.V.; Peñuela, G.; Hernández, F.: *Multi-Class Determination of Personal Care Products and Pharmaceuticals in Environmental and Wastewater Samples by Ultra-High Performance Liquid-Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*, *Talanta*, 99, 1011-1023, 2012.

Haunschmidt, M.; Buchberger, W.; Klampfl, C.W.; Hertsens, R.: *Identification and Semi-Quantitative Analysis of Parabens and UV Filters in Cosmetic Products by Direct-Analysis-in-Real-Time Mass Spectrometry and Gas Chromatography with Mass Spectrometry*, *Analytical Methods*, 3, 99-104, 2011.

Hauri, U.; Tolf, B.L.; Schlegel, U; Hohl, C.: *Determination of Photodegradation of UV Filters in Sunscreens by HPLC/DAD and HPLC/MS*, *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 95, 147-161, 2004.

International Fragrance Association (IFRA): *Analytical Procedure, GC/MS Quantification of Potential Fragrance Allergens in Fragrance Compounds*, International Fragrance Association, version 3, 1-12, 2007.

Isaksson, M.; Gruvberger, B.; Bruze, M.: *Occupational Contact Allergy and Dermatitis from Methylisothiazolinone after Contact with Wallcovering Glue and after a Chemical Burn from a Biocide*, *Dermatitis*, 15, 201-205, 2004.

Ito, N.; Fukushima, S.; Tsuda, H.: *Carcinogenicity and Modification of the Carcinogenic Response by BHA, BHT and Other Antioxidants*, *Critical Reviews in Toxicology*, 15, 109-150, 1985.

Jensen, C.D.; Johansen, J.D.; Menné, T.; Andersen, K.E.: *Methyldibromo Glutaronitrile Contact Allergy: Effect of Single Versus Repeated Daily Exposure*, *Contact Dermatitis*, 52, 88-92, 2005.

Jeong, S.-H.; Kim, B.-Y.; Kang, H.-G.; Ku, H.-O.; Cho, J.-H.: *Effects of Butylated Hydroxyanisole on the Development and Functions of Reproductive System in Rats*, *Toxicology*, 208, 49-62, 2005.

Khani, R.; Ghasemi, J.B.; Shemirani, F.: *Simultaneous Multicomponent Spectrophotometric Monitoring of Methyl and Propyl Parabens Using Multivariate Statistical Methods after Their Preconcentration by Robust Ionic Liquid-Based Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 122, 295-303, 2014.

Kim, K.; Mueller, J.; Park, Y.-B.; Jung, H.-R.; Kang, S.-H.; Yoon, M.-H.; Lee, J.-B.: *Simultaneous Determination of Nine UV Filters and Four Preservatives in Suncare*

Products by High-Performance Liquid Chromatography, Journal of Chromatographic Science, 49, 554-559, 2011.

Klampfl, C.W.; Leitner, T.: *Quantitative Determination of UV Filters in Sunscreen Lotions Using Microemulsion Electrokinetic Chromatography*, Journal of Separation Science, 26, 1259-1262, 2003.

Klaschka, U.: *The Hazard Communication of Fragrance Allergens Must Be Improved*, Integrated Environmental Assessment and Management, 9, 358-262, 2013.

Kryger, R.A.: *Regulatory Issues and Flavors Analysis*. In Goodner, K.; Rouseff, R.: *Practical Analysis of Flavor and Fragrance Materials*, Wiley, West Sussex, 2011, 201-222.

Lanigan, R.S.; Yamarik, T.A.: *Final Report on the Safety Assessment of BHT(1)*, International Journal of Toxicology, 21, 19-94, 2002.

LECO Separation Science: *Quantitative Analysis of Allergens in Perfumes Using Comprehensive Two-Dimensional GC and Time-of-Flight Mass Spectrometry*, LECO Application Note No. 203-821-237, 2004.

Lee, H.-R.; Hwang, K.-A.; Nam, K.-H.; Kim, H.-C.; Choi, K.-C.: *Progression of Breast Cancer Cells Was Enhanced by Endocrine-Disrupting Chemicals, Triclosan and Octylphenol, Via an Estrogen Receptor-Dependent Signaling Pathway in Cellular and Mouse Xenograft Models*, Chemical Research in Toxicology, 27, 834-842, 2014.

Leijs, H.; Broekhans, J.; van Pelt, L.; Mussinan, C.: *Quantitative Analysis of the 26 Allergens for Cosmetic Labeling in Fragrance Raw Materials and Perfume Oils*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 5487-5491, 2005.

Liu, Z.; Phillips, J.B.: *Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography Using an On-Column Thermal Modulator Interference*, Journal of Chromatographic Science, 29, 227-231, 1991.

Liu, T.; Wu, D.: *Simultaneous Determination of Some Ultraviolet-Absorbing Chemicals in Sunscreen Cosmetics Using a High-Performance Liquid Chromatography Method*, International Journal of Cosmetic Science, 33, 408-415, 2011.

Lopez-Gazpio, J.; Garcia-Arrona, R.; Millán, E.: *Application of Response Function Methodology for the Simultaneous Determination of Potential Fragrance Allergens and Preservatives in Personal Care Products Using Micellar Electrokinetic Chromatography*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 406, 819-829, 2014.

Lv, Q.; Zhang, Q.; Li, W.; Li, H.; Li, P.; Ma, Q.; Meng, X.; Qi, M.; Bai, H.: *Determination of 48 Fragrance Allergens in Toys Using GC with Ion Trap MS/MS*, Journal of Separation Science, 36, 3534-3549, 2013.

Magnano, M.; Silvani, S.; Vincenzi, C.; Nino, M.; Tosti, A.: *Contact Allergens and Irritants in Household Washing and Cleaning Products*, Contact Dermatitis, 61, 337-341, 2009.

Maijón, I.; Fontanals, N.; Borrull, F.; Neusüss, C.; Calull, M.; Aguilar, C.: *Determination of UV Filters in River Water Samples by In-Line SPE-CE-MS*, Electrophoresis, 34, 374-382, 2013.

Masuck, I.; Hutzler, C.; Luch, A.: *Estimation of Dermal and Oral Exposure of Children to Scented Toys: Analysis of the Migration of Fragrance Allergens by Dynamic Headspace GC-MS*, Journal of Separation Science, 34, 2686-2696, 2011.

Matyska, M.T.; Pesek, J.J.; Yang, L.: *Screening Method for Determining the Presence of N-Nitrosodiethanolamine in Cosmetics by Open-Tubular Capillary Electrochromatography*, Journal of Chromatography A, 887, 497-503, 2000.

Mondello, L.; Sciarrone, D.; Casilli, A.; Tranchida, P.Q.; Dugo, P.; Dugo, G.: *Fast Gas Chromatography-Full Scan Quadrupole Mass Spectrometry for the Determination of Allergens in Fragrances*, Journal of Separation Science, 30, 1905-1911, 2007.

Mouret, S.; Leccia, M.T.; Bourrain, J.L.; Douki, T.; Beani, J.C.: *Individual Photosensitivity of Human Skin and UVA-Induced Pyrimidine Dimers in DNA*, Journal of Investigative Dermatology, 131, 1539-1546, 2011.

Polati, S.; Gosetti, F.; Gennaro, M.C.: *Preservatives in Cosmetics. Regulatory Aspects and Analytical Methods*. In Salvador, A.; Chisvert, A.: *Analysis of Cosmetic Products*, Elsevier, The Netherlands, 2007, 211-241.

Prakash, B.; Singh, P.; Yadav, S.; Singh, S.C.; Dubey, N.K.: *Safety Profile Assessment and Efficacy of Chemically Characterized Cinnamomum glaucescens Essential Oil Against Storage Fungi, Insect, Aflatoxin Secretion and as Antioxidant*, Food and Chemical Toxicology, 53, 160-167, 2013.

Rastogi, S.C.: *Analysis of Fragrances in Cosmetics by Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, Journal of High Resolution Chromatography, 18, 653-658, 1995.

Rastogi, S.C.: *Survey of Chemical Compounds in Consumer Products. Content of Selected Fragrance Materials in Cleaning Products and Other Consumer Products*, Survey No. 8 of the National Environmental Research Institute, 1-29, 2002.

Rumchev, K.; Spickett, J.; Bulsara, M.; Phillips, M.; Stick, S.: *Association of Domestic Exposure to Volatile Organic Compounds with Asthma in Young Children*, Thorax, 59, 746-751, 2004.

Salvador, A.; Chisvert, A.: *An Environmentally Friendly ("Green") Reversed-Phase Liquid Chromatography Method for UV Filters Determination in Cosmetics*, Analytica Chimica Acta, 537, 15-24, 2005.

Sánchez-Brunete, C.; Miguel, B.; Albero, B.; Tadeo, J.L.: *Analysis of Salicylate and Benzophenone-Type UV Filters in Soils and Sediments by Simultaneous Extraction Cleanup and Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, Journal of Chromatography A, 1218, 4291-4298, 2011.

Sanchez-Prado, L.; Alvarez-Rivera, G.; Lamas, J.P.; Llupart, M.; Lores, M.; Garcia-Jares, C.: *Content of Suspected Allergens and Preservatives in Marketed Baby and Child Care Products*, Analytical Methods, 5, 416-427, 2013.

Sanchez-Prado, L.; Llupart, M.; Lamas, J.P.; Garcia-Jares, C.; Lores, M.: *Multicomponent Analytical Methodology to Control Phthalates, Synthetic Musks, Fragrance Allergens and Preservatives in Perfumes*, Talanta, 85, 370-379, 2011.

Schlumpf, M.; Kypke, K.; Wittassek, M.; Angerer, J.; Mascher, H.; Mascher, D.; Vökt, C.; Birchler, M.; Lichtensteiger, W.: *Exposure Patterns of UV Filters, Fragrances, Parabens, Phthalates, Organochlor Pesticides, PBDEs, and PCBs in Human Milk: Correlation of UV Filters with Use of Cosmetics*, Chemosphere, 81, 1171-1183, 2010.

Scientific Committee on Consumer Products (SCCP): *Opinion on Triclosan*, SCCP/1192/08, 2008.

Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS): *Opinion on the Mixture of 5-Chloro-2-methylisothiazolin-3(2H)-one and 2-Methylisothiazolin-3(2H)-one*, SCCS/1238/09, 2009.

Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS): *Opinion on Parabens*, SCCS/1348/10, 2010.

Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS): *Opinion on Triclosan*, SCCS/1459/11, 2011.

Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS): *Opinion on Fragrance Allergens in Cosmetic Products*, SCCS/1459/11, 2012.

Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS): *Opinion on 2-Methylisothiazolinone (P94), Submission II (Sensitisation Only)*, SCCS/1521/13, 2013.

Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS): *Opinion on Parabens*, SCCS/1514/103, 2013.

Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products intended for Consumers (SCCNFP): *Fragrance Allergy in Consumers. A Review of the Problem*, SCCNFP/0017/98, 1999.

Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products intended for Consumers (SCCNFP): *Opinion Concerning the Determination of Certain Formaldehyde Releasers in Cosmetic Products*, SCCNFP/586/02, 2002a.

Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products intended for Consumers (SCCNFP): *Opinion Concerning a Clarification on the Formaldehyde and para-Formaldehyde Entry in Directive 76/768/EEC on Cosmetic Products*, SCCNFP/587/02, 2002b.

Sgorbini, B.; Ruosi, M.R.; Cordero, C.; Liberto, E.; Rubiolo, P.; Bicchi, C.: *Quantitative Determination of Some Volatile Suspected Allergens in Cosmetic Creams Spread by Direct Contact Sorptive Tape Extraction-Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, Journal of Chromatography A, 1217, 2599-2605, 2010.

Shaw, J.; deCatanzaro, D.: *Estrogenicity of Parabens Revisited: Impact of Parabens on Early Pregnancy and an Uterotrophic Assay in Mice*, Reproductive Toxicology, 28, 26-31, 2009.

Shellie, R.; Marriott, P.; Chaintreau, A.: *Quantitation of Suspected Allergens in Fragrances, Part I. Evaluation of Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography for Quality Control*, Flavour and Fragrance Journal, 19, 91-98, 2004.

Singer, H.; Müller, S.; Tixier, C.; Pillonel, L.: *Triclosan: Occurrence and Fate of a Widely Used Biocide in the Aquatic Environment: Field Measurements in Wastewater Treatment Plants, Surface Waters, and Lake Sediments*, Environmental Science & Technology, 36, 4998-5004, 2002.

Tsiallou, T.P.; Sakkas, V.A.; Albanis, T.A.: *Development and Application of Chemometric-Assisted Dispersive Liquid-Liquid Microextraction for the Determination of Suspected Fragrance Allergens in Water Samples*, Journal of Separation Science, 35, 1659-1666, 2012.

Vela-Soria, F.; Ballesteros, O.; Zafra-Gómez, A.; Ballesteros, L.; Navalón, A.: *UHPLC-MS/MS Method for the Determination of Bisphenol A and its Chlorinated Derivatives, Bisphenol S, Parabens, and Benzophenones in Human Urine Samples*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 406, 3773-3785, 2014.

Villa, C.; Gambaro, R.; Mariani, E.; Dorato, S.: *High-Performance Liquid Chromatographic Method for the Simultaneous Determination of 24 Fragrance Allergens to Study Scented Products*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 44, 755-762, 2007.

Vinayak, S.A.; Jadhav, J.P.; Vishwas, A.B.: *At the Cross Roads of Environmental Pollutants and Phytoremediation: A Promising Bio Remedial Approach*, Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 23, 125-140, 2014.

Vosough, M.; Rahimdoost Mojdehi, N.; Salemi, A.: *Chemometrics Assisted Dispersive Liquid-Liquid Microextraction for Quantification of Seven UV Filters in Urine Samples by HPLC-DAD*, Journal of Separation Science, 35, 3575-3585, 2012.

Wang, L.-H.: *Fragrances: From Essential Oils to the Human Body and Atmospheric Aerosols*, Analytical Methods, 5, 316-322, 2013.

Williams, G.M.; Iatropoulos, M.J.: *Inhibition of the Hepatocarcinogenicity of Aflatoxin B in Rats by Low Levels of the Phenolic Antioxidants Butylated Hydroxyanisole and Butylated Hydroxytoluene*, Cancer Letters, 104, 49-53, 1996.

Xue, Y.; Chen, N.; Luo, C.; Wang, X.; Sun, C.: *Simultaneous Determination of Seven Preservatives in Cosmetics by Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Coupled with High Performance Capillary Electrophoresis*, Analytical Methods, 5, 2391-2397, 2013.

Yang, T.-J.; Tsai, F.-J.; Chen, C.-Y.; Yang, T.C.-C.; Lee, M.-R.: *Determination of Additives in Cosmetics by Supercritical Fluid Extraction On-Line Headspace Solid-Phase Microextraction Combined with Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, *Analytica Chimica Acta*, 668, 188-194, 2010.

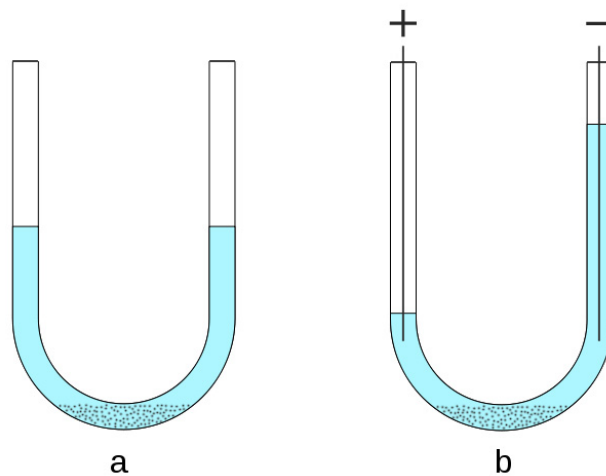
— 4 —

Elektroforesi kapilarra

4.1. Elektromigrazio-tekniken bilakaera

Aurreko kapituluetan aipatu den bezala, elektroforesi kapilarra eta, orokorrean elektromigrazio-teknika guztiak, geroz eta gehiago erabiltzen dira hainbat motako analitoak kuantifikatzeko. Elektroforesi kapilarrari dagozkion xehetasun guztiak literaturan aurki ditzake irakurleak (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013). Kapitulu hau liburu horren laburpen egokitua da, memoria honen helburuekin bat etor dadin.

Elektroforesi-teknikaren lehen pausoarekin topo egiteko, XIX. mendearen hasieraraino egin behar da atzera (Righetti, 2009). 1807an, Ferdinand Friedrich Reuss (1778-1852) Moskuko Unibertsitateko irakasleak deskribatu zuen eremu elektriko baten eraginez kuartzozko partikulekin kontaktuan dagoen uraren garraioa. Esperimentua gauzatzeko, U formako hodi bat erabili zuen Reussek (6,35 mm-ko diametroa eta 20 cm-ko luzera zuen), eta, hondoan, platinozko bi harizpi —elektrodo moduan— kokatu zituen (4.1. Irudia).



4.1. Irudia. Reussen esperimentuaren eskema, elektroosmosi fenomenoaz azaltzen duena. Hasieran, ura maila berbera iristen da hodiaren bi muturretan (a); baina, korrontea aplikatzen denean, ur-maila aldatzen dela ikusten da (b). Irudia: J. Lopez-Gazpio (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013).

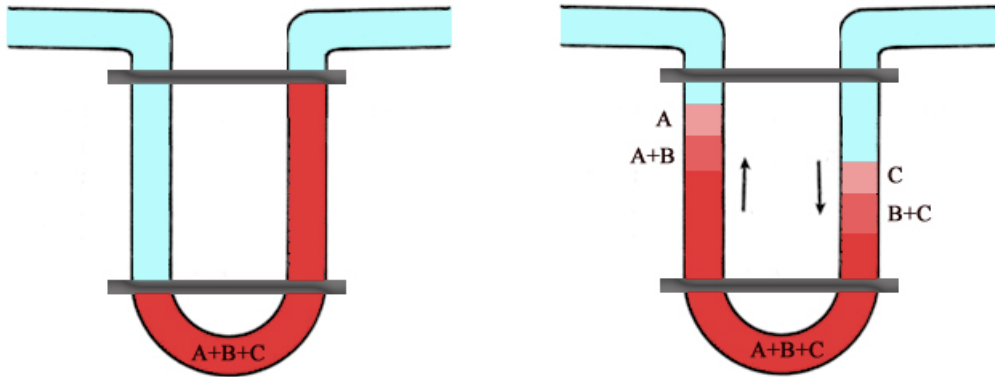
Aipatutako U formako hodiaren hondoan xehatutako kuartzoa ipini eta hodia urez bete zuen. Platinozko harizpietan pila voltaikoaren korrontea aplikatzean, Reussen hitzetan, hau gertatzen zen: “Poloak konektatu eta segundo gutxi batzuetara, [...] urak polo negatiboaren aldean jarritako kapilarrean gora egiten du, eta, 15–20 minutu pasatu ondoren, hasierako maila baino 2 cm inguru gorago igotzen da. Aldi berean, polo positiboan dagoen uraren maila neurri berean beheratzen da; eta, korrontea kendu orduko, uraren maila hasierako egoerara itzultzen da”. Deskribatutako uraren fluxu hori elektroforesi kapilarrean hain garrantzitsua den elektroosmosi fenomeno da.

Bigarren esperimentuan, korronte elektrikoak buztin partikula eseki batzuetan zer-nolako eragina zuen behatu zuen Reussek. Kasu horretan, bi hodi buztin zati batean sartu zituen, eta hondar-geruza fin bat jarri zuen hodiaren barruan, buztinarekin kontaktuan. Hodia maila jakin bateraino urez bete ondoren, Reussek korronte elektriko aplikatu zuen, eta hodi bakoitza elektrodo batekin konektatu. 30 minutu inguru igaro ondoren, negatiboki kargatutako buztin partikula batzuek hondar-geruza zeharkatu zuten elektrodo positiboaren aldean, eta, pixkanaka, hoditik gora igotzen hasi ziren, korrontearen eraginez. Esperimendu harekin, Reuss elektroforesi fenomeno ikusten ari zen, hots, partikula kargadunen mugimendua, korronte elektrikoaren ondorioz gertatua. Reussek bi urte geroago plazaratu zituen bere ikerketen ondorioak (Reuss, 1809); elektroosmosiari eta elektroforesiari buruzko lehen artikulutzat har daitekeen lan batean, hain zuzen ere (Horwitz, 1939; Righetti, 2009).

Hurrengo urteetan ere beste hainbat saiakuntza egin ziren (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013), baina, XIX. mendean gertatutako aurkikuntza gehienak bitxikeria zientifiko mailan zeuden, eta ikerketa fisiko-kimiko sakona eskatzen zuten. 1930eko hamarkadan, Arne Tiselius biokimikari suediarrek eman zuen elektroforesi teknika analitiko eraginkor bilakatzeko bidearen lehen pausoa. Hainbat testutan, Tiseliusen aurkikuntza da elektroforesiaren jatorria azaltzeko abiapuntua. Tiseliusen fronte mugikorren metodoa (MBE, *Moving Boundary Electrophoresis*) erabili zuen eta Kimikako Nobel saria jaso zuen 1948an, elektroforesiaren garapenean egindako ikerketengatik eta serumean dauden proteina konplexuak aztertzeagatik (Nobel Foundation, 2013) (4.2. Irudia).

Zonako elektroforesi (ZE, *Zone Electrophoresis*) 1939an deskribatu zen lehen aldiz (Klobusitzky eta König, 1939). Garai hartan, biomolekulak banatzeko esperimentuak ingurune likidoetan egiten ziren —MBE aplikatuz—, baina aipatutako autoreek euskarri solido baten gainean banatu zituzten proteinak. Euskarri solido hori papera zen; papera erabiliz, suge baten pozoian dauden pigmentu horiak banatzea lortu zuten. Paperetan egindako elektroforesiak arrakasta handia izan zuen 1940ko eta 1950eko hamarkadetan, biomolekula asko

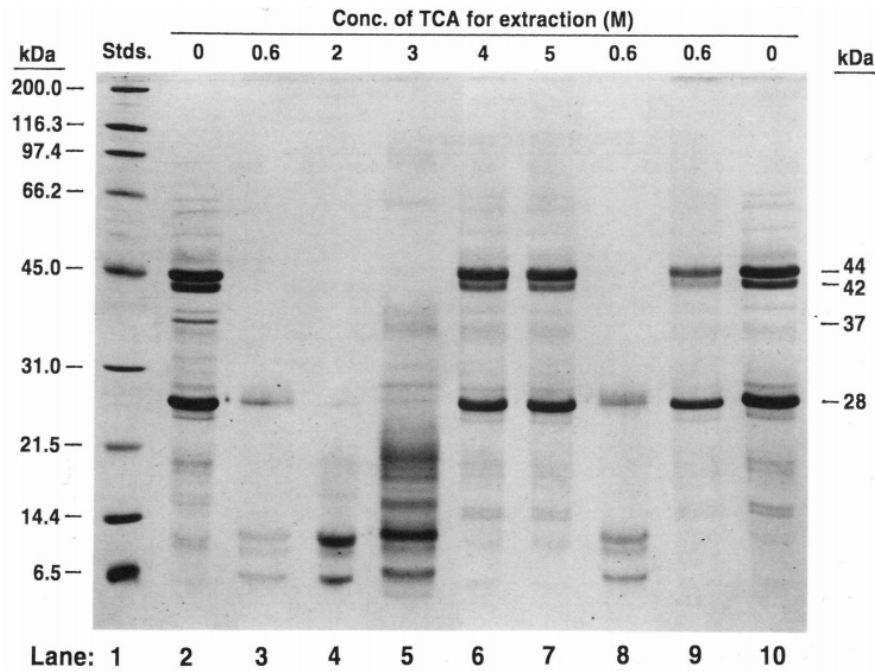
eta asko banatzeko aukera ekarri baitzuen: nukleotidoak, entzimak eta aminoazidoak, besteak beste (Righetti, 2005).



4.2. Irudia. Tiseliusen tresnaren eta MBE teknikaren deskribapena: hasieran, lagina ekipoak duen U formako hodian sartzen da, eta disoluzio indargetzaile batek betetzen du sistema (ezkerrean). Hodiaren mutur bakoitza elektrodo bati konektatuta dago, eta, haiei esker eremu elektrikoa aplikatzen denean, nahastean dauden proteinak banatu egiten dira, eta hainbat fronte osatzen dituzte (eskuinean). Irudia: J. Lopez-Gazpio (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013).

Gordonek eta haren lankideek (Gordon *et al.*, 1950), lehen aldiz, agarrezko gel batean egin zuten banaketa elektroforetikoa; biogelen erabileraren lehen urratsa izan zen hura. Denborarekin, gel mota gehiago aztertu ziren, eta teknika hobeak erabiltzen hasi ziren. Geletan egindako elektroforesia izan zen, paperetan egindakoarekin batera, garaiko elektroforesi-teknika erabiliena. Pixkanaka, bigarrenaren erabilera murriztuz joan zen, eta gelek irabazi zuten borroka. Gaur egun ere, asko erabiltzen da geletan egindako elektroforesia, batez ere biologian eta biokimikan (4.3. Irudia).

Bestalde, Joule efektuaren ondorioz sortutako beroa errazago xahutzeko, sistema elektroforetikoa azalera/bolumena erlazioa handitu behar da. Egitura zilindriko luzeen kasuan —hodiak izan edo kapilarrak izan—, eta, bi muturren azalera arbuiagarritzat joz, azalera totala $A = 2\pi RL$ adierazpenak ematen du, non R zilindroaren diametroa den, eta L , zilindroaren luzera. Bolumena, berriz, $V = \pi R^2 L$ adierazpenaren bidez lortzen da. Hortaz, A/V erlazioa $= (2\pi RL)/(\pi R^2 L) = 2/R$ da. Alegia, R zenbat eta txikiagoa izan, A/V erlazioa orduan eta handiagoa da, eta Joule efektuz sortutako beroa xahutzeko gaitasuna ere handiagoa izango da. Jakina, horrek konpromiso batera iristea eskatzen du; izan ere, zilindroaren erradioa txikiagia bada ez da egongo sentikortasun nahikoa duen detektagailurik.

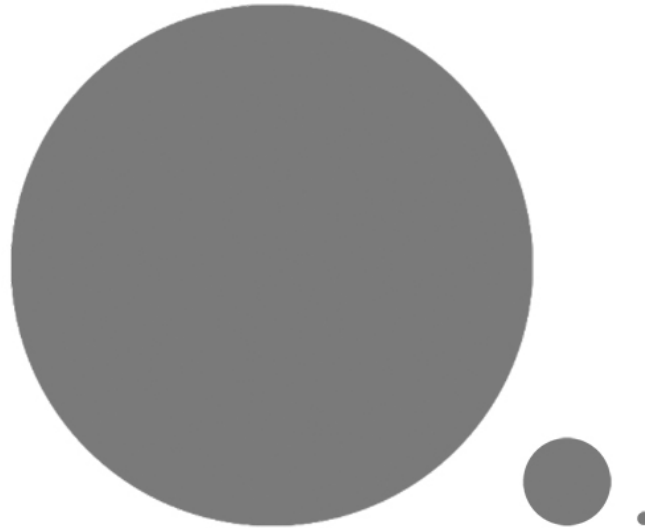


4.3. Irudia. SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel*) teknikaren bidez banatutako arbendol-irinaren proteinak. Erreferentziako kanala ikusten da (*Lane 1*), proteinen tamaina identifikatzeko balio duena. Beste kanaletan, zenbait erauzketa-teknika erabiliz lortutako estraktuak analizatu dira. Banaketa-elektroforetikoen ondoren, estraktu horietan dauden proteinei dagozkien zonak agertu dira. Irudian, 44, 42, 37 eta 28 kDa-eko proteinak identifikatu dira. Irudia: Walter J. Wolf, American Association of Cereal Chemists Inc., jabeago publikoan (Wolf, 1995).

1967an, Stellan Hjertének 3 mm inguruko barne-diametroko hodi zuzen bat erabili zuen eremu elektriko handiagoak aplikatu ahal izateko (Hjertén, 1967). Nekez esan daiteke 3 mm-ko diametroa duen hodi bat benetan *kapilarra* denik, baina 1967ko ultramore-detekttagailuek ezin izango zuten seinale sentikorrik eman diametro txikiagoko kapilar batean. Ikerketa horretan, zonako elektroforesiaren oinarri teorikoak finkatu zituen, eta elektroforesi kapilarra teknika alternatibo interesgarri bihurtuko zela aurrean zuen.

Dena den, elektroforesiaren inguruko lehen ikerketa hori eta beste batzuk (Hjertén, 1973; Virtanen, 1974; Mikkers *et al.*, 1979) ez ziren gai izan banaketa elektroforetikoen eraginkortasun aparta frogatzeko; izan ere, garaiko detekttagailuen sentikortasun eskasa zela eta, lagin bolumen handiak injektatu behar ziren. Lagin kantitate handi horien ondorioz, hodiaren gainkarga gertatzen zen, eta konposatu guztiak ez ziren behar bezala banatzen. Dena den, elektroforesi kapilarren inguruko ikerketa aitzindari horiek elektroforesi kapilarra teknika analitiko bideragarria zela frogatu zuten, eta, horren ildotik, laster iritsi zen benetako iraultza.

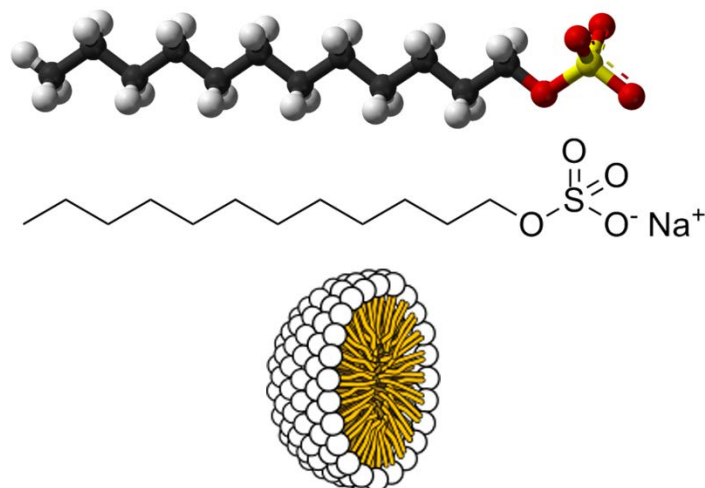
Zonako elektroforesi kapilarra (CZE) garatu izanaren merezimendua Jorgensoni eta Lukacsi aitortu behar zaie. 1981ean, banaketa elektroforetiko arrakastatsua lortu zuten, lehen aldiz, 100 μm baino meheagoak ziren kapilarretan —75 μm -koak, zehazki— (Jorgenson eta Lukacs, 1981a; Jorgenson eta Lukacs, 1981b). 80-100 cm luze ziren pyrex-beirazko kapilarrak erabiliz, hainbat aminoazido banatzea lortu zuten. Kapilarraren barne-diametroaren bilakaera argiro ikusten da 4.4. irudian egindako konparazioan.



4.4. Irudia. Elektroforesian erabilitako kapilarraren barne-diametroaren bilakaera (eskalan irudikatuak): Hjerténeen kapilarra (3 mm, ezkerrean), Virtanenen kapilarra (500 μm , erdian), eta Jorgensonen eta Lukacsen kapilarra (75 μm , eskuinean). Irudia: J. Lopez-Gazpio (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013).

CZEren kasuan, molekulak karga/masa erlazioaren arabera banatzen direnez, teknika hori ezin da erabili konposatu neutroak banatzeko, haien karga nulua baita. Baina, zorionez, arazo horri laster eman zitzaion konponbide arrakastatsua. Jorgensonen eta Lukacsen 1981eko artikulua argitaratu baino hilabete batzuk lehenago, T. Nakagawa-k Japoniako Kimika Elkarteari bidalitako artikulua batean proposatu zuen posible izango zela elektroforesian mizelak erabiliz konposatu neutroak banatzea (Nakagawa, 1981).

Bi artikulua horietan agertzen ziren ideiak elkartzuz eta osatuz, Shigeru Terabe-k elektroforesi kapilarraren historiako aurrerapausorik erabakigarrienetako bat eman zuen; hain zuzen ere, 1984ean eta 1985ean argitaratutako bi ikerlanetan, elektroforesi kapilarra erabiliz konposatu neutroak banatzea lortu zuen (Terabe *et al.*, 1984; Terabe *et al.*, 1985), SDS mizelei esker (4.5. Irudia). Metodo berri hori hain da garrantzitsua, izen berezia baitu: kromatografia elektrozinetiko mizelarra (MEKC)



4.5. Irudia. Terabek erabilitako surfaktante mizelarra. Dodezilsulfato anioiaren 3D egitura, SDSren formula kimikoa eta erditik ebakita ikusten den mizela baten egitura. SDSren kasuan, 64 molekulak osatzen dute mizela bakoitza.

1990eko hamarkadaren hasieran, elektroforesi kapilarra izugarri zabaldu zen; bereziki, lehen ekipo komertzialak izandako arrakastaren ondoren. Lehen ekipoa 1988an komertzializatu zen; Microphoretic Systems-en Microphoretic 1.000, hain zuzen ere. Hurrengo urtean, Applied Biosystems-ek, Beckman Instruments-ek —gaur egun, Beckman Coulter— eta Bio-Rad-ek ere beren ekipoak komertzializatu zituzten. Bereziki garrantzitsua izan zen Beckmanek garatutako *P/ACE™ 2000* ekipoa, elektroforesi kapilarreko lehen ekipo guztiz automatizatu izan baitzen (Weinberger, 1993; Sekhon, 2011). Orduz gero, kromatografoak egiten dituzten fabrikatzaile ia guztiek badituzte elektroforesi kapilar ekipoak katalogoan eskuragarri. Azken hamarkadan, elektroforesi kapilarra banaketa-teknika eraginkor bilakatu da, luze eta zabal erabiltzen baita aplikazio askotan: ikerkuntzan eta garapenean, farmakologian, elikagaien analisisian, kutsatzaileen kuantifikazioan, kalitate-kontrolan, proteomikan, metabolomikan, genomikan, eta abar (Ahuja, 2008; García-Campana *et al.*, 2009; Leopold *et al.*, 2010; Sekhon, 2011; Zhong *et al.*, 2011). Elektroforesia bereziki interesgarria dela ikusi da peptidoak (Simó *et al.*, 2013), proteinak (Haselberg *et al.*, 2011), karbohidratoak (Breadmore, 2013), konposatu kiralak (Caslavská eta Thormann, 2011), ioi ez-organikoak eta antzeko molekulak banatzeko (Foret, 2009).

4.2. Elektroforesi fenomeno

Aurreko azpiatalean aipatu den bezala, elektroforesi kapilarra elektromigrazioan oinarritutako banaketa-metodo bat da. Oro har, eremu elektrikoaren eraginez

disoluzio edo nahaste jakin batean dauden molekulak banatzeko erabiltzen da. Gaur egun, elektroforesi kapilar bidez banaketa analitikoak lortzeko, 25-150 μm -ko diametroko kapilarrak eta 30 kV-rainoko potentzial-diferentziak erabili ohi dira.

Bestalde, jada aipatu da aurreko kapituluetan elektroforesi kapilarrak badituela hainbat aldaera, eta hainbat testuliburutan nahasgarria suertatzen da puntu hori. IUPACek egindako gomendioen arabera (Riekkola *et al.*, 2004), *elektroforesi kapilarra* (CE, *Capillary Electrophoresis*) ez da erabili behar teknika guztien izen orokor gisa. Izan ere, gomendio horien arabera, *elektroforesi kapilarra* eta *zonako elektroforesi kapilarra* (CZE) sinonimotzat hartu behar dira, eta, gainera, bigarrena da hobetsi beharreko forma. Bestalde, elektroforesi mota guztiei buruz ari garenean, *elektromigrazio kapilarra* esan behar da; izan ere, zenbait aldaeratan, elektroforesia ez da banaketa horietan gertatzen den fenomeno bakarra.

Dena den, garrantzitsua da aipatzea arrazoi historikoak direla-eta, elektroforesi kapilar hitza luze eta zabal erabili da teknika guztien izen kolektibo gisa bibliografian eta irakurleak aurki dezakeen bibliografia gehienak irizpide klasikoari eusten dio.

Elektroforesi fenomenoari eutsiz, aipatu behar da positiboki kargatutako partikula bat E (V m^{-1}) eremu elektriko baten eraginpean jartzen denean, polo negatiborantz zuzendutako indar elektriko bat (F_e , N) sortzen dela:

$$F_e = q \cdot E \quad (4.1)$$

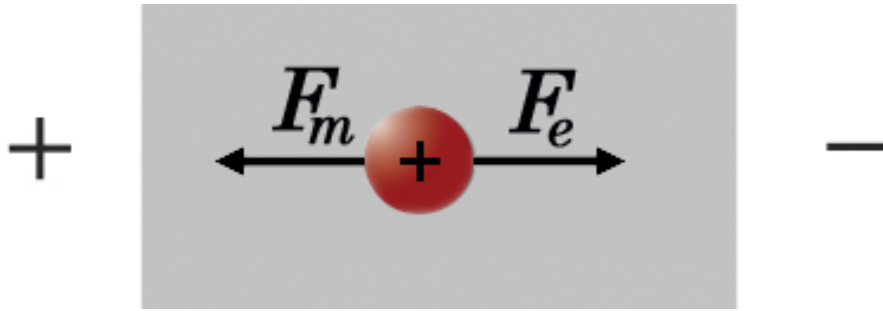
non q partikularen karga elektrikoa den (C). Gainera, partikula fluido batean murgilduta badago, higiduraren aurkakoa den marruskadura-indarra (F_m , N) jasango du. Bestalde, gauza jakina da marruskadura-indarra sortzen dela gorputz solido bat fluido baten barnean higitzen denean higiduraren kontra.

Fluidoaren barneko marruskadura-indar hori (4.2) adierazpenaren bidez lortzen da, non f_t (kg s^{-1}) marruskadura translazionalari dagokion koefizientea den, eta v_e (m s^{-1}) partikularen abiadura elektroforetikoa (Etxebarria, 2003).

$$F_m = f_t \cdot v_e \quad (4.2)$$

Partikula esferikoen kasuan, f_t koefizientea Stokes-en Legearen bidez lor daiteke (4.3). Lege horrek f_t parametroa partikularen erradioarekin (R , m) eta fluidoaren biskositatearekin (η , $\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1}$) erlazionatzen du (4.6. Irudia).

$$f_t = 6\pi\eta R \quad (4.3)$$



4.6. Irudia. Fluido batean murgilduta eta eremu elektriko baten eraginpean dagoen partikula positibo baten gaineko indarrak. Irudia: J. Lopez-Gazpio (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013).

Ikuspuntu praktikotik, partikularen erradioaren ordez itxurazko erradio hidrodinamikoa (R_H , m) erabil daiteke, hots, esferikoak ez diren partikulen kasuan, behatutako abiaduraren araberrako erradio baliokidea. Bestalde, elektromigrazio-teknikei dagokienez, garrantzitsua da konturatzea biskositatea temperaturaren menpe dagoela. Likido gehienek kasuan, temperatura handitzen denean, biskositatea txikitu egiten da.

(4.2) eta (4.3) adierazpenak elkartuz, marruskadura-indarraren adierazpen osoa lortzen da (4.4).

$$F_m = 6\pi\eta Rv_e \quad (4.4)$$

Fluidoek barneko marruskadura-indarra eta indar elektrikoak ikusi ondoren, partikula horren higidura-ekuazioa azter dezakegu. Newtonen Bigarren Legea aplikatuz gero, (4.5) adierazpena lortzen da.

$$m \cdot \left(\frac{dv}{dt} \right) = F_e - F_m = qE - 6\pi\eta Rv_e \quad (4.5)$$

Hortaz, partikularen hasierako abiadura nulua izanik eta indar elektrikoak konstantea dela joz, partikula azeleratu egingo da, eta higitzen hasiko da. Abiadura handitu ahala, marruskadura-indarra ere handitu egingo da, harik eta egoera geldikorrera iristen den arte ($|F_e| = |F_m|$). Une horretan, azelerazioa nulua da, eta abiadura, konstantea —muga-abiadura deritzona, hain zuzen ere—. Praktikan, egoera geldikorra denbora-tarte arbuigarrian lortzen denez, hasieratik (4.6) erlazioa betetzen dela onar daiteke.

$$qE - 6\pi\eta Rv_e = 0 \Rightarrow qE = 6\pi\eta Rv_e \quad (4.6)$$

Adierazpen horretan abiadura-elektroforetikoa bakanduz, abiadurari dagokion ekuazioa lortzen da:

$$v_e = \frac{qE}{6\pi\eta R} = \left(\frac{q}{6\pi\eta R} \right) \cdot E \quad (4.7)$$

Bestalde, mugikortasun elektroforetikoren μ_e ($\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$) definizioa kontuan hartuko da; alegia, abiaduraren eta aplikatutako eremu elektrikoaren arteko proportzionaltasuna (4.8).

$$v_e = \mu_e \cdot E \quad (4.8)$$

Hori horrela izanik, (4.7) adierazpenean parentesi artean dagoen atala mugikortasun elektroforetikoa da.

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta R} \quad (4.9)$$

Azken adierazpen hori oso garrantzitsua da elektroforesian oinarritzen diren tekniketetan. (4.9) ekuazioan ikusten denez, ioien mugikortasun elektroforetikoa q/R erlazioaren arabera da, fluido berean daudenean.

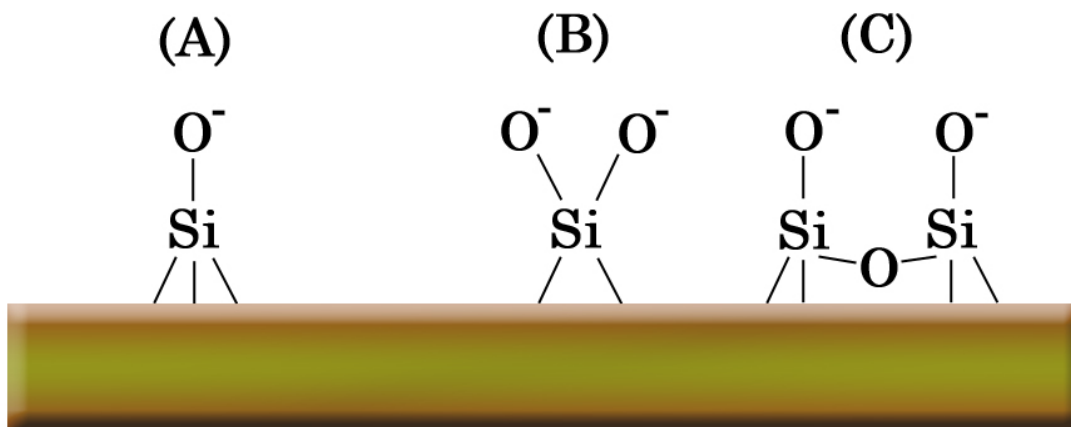
Beste zenbait ondorio garrantzitsu ere aipatu behar dira: 1) molekula neutroen mugikortasun elektroforetikoa nulua da —karga nulua baitute—, eta 2) anioien —ioi negatiboen— mugikortasun elektroforetikoa negatiboa da. Azken hori egia da; izan ere, partikula negatibo batentzat, kalkulu guztia berdina da, baina indarren noranzko aurkakoa. Hortaz, anioiek polo positiborantz migratzeko joera dute.

Badira zenbait efektu elektroforesi fenomenoan eragina dutenak, besteak beste, partikulen tamaina, atzerapen-indarra, erlaxazio-efektua, indar ionikoa, pHa eta disoziazioa. Testu honen helburuetatik kanpo dago efektu horien guztien deskribapena egitea, baina literaturan aurki dezake interesa duen irakurle orok (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013)

4.3. Elektroosmosia

Elektromigrazio-tekniketean erabiltzen diren silize urtuzko kapilarren barneparetetan badira silanol (-SiOH) taldeak. Ingurunearen pH-a basikoa baldin bada, silanol horiek karga negatiboa izaten dute, protoi-transferentziako erreakzio baten ondorioz ionizatu eta $-\text{SiO}^-$ eran geratzen direlako. Jotzen da 4-5 silanol talde nanometro karratuko daudela normalean erabiltzen diren kapilarretan, (Horvath

eta Dolník, 2001), eta frogatu da silanol talde isolatuez gainera silanol talde bezinalak —ondo ondoko atomoetara lotuak— eta geminalak —atomo berari lotuak— ere badaudela (4.7. Irudia) (Dandenau eta Zerenner, 1990).



4.7. Irudia. Kapilarraren gainazaleko silanol talde motak: (A) isolatuak, (B) geminalak eta (C) bezinalak. Irudia: J. Lopez-Gazpio (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013).

Kapilarraren barne-gainazalean dauden silanol talde ionizatuak karga negatiboa ematen diote gainazalari, eta karga horrek kapilarraren barneko elektrolito-disoluzioan dauden ioi positiboak erakartzen ditu. Kontrako kargek geruza elektriko bikoitz mehe bat sortzen dute —1-10 nm-koa, gutxi gorabehera—.

Eremu elektrikoa aplikatzen denean, paretaren inguruan pilatuta dauden katioiek katodorantzko —hau da, elektrodo negatiborantzko— desplazamendua izango dute. Haiekin batera, elektrolito-disoluzio guztia katodorantz mugiaraziko dute. Fenomeno horri elektroosmosia deritzo, eta sortzen duen higidura-fronte uniforme fluxu elektroosmotikoa da (EOF, *ElectroOsmotic Flow*). Lehen azpiatalean esan den bezala, fluxu elektroosmotikoa Reuss-ek behatu zuen lehen aldiz (Reuss, 1809). Fluxu elektroosmotikoa, elektroforesi fenomenoarekin batera, elektromigrazio-tekniketan funtsezkoa den efektu bat da. Gainera, fluxu elektroosmotikoak kapilarrean dauden molekula guztien gain du eragina, hau da, banatu nahi diren ioietan, molekuletan eta banaketa-disoluzioan dauden beste konposatu guztietan.

Idea orokor bat ematearren, EOFak gutxi gorabehera 1 mm s⁻¹-ko abiadura izan ohi du, nahiz eta faktore askoren menpe dagoen abiadura hori azkarragoa edo motelagoa izatea. Bestalde, silanol taldeak pH basikoan ionizatzen direla esan dugu, baina silanolaren ionizazio konstantearen (K_a) araberakoa izango da, noski. Dena den, silanol taldeen ionizazio konstantea determinatzea konplexua da, eta, gainera, silanol talde mota bat baino gehiago dagoenez, pK_a -ren balioa tarte bat da, eta ez balio finitua. Balio hori 2-9 artean dago (Sandoval eta Chen, 1996), eta,

ondorioz, fluxu elektroosmotikoak ere antzeko joera du: $\text{pH} < 2$ denean, fluxua ia nulua da, eta, $\text{pH} > 9$ denean, silanol taldeak ionizatuta daudela jo daiteke eta, hortaz, fluxu-abiadura maximoa izango da. Tarteko pHTan lan egiten bada, abiadura balio maximoaren eta minimoaren artean egongo da.

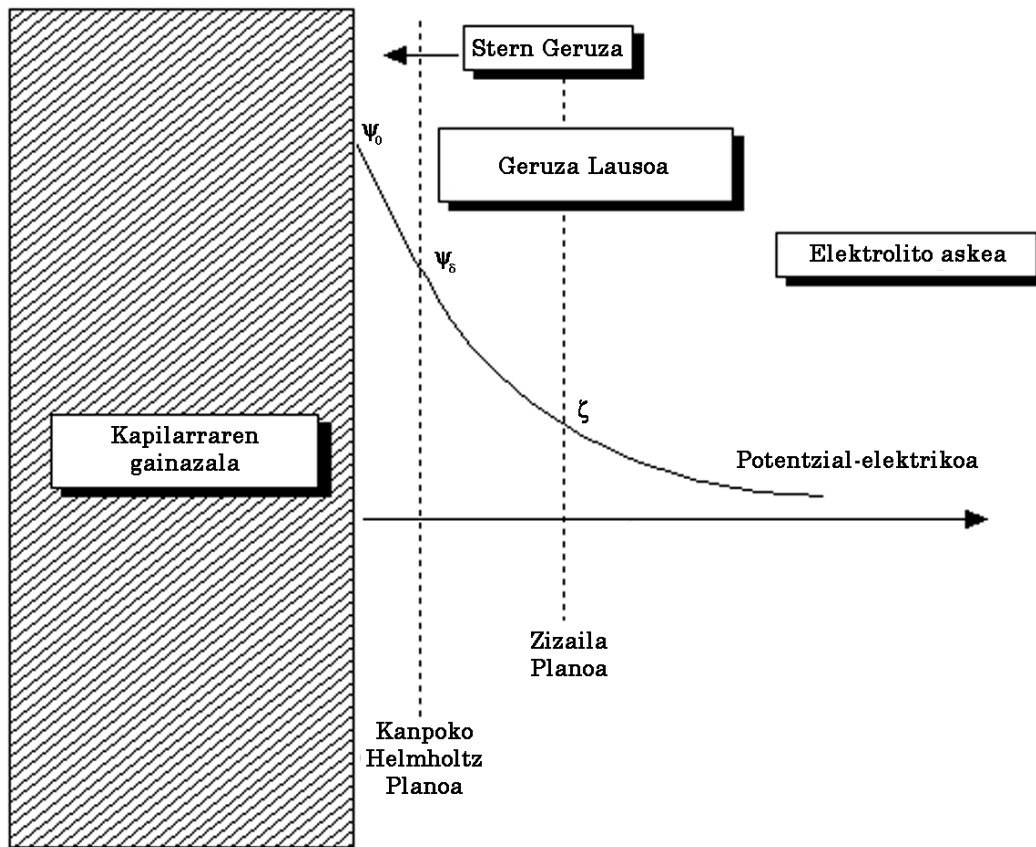
4.3.1. Geruza elektriko bikoitzaren deskribapena

Esan den bezala, negatiboki kargatutako silize-gainazala disoluzio-elektrolitikoan dagoenez, ingurunean dauden katioiak gainazal horretara hurbilduko dira, eta geruza elektriko bikoitz deritzona sortuko da. Geruza bikoitzaren azalpena hainbat ereduri jarraituz eman daiteke; esaterako, Helmholtz Eredua, Stern Eredua, Gouy-Chapman Eredua, eta abar. Eredu horiek ekuazio matematikoen bitartez deskribatzen dute geruza bikoitza, egindako hurbilketen edo sinplifikazioen arabera. Ondoren, geruza elektriko bikoitzaren deskribapena azalduko da, eta, horretarako, Gouy-Chapman-Stern Eredua erabiliko da (Hunter, 1989). Garrantzitsuena honako hau da: negatiboki kargatutako gainazalaren inguruan, hiru zona bereizten dira: 1) Stern geruza, 2) geruza lausoa, eta 3) elektrolito askea (Hunter, 1989; Kirby eta Hasselbrink, 2004).

Stern geruza gainazaletik gertuen dagoen geruza bat da. Geruza horretan, katioi-kontzentrazioa altua izateaz gainera, katioiak gainazalari estuki lotuta daude. Geruza hori higiezina dela jotzen da; alegia, katioiek geruza tinko bat osatzen dute, eta δ (m) ikurraren bidez adierazten da haren zabalera. Gainazalean bertan dagoen potentziala ψ_0 (V) da. Nomenklatura horri jarraituz, Stern geruza amaitzen den planoan dagoen potentzialari ψ_δ (Stern potentziala) deritzo. Katioien lotura oso sendoa da Stern geruza guztian (Hunter 2003).

Stern geruzaren ondoren, geruza lausoa dago, eta, han ere, katioien kontzentrazioa anioiena baino handiagoa da. Geruza lausoaren zabalera $1/\kappa$ da, hau da, Debye luzera. Geruza lausoari esker agertzen da fluxu elektroosmotikoa; izan ere, eremu elektrikoaren eraginpean, geruza lausoaren zati bat kontrako karga duen elektrodorantz higitzen hasten da. Higitzen hasten den geruza lausoko planoari zizaila-planoa (SP, *Shear plane*) deritzo, eta plano horretan dagoen potentzial-elektrikoa zeta potentziala (ζ , V) da. Beraz, zizaila-planotik kanpora dagoen disoluzio guztia higitzen ari da: hori da fluxu elektroosmotikoa, hain zuzen ere.

Geruza lausoaren amaieran, katioien eta anioien kontzentrazioa berdina da eta potentzial-elektrikoa nulua da ($\psi = 0$). Geruza horretan ez da nabaritzen kargatutako silize-gainazalaren eragina, baina geruza lausoaren mugimenduaren eraginez higitzen da. 4.8. Irudian ikus daiteke geruza elektriko bikoitzaren eskema osoa.



4.8. Irudia. Geruza elektriko bikoitzaren irudikapen eskematikoa. Hiru zona nagusiak ikus daitezke: Stern geruza, geruza lausoa eta elektrolito askea. Geruza lausoaren eta elektrolito askearen arteko muga ez da plano baten bidez adierazi, muga hori lausoa baita. Kontuan izan potentzial-elektroikaren balio absolutua agertzen dela grafikoan; izan ere, gainazalaren karga negatiboa denez, potentzial-elektroikoa ere negatiboa da.

Zuzenean, abiadura elektroosmotikoaren ohiko adierazpena ekarriko da (Hunter, 1981; Grossman eta Colburn 1992; Ghosal 2004), baina geruza elektriko bikoitzaren deskribapen matematiko osoa eta (4.10) adierazpenaren lorpena bibliografian aurki dezake irakurleak (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013).

$$v_z(x) \approx v_\infty = v_{EOF} = -\frac{\varepsilon \zeta}{\eta} E_z \quad (4.10)$$

Ekuzio horri Helmholtz-Smoluchowski ekuazioa deritzo, Hermann von Helmholtz-ek (Helmholtz, 1879) eta Marian von Smoluchowski-k (Smoluchowski, 1903) egindako ikerketa aitazindarien omenez. Fluxu elektroosmotikoaren abiaduraren eta eremu elektrikoaren arteko proportzionaltasuna mugikortasuna denez (4.11), hau da,

$$v_{EOF} = \mu_{EOF} \cdot E \quad (4.11)$$

mugikortasun elektroosmotikoa (4.12) adierazpenean agertzen den moduan defini daiteke.

$$\mu_{EOF} = -\frac{\varepsilon\zeta}{\eta} = -\frac{\varepsilon_r \varepsilon_0 \zeta}{\eta} \quad (4.12)$$

Kontuan izan behar da ekuazio hori geruza elektriko bikoitz estuetan bakarrik betetzen dela; gainerako kasuetan, deskribapen konplexuagoak ageri dira bibliografian (Hunter, 1981; Deshiikan eta Papadopoulos, 1998; Ghosal, 2004). Dena den, elektroforesi kapilarrari dagokionez (4.12) adierazpena erabiltzea zuzena da ohiko kasuetan, eta ekuazio hori onartzen da mugikortasun elektroforetikoren definiziotzat IUPACren gomendioetan (Riekkola *et al.*, 2004).

4.3.2. Fluxu elektroosmotikoaren abiadura-profila

Matematikoki frogatu daiteke (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013) kapilarraren gainazaletik edozein distantziatara dagoen fluidoaren abiadura kalkulatzeko adierazpena honako hau dela:

$$v_z(x) = -\frac{\varepsilon\zeta}{\eta} E_z (1 - e^{\kappa x}) \quad (4.13)$$

Bibliografian, honela idatzita ere ager daiteke, mugikortasun elektroosmotikoaren funtzioan:

$$v_z(x) = \mu_{EOF} E_z (1 - e^{\kappa x}) \quad (4.14)$$

(4.13) ekuazioan gainazaleko karga-dentsitateari dagokion ekuazioa ordezkatzuz gero, eta, ψ_0 eta ζ berdinak direla onartuz, (4.15) adierazpena lortzen da (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013).

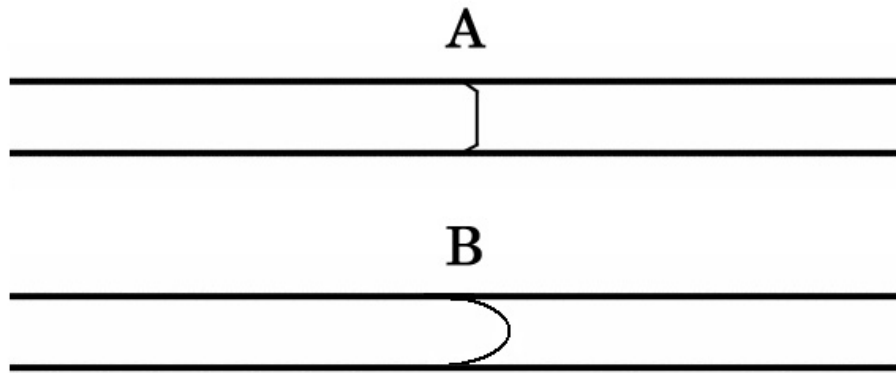
$$v_z(x) = -\frac{\sigma^*}{\kappa\eta} E_z (1 - e^{\kappa x}) \quad (4.15)$$

Elektroforesi kapilarrean erabiltzen diren kapilarren gainazaleko karga-dentsitatea $0,01 \text{ C m}^{-2}$ dela onartuz (Churaev *et al.*, 1981) eta beste aldagaiei ohiko balioak esleituz (Grossman eta Colburn, 1992), abiadura maximoaren %99 lortzen

da kapilarraren gainazaletik 14 nm-ra. Ondorioz, 50 μm -ko diametroa duen kapilarraren kasuan $v_z(x) = v_\infty = v_{EOF}$ da kapilarraren diametroaren %99,95en. Horregatik, elektroforesi kapilarraren kasuan, fluxua laua dela onartzen da, kromatografia likidoan ez bezala (4.9. Irudia). Beste era batera adieraziz, (4.13) eta (4.14) adierazpenen osagai esponentzialak arbuiauz, honako ekuazio hau lortzen da:

$$\mu_{EOF} = -\frac{\varepsilon\zeta}{\eta} = -\frac{\sigma^*}{\kappa\eta} \quad (4.16)$$

Fluxu elektroosmotikoa laua izateak azaltzen du elektromigrazioan oinarritutako teknikan oinarritutako banaketan sakabanatzea baxua izatea, eta elektroforesi kapilarraren abantaila esanguratsuenetako bat da.



4.9. Irudia. A: fluxu elektroosmotikoaren abiadura-profila (fluxu laua), eta B: higidura hidrodinamikoari dagokion profila (fluxu parabolikoa). Irudia: J. Lopez-Gazpio (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013).

4.3.3. Fluxu elektroosmotikoaren kontrola

Fluxu elektroosmotikoaren abiadura kontrolatzea garrantzitsua da elektroforesia erabiliz banaketa analitikoak egin nahi direnean, kontrolik gabeko fluxu elektroosmotikoak nabarmen eragiten baitu banatu nahi diren konposatuen mugikortasunean. Argi dago, elektroosmosi-abiadura kontrolatzeko, (4.16) adierazpenean azaltzen diren parametroak alda daitezkeela; alegia, geruza

elektriko bikoitzaren zabalera, kapilarraren gainazalaren karga-dentsitatea edo fluidoaren biskositatea.

Badira geruza elektriko bikoitzaren zabalera kontrolatzeko bi era. Alde batetik, banaketa-disoluzio elektrolitikoaren ioi-kontzentrazioa —edo indar ionikoa— handitzen bada, geruza bikoitza finagoa izango da. Ioi-kontzentrazioa handitzeko, elektrolito indargetzailearen kontzentrazioa handitu daiteke —normalean, 10-50 mM kontzentrazioak erabiltzen dira, baina 100-500 mM-eraino handitu daiteke— edo beste gatz bat gehi dakioko disoluzioari; esaterako, sodio kloruroa edo beste metalen gatzak (Brechtel *et al.*, 1995; Elhamili *et al.*, 2009). Kontuan izan behar da ingurunearen indar ionikoa handitu ahala Joule efektua nabarmenagoa izango dela eta horrek banaketaren kalitateari negatiboki eragingo diola. Kontzentrazio altuko disoluzio horien kasuan potentzial-diferentzia txikiak aplikatuz edo kapilar motzak erabiliz, korrante elektriko handirik ez sortzea lor daiteke.

Beste alde batetik, fluidoaren permitibitatea txikituz, geruza bikoitz estuagoak lor daitezke. Horretarako, normalean, disolbatzaile organikoak gehitzen zaizkio banaketa-disoluzioari. Disolbatzaile organiko ugari aztertu izan dira, hala nola metanola, 1- edo 2-propanola, azetonitriloa, tetrahidrofuranoa, dimetilsulfoxidoa, dimetilformamida, eta abar (Ghosh eta Dey Dr., 2008; Zhang *et al.*, 2009). Gehigarri organiko horiek gehienez %20ko proportzioan erabili ohi dira. Konposatu organikoen proportzioa handia bada edo banaketa-disoluzioa guztiz organikoa bada, elektroforesi kapilar mota horrek izen berezia hartzen du: elektroforesi kapilar ez-akuosoa (NACE, *NonAqueous Capillary Electrophoresis*).

Kapilarraren gainazaleko karga-dentsitatea aldatzea fluxu elektroosmotikoa kontrolatzeko sistematik erabiliena da. Silanol taldeei esker sortzen den gainazal kargadunaren propietateak aldatzeko, gainazala dinamikoki eralda daiteke elektrolito-disoluzioan dauden gehigarrien bidez, polimero-geruza bati esker gainazala estal daiteke, edo aldaketa kimikoak sor daitezke, besteak beste. Silanol taldeak estaliz, fluxu elektroosmotikoa murriztea, eliminatzea edo haren noranzkoa aldatzea lor daiteke. Beste kasu batzuetan, aztertu nahi diren konposatuen eta kapilarraren gainazalaren arteko interakzioa minimizatzeko blokeatzen da gainazaleko karga. Beste zenbaitetan, ordea, fluxu elektroosmotikoa areagotuko duten teknikak behar izango dira.

Elektroosmosiaren kontrolerako beste zenbait prozedura ere aplika daitezke, eta haien artean oso erabilia da biskositatearen bidezko kontrola. Banaketa-disoluzio elektrolitikoari disolbatzaile organikoak gehituz lor daiteke hori; izan ere, permitibitatearen aldaketaz gainera, disolbatzaile organikoek nabarmenki aldatzen dute disoluzioaren biskositatea.

4.1. Taula. Disolbatzaileen propietateak 25 °C-an (Porras *et al.*, 2003).

Disolbatzailea	Permitibitate erlatiboa	Momentu dipolarra (Debye)	Biskositatea (10 ⁻³ Pa s)
Ura	78,36	1,85	0,89
Metanola	32,66	2,87	0,55
Etanola	24,55	1,66	1,08
1-Propanola	20,45	3,09	1,94
Azetonitriloa	35,94	3,92	0,34
Formamida	109,5	3,37	3,30
<i>N</i> -Metilformamida	182,4	3,86	1,65
<i>N,N</i> -Dimetilformamida	36,71	3,82	0,80

Dena den, zaila da auresatea zer aldaketa sortuko den disolbatzaile organiko bat gehitzean, eta, normalean, esperimentalki aztertu behar izaten da. 4.1. Taulan jaso dira elektroforesian gehien erabiltzen diren disolbatzaileen zenbait propietate. Disolbatzaile organikoak erabiltzeaz gainera, beste gehigarrien bidez —glizerola (Pascali *et al.*, 2009), adibidez— ere alda daiteke ingurunearen biskositatea. Azkenik, fluxu elektroosmotikoan eragin zuzena duten beste zenbait aldagai aipatuko dira, baina, jakina, aldagai horiek efektu esanguratsua izango dute analitoen elektroforesian ere, eta ez bakarrik elektroosmosian.

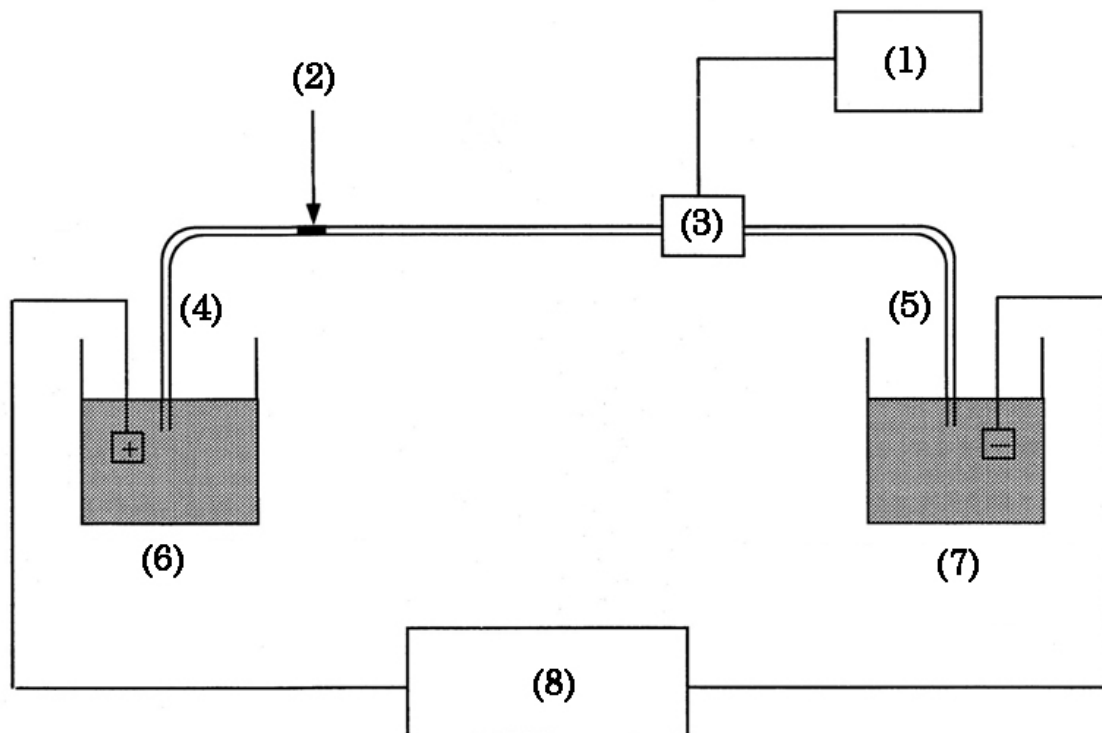
Dagoeneko azaldu da zeta potentzialak funtsezko zeregina duela fluxu elektroosmotikoaren abiaduran eta ingurunearen pH-ak baduela eragina silanol taldeen ionizazioan. pH-ak eta banaketa-disoluzioaren indar ionikoak eragin zuzena izaten dute zeta potentzian eta, ondorioz, fluxu elektroosmotikoan. pH-a egoki finkatzearen garrantzia dela eta, disoluzio erregulatuak —pH-a finko mantentzeko gaitasuna dutenak— erabil daitezke pH-a kontrolatzeko. Bestalde, argi dago kapilarrean aplikatzen den eremu elektrikoak eragin zuzena izango duela fluxu elektroosmotikoaren abiaduran. Aldaketa hori proportzionala izaten da, baina kontuz ibili behar da eremu elektriko altuegiek sor dezaketen Joule efektuarekin.

Temperatura kontrolatzea ere garrantzitsua da; nagusiki, fluidoaren biskositatean duen eragina dela eta —%2-3 alda daiteke °C bakoitzeko—, baina beste aldagai asko ere tenperaturaren menpekoak dira. Normalean, temperatura konstante mantentzen da elektroforesi-ekipoek horretarako dituzten sistemen bidez. Kapilarra bera ere material batez baino gehiagoz egin daiteke —tefloia, pyrex beira, silize urtua, besteak beste—, eta horrek fluxu elektroosmotikoa alda dezake, kapilarrearen gainazaleko karga-dentsitatea desberdina izaten delako. Adibidez, pH-a bera izanik, pyrex beirazko kapilarrean dagoen fluxua tefloizkoan dagoena halako lau izan daiteke.

Aipatutako horietaz gainera, badira banaketa-disoluzioei gehitzen zaizkien beste hainbat gehigarri —urea, ziklodextrinak, eta abar—, eta guztien konposizioak eragin handia du banaketa-elektroforetikoetan. Horregatik, garrantzitsua da parametro guztiak ezagutzea eta kontrolatzea, teknika kasu bakoitzak eskatzen dituen beharretara moldatu ahal izateko.

4.4. Instrumentazioa

Azpiatal honetan, elektroforesi kapilarren ekipoen deskribapen labur bat egingo da, eta ezaugarri instrumental garrantzitsuenak azalduko dira. Egungo elektroforesi-ekipoek automatizazio maila oso altua dute; ordenagailuz kontrola daitezke, eta segurtasun-sistema fidagarriak izaten dituzte (Poole, 2003). Ekipo baten eskema orokorra 4.10. irudian dago ikusgai.



4.10. Irudia. Elektroforesi-ekipo baten eskema: 1) ekipoa kontrolatzen duen ordenagailua, 2) kapilarrean injektatu den lagina, 3) detektagailua, 4) kapilarraren sarrera edo *inleta*, 5) kapilarraren irteera edo *outleta*, 6) sarrerako elektrodoa eta elektrolito-disoluzioa (BGE) duen biala, 7) irteerako elektrodoa eta BGE duen biala, eta 8) goi-tentsioko iturria.

Elektromigrazio-teknikaren bat aplikatu nahi denean, egin beharreko lehendabiziko gauza da ekipoa kapilarra jartzea. Horretarako, ekipoa duen

kasetean jartzen da zutabe kapilarra, biribilduta. Kasete horrek agerian uzten du kapilarraren mutur bakoitza, eta, horrela, kasetea ekipoan sartzen denean, kapilarraren mutur bakoitza elektrodoetako batean sartuta geratzen da. Behin kasetea jarrita, elektrodoaren muturretik kapilarraren zati txiki bat agerian geratzen da, 1-2 mm ingurukoa. Elektrodo bati *inlet* deritzo, handik lagina injektatzen baita, eta besteari, *outlet*. Fluxu elektroosmotikoaren noranzkoa sarrerako elektrodotik irteerako elektrodorakoa izango da, normalean. Beste alde batetik, gogoratu sarrerako elektrodoa positiboa dela polaritate normala erabiltzen denean, eta irteerakoa, negatiboa. Alderantzizko polaritatea erabiltzen bada, elektrodoen zeinua alderantzizkoa izango da, eta fluxu elektroosmotikoa ere alderantzizkoa izatea eragingo du horrek. Komenigarria izan daiteke zenbait aplikaziotan hori egitea, eta alderantzizko fluxu elektroosmotikoa lortzeko teknikekin elkartu daiteke.

Elektrodo bakoitza bial batean dago murgilduta, eta, bial horretan, elektrolito-disoluzioa edo disoluzio erregulatzailerak jartzen da, zirkuitua itxi eta potentzial-diferentzia aplikatzean korronea sortzeko. Laginaren injekzioa ekipoak egiten du, era automatikoan, eta, horretarako, sarrerako elektrodoan dagoen biala lagina duen bialarekin ordezkatzeko da. Lagina injektatu ondoren, potentzial-diferentzia aplikatzen da, eta, horrela, laginean dauden konposatu guztiak banatu ahal izango dira mugikortasun elektroforetikokoaren arabera.

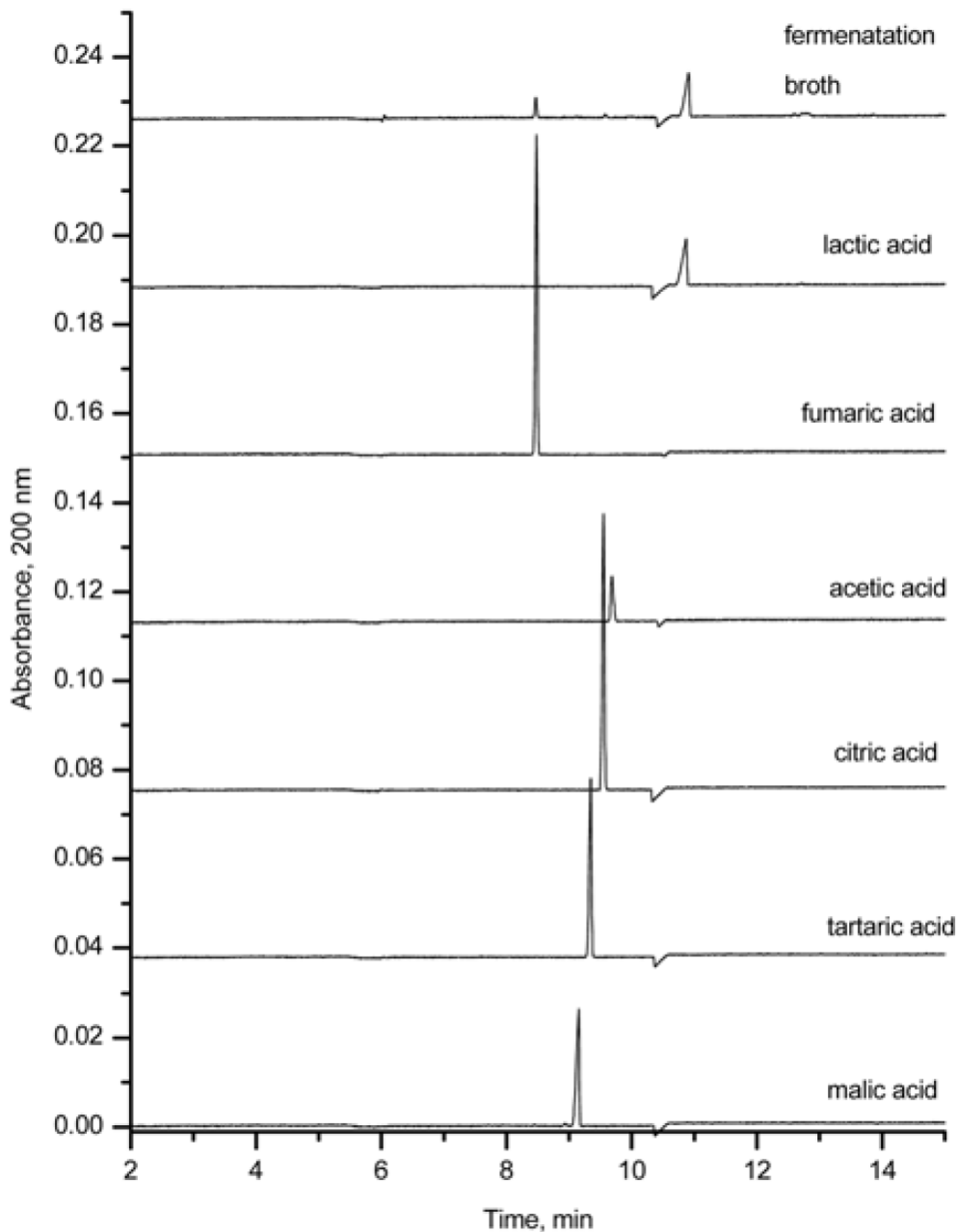
Analito bakoitzak kapilarrean aurrera egingo du *inlet*-etik *outlet*-era, bere abiadura totalaren arabera. Irteerako elektrodora iritsi aurretik, detektatutako pasatuko dira, eta, han, kontzentrazioarekiko proportzionala den seinale bat emango dute. Seinale guztiak ekipoari konektatutako ordenagailura iristen dira, eta seinale multzo hori elektroferograma bihurtuko da (4.11. Irudia). Elektroferograman dauden tontor elektroforetikoen azalera laginean dagoen konposatuen kontzentrazioekin erlaziona daiteke.

4.4.1. Goi-tentsioko iturria

Goi-tentsioko iturria ekipoaren oinarrizko elementuetako bat da. Goi-tentsioko iturri arruntek 30 kV-ra arteko potentzial-diferentziak aplikatu ditzakete, eta 200-300 μ A-ko korronea elektrikoak lortu ohi dira, nahiz eta badauden potentzial-diferentzia handiagoak aplikatzeko gai diren sistema bereziak ere (Hutterer eta Jorgenson, 1999; Qi *et al.*, 2006). Potentzial-diferentziaren kontrola $\pm 0,1\%$ izan daiteke gehienez, migrazio denboren errepikakortasuna mantendu nahi bada.

Goi-tentsioko iturria bi elektrodotara konektatzen da, fluxu elektroosmotikoa elektrodo batetik bestera joan dadin. Egungo ekipo gehienek aukera ematen dute potentzial-diferentzia konstantean, korronea elektriko konstantean edo potentzia konstantean lan egiteko. Dena den, ohikoena potentzial-diferentzia konstanteko

aukera erabiltzea da. Korrante konstanteko aukera erabil daiteke tenperatura kontrolatzeko arazoak daudenean, tenperatura-igoerak likidoaren biskositate-aldaketan duen eragina minimizatzen baitu. Goi-tentsioko iturriak eskaintzen duen beste aukera interesgarri bat da potentzial-diferentzia gradienteak aplikatu ahal izatea. Gradienteak erabiltzen direnean, banaketa elektroforetikoan zehar aplikatu nahi den eremu elektrikoa programatu daiteke (Felhofer *et al.*, 2010).



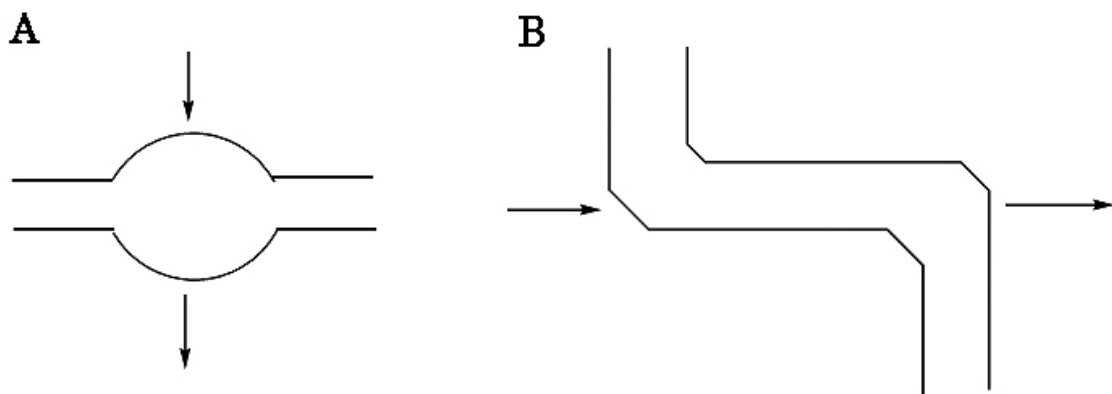
4.11. Irudia. Sorgoaren (*Sorghum sp.*) hartziduran azido laktikoaren ekoizpena kontrolatzeko metodoan lortutako zenbait elektroferograma. Irudian, banan-banan injektatu diren hainbat azido organikoren patroiak ikus daitezke. Erabilitako baldintza elektroforetikoak: 0,5 M den fosfato-disoluzio erregulatzailerak, (pH 6,25) eta 0,5 mM den zetiltrimetilamonio bromuro surfaktante mizelarra (Schober *et al.*, 2009).

4.4.2. Kapilarrak

Elektroforesi kapilarreko zutabe kapilar arruntenak silize urtua erabiliz egiten dira. Material horrek baditu banaketa analitikoetan erabili ahal izateko ezaugarriak: kimikoki eta elektrikoki egonkorra da, nahiko gogorra, malgua, eta merkea (Buszewski *et al.*, 2013). Hala ere, elektromigrazio-tekniken erabilera-esparru zabala dela eta, beste zenbait material ere erabiltzen dira, hala nola pyrex beira eta tefloia. Silize urtuzko kapilarrei gogortasuna eta malgutasuna emateko, 15 μm inguruko poliimida-estaldura bat izaten dute.

Mota askotako kapilarrak aurkitu daitezke merkatuan, baina, normalean, 50-100 cm luze izaten dira. Barne-diametroari dagokionez, 25-100 μm -koa izaten da. Barne-diametroari silize urtuari dagokion diametroa gehituta, 330 μm -ko diametroa du kapilarrak, gutxi gorabehera. Diametro horri 15 μm -ko poliimida-geruza bat gehitu behar zaiola; ondorioz, kapilarren diametro totala 350 μm ingurukoa izaten da. Kontuan izan behar da zenbait disolbatzaile organikok —formamidak eta azetonitriloak, esaterako— kapilarraren poliimida-geruza kaltetu dezaketela eta, ondorioz, kapilarra hondatzeko edo hausteko arriskua handiagoa dela (Poole, 2003).

Detektagailuaren posizioan, kapilarrek eliminatua dute poliimidazko estaldura, kapilarra zeharkatzen ari diren konposatuak detektatu ahal izateko. Detektagailuaren sentikortasuna handitzeko, kapilarrek burbuila bat izaten dute (*bubble-cell*) detektagailuaren izpia pasatzen den tokian. Beste kapilar batzuek, berriz, Z forma izaten dute (*z-cell*) puntu horretan, eta helburu bera du (4.12. Irudia).



4.12. Irudia. Detekzio-zelda motak: A) burbuila erakoa, eta B) Z formakoa. Geziak detektagailutik datorren izpia adierazten du. Ikus daitezkeen bezala, izpiak luzera handiagoa zeharkatzen du kapilarrak horrelako moldaketak dituenean.

4.4.3. Injekzio-sistemak

Elektroforesi kapilarrean lagin kantitate oso txikiak injektatzen dira; normalean, kapilarren eduki totalaren %1-2ra arteko bolumenak injektatzen dira. Kapilarren dimentsioak direla eta, bolumen horrek esan nahi du 1-50 nL inguruko lagin kantitateak injektatzen direla. Hori abantaila handia da lagin bolumen txikiak analizatu nahi direnean —bial egokiekin, 5 μL -ko lagina nahikoa izan daiteke—, baina desabantaila izaten da sentikortasunarentzat. Injektatutako konposatu kantitate horien ondorioz erabili behar dira burbuilak edo Z formako detekzio-zeldak dituzten kapilarrak, detektagailuak seinale intentsoagoa eman dezan.

Lagina kapilarrean kuantitatiboki sartzeko, badira hiru injekzio mota (Mayer, 2001; Poole, 2003): 1) hidrodinamikoa, 2) elektrozinetikoa, eta 3) hidrostatikoa. Injekzio hidrostatikoa ez da aztertuko, gaur egungo ekipo komertzial gehienek ez dutelako aukera hori ematen. Injekzio horren kasuan, denbora jakin batez sarrerako biala irteerakoa baino altuago kokatuz lortzen da lagina kapilarrean sartzea.

Injekzio hidrodinamikoa injekzio motarik ohikoena da, eta presio-diferentziaren ondorioz sartzen da lagina kapilarrean. Presio-diferentzia lortzeko, badira bi sistema: 1) sarrerako muturrean presioa aplikatzea, edo 2) irteerako muturrean hutsa egitea. Hidrodinamikoki injektatutako lagin bolumena (V_{inj} , m^3) (4.17) ekuazioaren bidez lortzen da.

$$V_{inj} = \frac{\Delta P \cdot d^4 \cdot \pi \cdot t_{inj}}{128 \cdot \eta \cdot L_T} \quad (4.17)$$

non ΔP aplikatutako presio-diferentzia (Pa) den, d kapilarren barne-diametroa (m), t_{inj} injekzio-denbora (s), η laginaren biskositatea ($\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1}$), eta L_T kapilarren luzera totala (m).

Zehaztasun optimoa lortzeko, ez dira erabili behar injekzio-denbora motzak —1-2 segundokoak, adibidez, laburregiak izan ohi dira—, eta barne-patroia erabiltzea gomendatzen da erreproduzigarritasuna handitu nahi bada; bereziki, analisi kuantitatiboan. Injekzioan erabiltzen diren presio-diferentzia arruntenak 25-100 mbar eta 0,5-5 segundo tartekoak izaten dira, baina denbora luzeagoak ere arruntak dira. Dena den, normalean, kasu bakoitzean aztertu behar da zein den bereizmena galdu gabe injekta daitekeen bolumenik handiena. Injekzioa era egokian egiten bada, %1-2 arteko RSD (*Relative Standard Deviation*) balioak lor daitezke.

Injekzio elektrozinetikoaren kasuan, potentzial-diferentzia aplikatzen da, lagina kapilarrean sar dadin. Banaketa-elektroforetikoa, beharrezkoa den baino potentzial-diferentzia txikiagoa erabili ohi da —3-5 aldiz txikiagoa—, eta 10-30 segundoz aplikatzen da. Laginean dauden konposatuak fluxu elektrosmotikoari eta mugikortasun elektroforetikoa esker sartzen dira kapilarrean. Konposatu ionikoak aztertzen direnean, arazo bat izan daiteke ezaugarri hori; izan ere, mugikortasun elektroforetikoa handiagoa duten analitoen kantitate gehiago sartuko da kapilarrean, mugikortasun txikiagoa dutenena baino. Hori dela eta, konposatu neutroentzat bakarrik erabili ohi da injekzio elektrozinetikoa (Quirino, 2013). Beste abantaila nagusia disoluzio oso biskosoen kasua da. Banaketa disoluzioak gel biskosoa direnean, injekzio hidrodinamikoa aplikatzeak kaltea egin diezaioteko kapilarrean, eta, ondorioz, injekzio elektrozinetikoa aukera hobea izaten da.

4.4.4. Detekzio-sistemak

Elektromigrazio-tekniketan erabiltzen diren kapilarren dimentsio txikiak direla eta, erronka esanguratsua izan da analitoak detektatzeko gai diren sistema egokiak garatzea. Detektagailuek ahalik eta detekzio muga baxuenak izan behar dituzte, hau da, *sentikortasun (sensitivity)* egokia izan behar dute. Sentikortasuna detekta daitekeen analito kantitate minimoarekin erlazionatzen da, eta seinale/zarata (S/N) erlazioaren bidez kalkulatzen da. Detektagailuaren *selektibitateak (selectivity)* ere egokia izan behar du, eta detektagarriak diren analito motekin erlazionatzen da. Adibidez, fluoreszentsia-detektagailua erabili ahal izateko, detektatu nahi den molekula talde funtzional fluoreszenteak izan behar ditu; detektagailu ultramorea (UV) erabili ahal izateko, berriz, konposatuak izpi ultramoreak xurgatzeko gaitasuna izan behar du, eta abar. Detektagailu bat zenbat eta espezifikagoa izan, orduan eta mugatuagoa izango da haren erabilera, baina selektibitatea hobea izango da, eta interferentzia gutxiago egongo dira. Azkenik, detektagailuaren tartea dinamikoa (*dynamic range*) zein den jakitea ere garrantzitsua da. Tarte dinamikoak adierazten digu analitoarein zein kontzentrazioetarako erabil daitekeen detektagailua era kuantitatiboan. Detektagailuaren erantzuna lineala bada, *linealtasuna* deritzo ezaugarri horri, eta, jakina, linealtasuna galtzen den kontzentrazioetik gora, detektagailuaren eraginkortasuna eskasagoa da (Baker, 1995).

Hiru ezaugarri nagusi horietaz gainera, beste zenbait ere aipatzen dira bibliografian (Fernández Gutiérrez *et al.*, 2005); adibidez, detektagailuaren erantzunak azkarra izan behar duela analito-kontzentrazioaren aldaketarekiko; banaketa elektroforetikoa bereizmena ez duela kaltetu behar; seinale fidagarriak eman behar dituela, eta abar.

Ondoren, detekzio-sistemak hiru taldetan banatuta azalduko dira: sistema optikoak, sistema elektrokimikoak eta sistema espektrometrikoak (Grossman eta Colburn, 1992; Poole, 2003). Detektagailu mota bakoitzarekin lor daitekeen detekzio muga 4.2. taulan laburtu da.

4.2. Taula. Elektroforesi-tekniketan erabiltzen diren detekzio-sistemak eta haiei dagozkien detekzio mugak (Swinney eta Bornhop, 2000; Fernández Gutiérrez *et al.*, 2005).

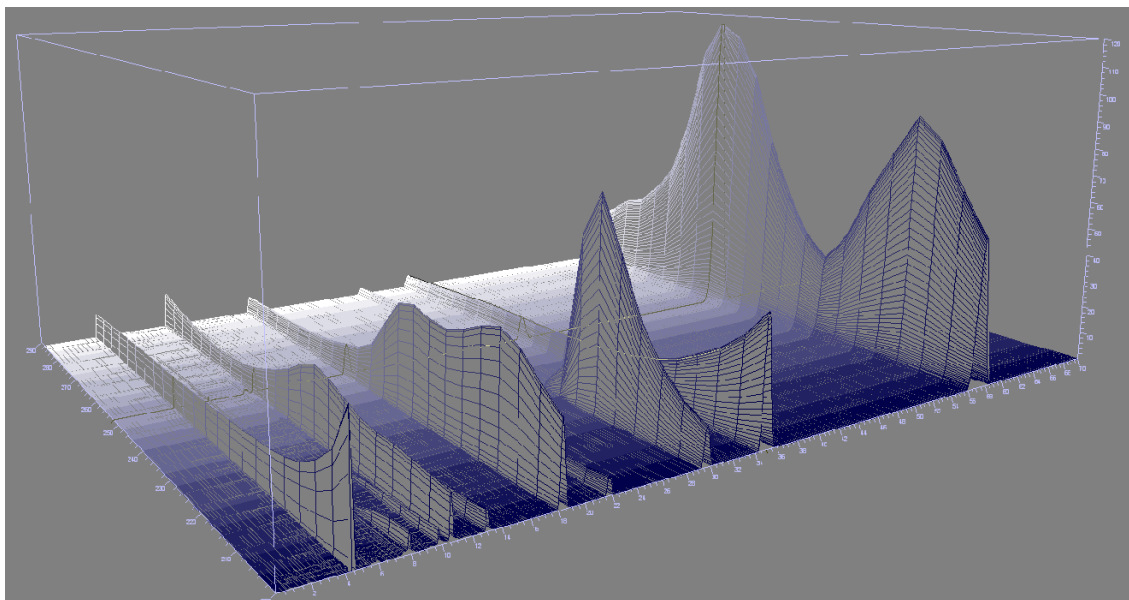
Detekzio-sistema	Detekzio muga (mol L ⁻¹)
UV-Vis espektrofotometria	
Zuzena	10 ⁻⁵ - 10 ⁻⁷
Ez-zuzena	10 ⁻⁴ - 10 ⁻⁶
Laserrez induzitutako fluoreszentzia (LIF)	
Zuzena	10 ⁻¹⁰ - 10 ⁻¹³
Ez-zuzena	10 ⁻⁵ - 10 ⁻⁷
Eroankortasuna	10 ⁻⁷ - 10 ⁻⁸
Potentziometria	10 ⁻⁷ - 10 ⁻⁸
Amperometria	10 ⁻⁷ - 10 ⁻⁹
Masa-espektrometria	10 ⁻⁷ - 10 ⁻⁹

4.4.4.1. Detekzio-sistema optikoak

Detekzio-sistema optikoak dira ekipo komertzialetan ohikoenak, eta, haien artean, ultramore-ikusgai (UV-Vis) detektagailua da ezagunena. Ultramore-detektagailua unibertsala da, eta konposatu organiko askoren kuantifikazioa egiteko erabiltzen da, konposatu organiko gehienek ultramorearen xurgatzen baitute 195-210 nm-ko uhin-luzeran. Silize urtuzko kapilarren kasuan nahikoa da poliimidazko estaldura kentzea detektagailua erabili ahal izateko; izan ere, silizeak ez du ultramore-eremuan argirik xurgatzen. Kapilarrari aldaketak egiten zaizkio detekzio-zeldan, sentikortasuna hobetzeko asmoz. Ultramore-detektagailu mota asko badiren arren, gaur egungo ekipo komertzial gehienek lerrokatutako diodoen detektagailua (DAD) izaten dute. DADaren bidez, xurgapen-espektro guztia aldi berean erregistratzen da, eta horrek analitoen identifikazioa eta kuantifikazioa errazten du (4.13. Irudia).

Bigarren detekzio-sistema optikorik erabiliena fluoreszentzia da, eta, bereziki, laserrez induzitutako fluoreszentzia (LIF, *Laser Induced Fluorescence*). Detektagailurik sentikorrena da —hain da sentikorra, ezen molekula bakar baten detekzioa lortu baita (Lee *et al.*, 1994)—, baina badu desabantaila garrantzitsu bat: konposatu gutxi dira fluoreszenteak. Zenbait kasutan, konposatuen deribatizazio-erreakzioak eginez, talde fluoreszenteak sar daitezke molekulan, eta, ondoren, LIF sistemaren bidez detektatu, baina, kasu askotan, konplexua izan daiteke pauso

hori (Tabara eta Kaneta, 2013). Fluoreszentziaren kasuan ere detekzio ez-zuzena erabil daiteke, BGE disoluzioan gehigarri fluoreszente bat jarritz. Horri esker, fluoreszenteak ez diren konposatuak detekta daitezke, eta tontor negatiboak lortuko dira, baina sentikortasuna galduko da (Poole, 2003), ultramorean gertatzen den bezala.



4.13. Irudia. DAD detektagailuak hiru dimentsioko elektroferogramak lortzeko aukera ematen du, uhin-luzera guztiak erregistratzen baititu denbora guztian. Irudian, 10 konposaturen banaketa ikus daiteke 3D elektroferograma batean. Irudia: J. Lopez-Gazpio (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013).

Azalduko ez diren beste detekzio-sistema optiko batzuk dira honako hauek, besteak beste: fosforeszentzia, kimioluminiszentzia, infragorria, erresonantzia magnetiko nuklearra, Raman dispersioa eta errefrakzio-indizea (Fernández Gutiérrez eta Segura Carretero 2005; Lopez-Gazpio eta Millán, 2013).

4.4.4.2. Detekzio-sistema elektrokimikoak

Detektagailu elektrokimikoen bidez, konposatu elektroaktiboak detektatzen dira. Badira hiru mota nagusi: eroankortasun-detektagailuak, detektagailu amperimetrokoak eta detektagailu potentziometrikoak. Haietatik lehena bakarrik dago ekipo komertzialetan eskuragarri, beste bi sistemek arazo gehiago ematen baitituzte; nagusiki, kapilarren barne-diametro txikiaren ondorioz (Baldwin, 2000; Buszewski *et al.*, 2013).

Eroankortasun-detektagailuak garatu ziren lehendabizi —kapilarren orde hodi estuak erabiltzen zirenean—, baina, elektroforesi kapilarra iristearekin, detektore optikoak izan ziren nagusi. Dena den, gaur egun, eroankortasun-detektagailuak dituzten ekipoak ere komertzialki eskuragarri daude, ioiak detektatzeko teknika unibertsala baita.

Detektagailu amperometrikoak selektiboagoak dira. Izan ere, espezieen oxidazio- eta erredukzio-prozesuetan oinarritzen dira; prozesu horiek elektrodoen gainazalean gertatzen dira, hain zuzen (Wang, 2005).

Azkenik, potentziometrian oinarritutako detektagailuen funtsa da zenbait konposatuk mintzak zeharkatzeko duten gaitasuna. Prozesu horrek potentzial-diferentzia bat sortzen du, eta potentzial hori proportzionala da analitokontzentrazioarekiko. Desabantaila nagusiak hiru dira: 1) elektrodoak prestatzeko eta erabiltzeko konplexutasuna, 2) sentsoaren iraupen eskasa (normalean, 2-3 egun), eta 3) elektrodoaren neurketak egokiak izateko, 12 orduz behin kalibratu behar da, elektrodoaren erantzunean sortzen diren aldaketak direla eta (Swinney eta Bornhop, 2000). Ondorioz, detekzio-sistema hori ez da asko erabiltzen, eta anioi eta katioi ez-organikoen kuantifikaziora mugatzen da.

4.4.4.3. Masa-espektrometria

Masa-espektrometria (MS, *Mass Spectrometry*) detektagailuak interes handiko sistema bihurtu dira azken urteotan. Izan ere, MS eta elektroforesi kapilarra elkartuz, konposatuen banaketarako, detekziorako eta kuantifikaziorako gaitasun handia duten teknikak konbinatzen dira. Gainera, MS detektagailua gai da konposatu ezezagunak kuantifikatzeko, eta, hortaz, detektagailu hori akoplatuz gero, elektroforesi kapilarra tresna oso eraginkorra bihurtzen da. MS detektagailuak atalaren hasieran aipatu diren baldintzak betetzen ditu: sentikortasun eta selektibitate oso handia du, eta detekzio-sistema unibertsala da.

Likido-kromatografiako ekipoak eta MS detektagailuetara akoplatu zirenean, erronka handia izan zen hutsunepeko baldintzetan lan egiten duen detektagailu batekin akoplatzea banaketa likido-fasean gertatzen den detektagailu kromatografikoa; nagusiki, likido bolumen handiak erabiltzen direlako likido-kromatografian. Elektroforesi kapilarren kasuan, likido bolumenak askoz txikiagoak dira, eta, alde horretatik, akoplamendua errazagoa da.

Masa-espektrometrian, espektrometrora iristen diren konposatuek era ionizatuan egon behar dute, detektatuko badira. Eskuragarri dauden ionizazio-iturrien artean —elektroi-talkaren bidezkoa, ionizazio kimikoa, termospray-aren bidezkoa, presio atmosferikoko ionizazioa, (ICP, *Inductively Coupled Plasma*), matrizeak lagundutako laser bidezko desortzio ionizazioa (MALDI, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*), eta azkartutako atomoen bidezkoa, besteak beste—

presio atmosferikoko ionizazioa akoplatu zen egokien elektroforesira, hasiera batean. Zehazki, presio atmosferikoko ionizazio mota bat zen egokiena: elektrospray-ionizazioa (ESI, *Electrospray Ionization*). ESI teknika bereziki ona da konposatu polarrak eta substantzia kargatuak determinatzeko. ESI ionizazioan oinarritutako masa-espektrometriaren eta elektroforesi kapilarraren akoplamenturako arazoetako bat da bi teknikek eremu elektrikoaren aplikazioa behar dutela. Elektroforesiko irteerako elektrodoak eta ESIren sarrerako elektrodoak bera izan behar dutenez, teknika bakoitzak erabiltzen duen potentzial-diferentzia —elektroforesi kapilarrak 5-30 kV, eta ESIk, 2-5 kV— ondo doitzeko metodoak garatu behar izan ziren, ekipoak komertzializatu ahal izateko (Ross, 2001).

ESI ionizazioa presio eta temperatura atmosferikoan gertatzen da. BGE disoluzioaren eta hodian bidez, ionizazio-iturrira pasarazten da. Han, 2-5 kV arteko potentzial-diferentzia aplikatzen zaio disoluzioari, tanta txikiz osaturiko spray moduan irten dadin. Tanta kargatu horiek lehertu egiten dira, gainazaleko gehiegizko kargaren ondorioz. Prozesu hori behin eta berriz errepikatzen da, eta, ondorioz, tantak geroz eta txikiagoak egiten dira. Une batean, partikula kargatuak bakarrik geratzen dira, eta, orduan, masa-espektrometroaren sarreratik pasatzen dira, detektatuak izateko.

Aipatutako ESI ionizazio-iturriaz gainera, polaritate baxuko molekulak ionizatzeko beste sistema batzuk ere akoplatu zaizkio elektroforesi kapilarrari, hala nola presio atmosferikoko ionizazio kimikoa, presio atmosferikoko fotoionizazioa, eta MALDI, besteak beste (Álvarez Llamas *et al.*, 2005; Simó eta Cifuentes, 2005).

4.5. Banaketen kalitatea

Elektromigrazioan oinarritzen diren banaketak konposatuen mugikortasun moduei esker lortzen dira. Eremu elektrikoaren eraginpean, hasieran dagoen konposatu-nahastea banatu egiten da, eta analito bakoitzari bere mugikortasunaren arabera den zona bat —banda ere esaten zaio— dagokio kapilarrean. Bi konposatu banatuko diren ala ez jakiteko, bakoitzari dagokion zonaren zabalera eta migrazio denbora ebaluatu behar dira. Zona bakoitzaren zabalera hainbat prozesuren ondorioa da; *band broadening mechanisms* deritze prozesu horiei; alegia, banden hedapen edo sakabanatze-mekanismoak. Banden sakabanatzearen iturriak asko dira; esaterako: 1) Joule efektuz sortutako temperatura gradientek, 2) luzetarako difusioa, 3) laginaren injekzioa, 4) konposatuen eta kapilarraren gainazalaren arteko interakzioa, 5) elektrodipersioa, 6) detekzioa, eta abar (Culbertson *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2003;

Kanoatov *et al.*, 2012). Oro har, banden hedapenari dagokion bariantza totala (σ_T^2) efektu horiei guztiei dagozkien bariantzen batura gisa adierazten da, eta konposatuari dagokion seinale elektroforetikoaren zabalerarekin erlazionatuta dago.

$$\sigma_T^2 = \sigma_{\text{JOULE}}^2 + \sigma_{\text{DIF}}^2 + \sigma_{\text{INJ}}^2 + \sigma_{\text{INT}}^2 + \sigma_{\text{ELEK}}^2 + \sigma_{\text{DET}}^2 + \dots \quad (4.18)$$

Joule efektuari dagokionez, potentzial-diferentzia handiak aplikatzen direnean ekoizten den beroak tenperatura gradientek sortzen ditu; fluido biskositatea aldatzen du, eta, ondorioz, banden zabalera gertatzen da (Cifuentes *et al.*, 1995; Poole, 2003). Banaketa onak lortzeko, ahalik eta eremu elektriko handienak aplikatu behar dira, baina Joule efektuak muga jartzen dio erabil daitekeen eremu elektriko maximoari. Neurri handi batean, elektromigrazio-teknikak kapilar oso meheetan aplikatuz gero, beroa era eraginkorragoan xahutzen da, eta horrek aurrerapauso izugarria ekarri zuen elektroforesiaren esparruan

Luzetarako difusioari dagokionez, konposatu baten hedapena bere tontor elektroforetikoaren zabalerarekin erlazioa daiteke. Baldintza idealetan —hau da, beste hedapen-prozesurik ez dagoela kontuan hartuz—, onar daiteke analitoen luzetarako difusioa dela zonak sakabanatzeko arrazoi bakarra. Izan ere, difusio erradiala ez da garrantzitsua, fluxu elektroosmotikoaren higadura-profil lauari esker, eta konbekzio-hedapena ere arbuiagarria da, kapilarraren propietateak direla eta. Luzetarako difusioa konposatu bakoitzaren propietateen menpekoa da; aipatu den difusio molekularren koefizientean barneratuta daude propietate horiek. Adibidez, molekula handiek difusio motelagoak izaten dituzte, eta, hortaz, luzetarako difusioari dagokion zona-hedapen txikiagoa izaten dute. Banaketa-disoluzioaren biskositateak ere badu eragina, eta baita tenperaturak ere. Dena den, ez da ahaztu behar difusioa analitoaren abiadurarekin erlazionatuta dagoela, eta, ondorioz, analito horrek duen abiadura-elektroforetikoak eta fluxu elektroosmotikoaren abiadurak ere funtsezko zeresana izango dute.

4.6. Elektromigrazio-teknika motak

Jarraian ikerkuntza honekin erlazio estua duten elektromigrazio-teknikak aztertuko dira, nahiz eta gehiago badiren (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013). 4.3. Taulan dago elektromigrazio-tekniken laburpena, eta metodo bakoitzaren ezaugarri garrantzitsuenak jaso dira.

4.3. Taula. Elektromigrazio-teknika moten laburpena (Poole, 2003; Buszewski *et al.*, 2013).

Teknika	Konposatuak banatzeko arrazoa	Aplikazio garrantzitsuenak
CZE / NACE	Karga/tamaina erlazioa	Ioia eta konposatu ionizagarriak
MEKC / NAMEKC	Mizelekin duten interakzioa	Konposatu neutroak eta kargatuak
CEC ^a	Fase geldikorrarekin duten interakzioa	Konposatu neutroak eta kargatuak
CIEF ^b	Puntu isoelektrikoa	Proteinak eta konposatu zwitterionikoak
CITP ^c	<i>Sandwich</i> eran dauden ioien mugikortasun motak	Ioien prekontzentrazioarako
CGE ^d	Karga eta tamaina (baina ez karga/tamaina erlazioa)	Makromolekula biologikoak, DNA, proteinak

^a*Capillary electrochromatography, Elektrokromatografia kapilarra.*

^b*Capillary isoelectric focusing, Fokatzeko isoelektriko kapilarra.*

^c*Capillary isotachopheresis, Isotakoforesi kapilarra.*

^d*Capillary gel electrophoresis, Elektroforesi kapilarra geletan.*

^{a,b,c,d}*Elektromigrazio-teknika horiei buruzko informazioa bibliografian aurki daitezke (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013).*

4.6.1. Zonako elektroforesi kapilarra (CZE)

Elektromigrazio-teknika sinpleenaren kasuan, hau da, zonako elektroforesi kapilarrean (CZE), elektroforesi fenomenoak eta fluxu elektroosmotikoak bakarrik dute eragina konposatuen banaketan. Aurreko azpiataletan elektroforesia eta elektroosmosia aztertutako direnean, zehaztasun osoz azaldu dira zonako elektroforesi kapilarra arautzen duten bi fenomeno nagusiak.

Ikuspuntu praktiko batetik, fluxu elektroosmotikoaren abiadura nahiko azkarra bada, katioiak eta anioiak aldi berean banatu eta detekta daitezke. Fluxu elektroosmotikoak molekula guztietan duela eragina eta, polaritate normala aplikatzen bada, fluxua anodotik katodora mugituko dela, hau da, elektrodo positibotik negatibora.

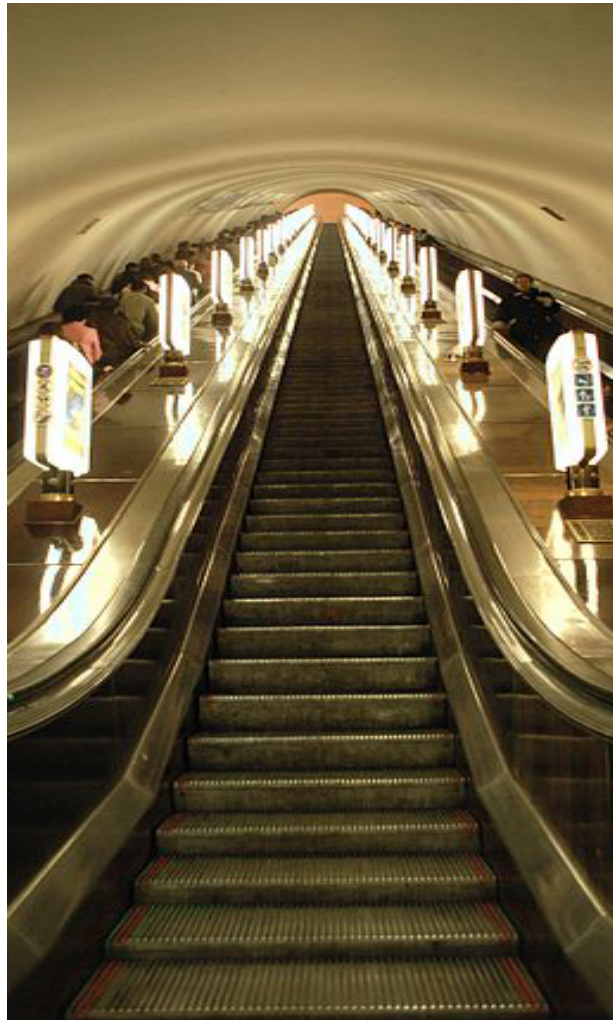
Lagina anodoan injektatu, eta katodorantz desplazatzen da. Ondoren, seinalea ematen du katodoaren aurretik kokatuta dagoen detektagailuan. Partikula kargatuek elektroforesia eta partikula guztiek elektroosmosia jasango dutenez (4.14. Irudia), bi fenomeno horien batura izango da azkenean izango duten abiaduraren erantzulea. Bi efektuak kontuan hartzen dituen mugikortasunari

mugikortasun totala edo itxurazko mugikortasuna deritzo (*apparent mobility*). Pareko zerbait adierazten du abiadura totalak edo itxurazko abiadurak.

$$\mu_T = \mu_{EOF} + \mu_e \quad (4.19)$$

$$v_T = v_{EOF} + v_e \quad (4.20)$$

Katioien mugikortasun elektroforetikoa positiboa denez, mugikortasun totala positiboa da, eta fluxuari dagokiona baino azkarragoa. Hortaz, katioiak dira lehenak detektagailura iristen, fluxuaren abiadura eta abiadura elektroforetikoa *batu* egiten direlako.



4.14. Irudia. Fluxu elektroosmotikoak kapilarrean dauden partikula guztiak eramaten ditu aurrera, eskailera mekaniko bat balitz bezala. Vetter eta McGowan ikertzaileek proposatu zuten fluxu elektroosmotikoa eskailera mekanikoaren analogiarekin azaltzea (Vetter eta McGowan, 2001).

Anioien kasuan, berriz, mugikortasun elektroforetikoa negatiboa da, eta, hortaz, fluxua baino mantsoagoak dira, fluxuaren abiadurari abiadura elektroforetikoa *kendu* behar baitzaio. Horretaz gainera, anioiaren mugikortasuna fluxuarena baino handiagoa bada, lehena gailenduko da, eta abiadura totala negatiboa izango da. Ioi hori ez da inoiz detektagailura iritsiko. Horregatik esaten da, fluxu elektroosmotikoaren abiadura *nahiko azkarra* bada, katioiak eta anioiak aldi berean detekta daitezkeela.

Azkenik, konposatu neutroen kasuan mugikortasun elektroforetikoa nulua denez abiadura totala fluxuaren abiadura izango dela eta, ondorioz, ezin direla banatu. Anioien eta katioien kasuan, aldiz, bere ezaugarrien araberako mugikortasun elektroforetikoa du bakoitzak eta, ondorioz, abiadura totala desberdina da.

Laburtuz, bi mugikortasun izan behar dira kontuan: 1) mugikortasun elektroforetikoa, bibliografian mugikortasun eraginkorra ere baderitzona, eta 2) mugikortasun totala edo itxurazkoa, hau da, partikula bakoitzak kapilarrean duen mugikortasun *erreal*a —mugikortasun elektroosmotikoari dagokion kontribuzioa ere kontuan hartzen duena—.

Zonako elektroforesi kapilarrean eta, oro har, elektromigrazio-teknika guztietan garrantzitsua den beste parametroetako bat migrazio denbora da. Migrazio denbora (t_m , s) solutu batek detektagailura iristeko behar duen denbora da, eta solutuaren abiadura totalarekin (v_T , m s⁻¹) eta detektagailurainoko distantziarekin (L_D , m) erlazionatzen da (Poole, 2003; Buszewski *et al.*, 2013). Abiaduraren definiziotik,

$$v_T = \frac{L_D}{t_m} \quad (4.21)$$

ekuazioa idatz daiteke. Abiaduraren ordez mugikortasuna idatziz, adierazpen hau lortzen da:

$$\mu_T E = \frac{L_D}{t_m} \quad (4.22)$$

non E (V m⁻¹) eremu elektrikoa den. Ondoren, eremu elektrikoaren ordez, haren definizioa ordezkatuko da, (4.23) ekuazioan azaltzen den moduan.

$$E = \frac{V}{L_T} \quad (4.23)$$

Non V potentzial-diferentzia (volt) den, eta L_T kapilarraren luzera totala (m). Ondoren, (4.22) eta (4.23) adierazpenak elkartuz:

$$\mu_T \frac{V}{L_T} = \frac{L_D}{t_m} \rightarrow \mu_T = \frac{L_D L_T}{t_m V} \quad (4.24)$$

Azken ekuazio hori oso garrantzitsua da; izan ere, mugikortasuna parametro esperimentalen funtzioan jartzen du. Baina azken pauso bat eman behar da mugikortasun elektroforetikoa lortzeko, azken hori determinatu nahi izaten baita normalean. Konposatu baten mugikortasun elektroforetikoa lortzeko, fluxu elektroosmotikoari dagokion kontribuzioa kendu behar zaio mugikortasunari. Horretarako, konposatu neutroek eskaintzen duten informazioa erabiltzen da, eta, konposatu neutrorik ez bada, gehitu egiten da —markatzaile deritzona—, fluxu elektroosmotikoaren abiadura kalkulatzeko. Izan ere, (4.24) adierazpena neutroa den konposatu bati aplikatzen badiogu, mugikortasun elektroosmotikoa kalkulatu da.

$$\mu_{EOF} = \frac{L_D L_T}{t_{EOF} V} \quad (4.25)$$

non t_{EOF} fluxu elektroosmotikoari dagokion migrazio denbora den, edo, hori esperimentalki lortu ezin bada, konposatu bati dagokiona. Guztia adierazpen bakarrean jasotzen bada, ikuspuntu esperimentaletik oso erabilgarria den ekuazio hau lortzen da:

$$\mu_e = \mu_T - \mu_{EOF} = \frac{L_D L_T}{t_m V} - \frac{L_D L_T}{t_{EOF} V} = \frac{L_D L_T}{V} \left(\frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_{EOF}} \right) \quad (4.26)$$

4.6.2. Kromatografia elektroinetiko mizelarra (MEKC)

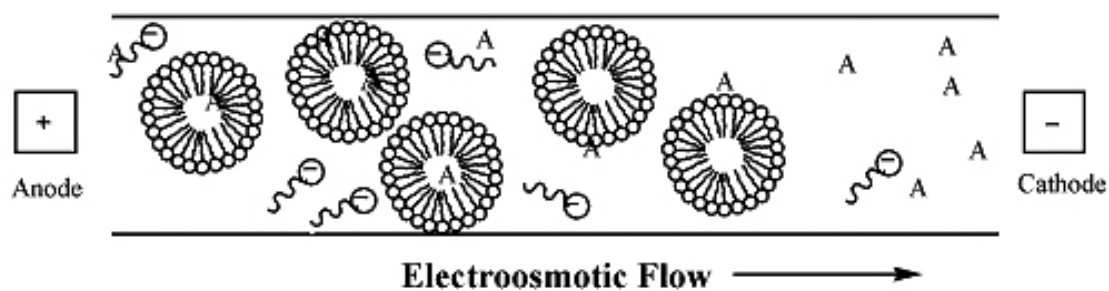
Aurreko azpiatalean azaldu den bezala, konposatu neutroak ezin dira banatu CZE bidez, molekula neutro guztiek abiadura total bera baitute. Kromatografia elektroinetiko mizelarra (MEKC) deritzon teknikak, berriz, ioiak eta molekula neutroak banatzeko aukera ematen du. BGE disoluzioan mizelak osatzeko gai den surfaktante tentsoaktibo bat —sodio dodezilsulfatoa, adibidez— gehitzen da, surfaktantearen kontzentrazio mizelar kritikoa (CMC, *Critic Micelle Concentration*) baino kontzentrazio handiago bat, disoluzio horretan mizelak osa daitezten. Analito neutroek mizelekin dituzten interakzioak konposatu bakoitzarentzat bereizgarriak direnez, beste kontribuzio bat gehitu behar da

mugikortasun totalan. Horren ondorioz, analito neutroek beste abiadura total bat izaten dute, eta haien banaketa egitea lor daiteke.

Banaketa-disoluzioan dauden mizelek bigarren fasea osatzen dute, fase pseudogeldikorra deritzona; izan ere, ikuspuntu kromatografikotik esan daiteke *mugitzen ari den fase geldikorra* dela. Hala ere, IUPACk dioenez, MEKC ez da kromatografiaren definizioarekin guztiz bateragarria (Riekkola *et al.*, 2004); hitzaren adiera hertsian, behintzat. Ondorioz, esan daiteke MEKC teknika elektroforesiaren eta likido-kromatografiaren arteko metodo hibrido bat dela.

Banaketaren funtsari dagokionez, ohikoena surfaktante moduan sodio dodezilsulfatoa (SDS) erabiltzea da. SDS molekulek, 8-9 mM baino kontzentrazio handiagoan badaude, mizelak eratzen dituzte ur-disoluzioan daudenean. Mizela horiek anionikoak dira, eta, ondorioz, mugikortasun elektroforetikoa negatiboa izaten dute —*outletetik inleterako* noranzkoan migratzen dute—. Baina, fluxu elektroosmotikoaren mugikortasuna nahiko handia bada, mizelen abiadura totala *inletetik outleterakoa* izango da. Mizelen mugikortasuna (μ_{mc}), hortaz, nahiko motela izango da, baina detektagailurantz mugituko dira fluxu elektroosmotikoarekin batera, sarrerako elektrodetik irteerakora migratuz.

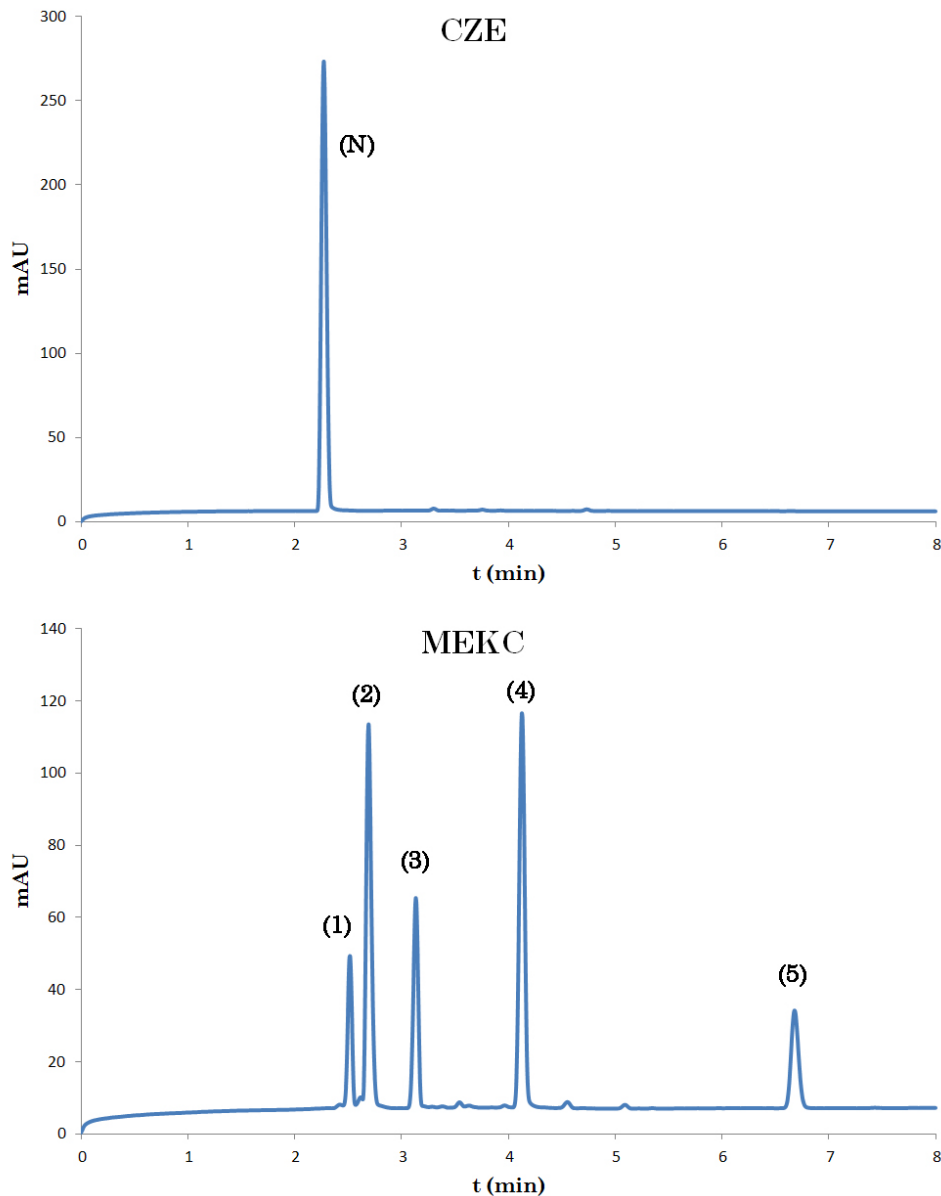
Laginarekin batera kapilarrera injektatu diren molekulek interakzioa izan dezakete mizelekin, hainbat eratarata, baina nagusiki interakzio hidrofoboak eta elektrostatikoak —analitoek karga dutenean— izan daitezke. Oro har, eta, sendoenetik ahulenera sailkatuta, hiru eratarata gerta daitezke interakzioak: 1) analitoa mizelaren barruan sartu daiteke, 2) kosurfaktante moduan SDS molekulekin batera gerta daiteke, edo 3) mizelatik kanpo interakzioa izan dezake geruzarekin (4.15. Irudia). Mizelen abiadura mantsoa denez, analitoek zenbat eta interakzioa sendoagoa izan mizelekin, orduan eta abiadura mantsoagoa izango dute, eta, ondorioz, migrazio denbora handiagoa.



4.15. Irudia. Kromatografia elektroosmotikoaren irudikapena. Analitoen (A) eta mizelen arteko interakzioa motak ikus daitezke.

Interakzioa oso sendoa duten konposatuak mizelekin batera mugituko dira nagusiki, eta haien abiadura totala bera izango dute. Horrelako konposatuak abiadura mizelarra lortzeko erabiltzen dira —Sudan III, adibidez—; izan ere, mizelen migrazio-abiadura ($t_{mc} = t_m$), bera dute. Interakziorik ez duten

konposatuak, berriz, EOFarekin batera migratuko dute ($t_{EOF} = t_m$), eta fluxuaren markatzaile gisa erabiltzen dira —metanola, esaterako—. 4.16. Irudian, argi azaltzen da CZE eta MEKC tekniken arteko desberdintasuna, konposatu guztiak mizelekin duten interakzioaren arabera nola banatzen diren ikus baitaiteke.



4.16. Irudia. Lagin beraren analisia, CZE eta MEKC tekniken bidez. CZEren kasuan, 5 konposatuak neutroak direnez tontor bakarria ikusten da, (N) guztiek abiadura total bera baitute. MEKC erabiltzean, berriz, konposatu guztiak ondo banatu direla ikus daiteke. Ezaugarri elektroforetikoko guztiak berdinak dira, baina, MEKCen kasuan, SDS surfaktantea gehitu da banaketa-disoluzioan. Konposatuaren identifikazioa: 1) kafeina, 2) 4-metil-3-penten-2-ona, 3) nitrobenzenoa, 4) bentzalazetona, eta 5) bentzofenona. Ezaugarri elektroforetikokoak: 20 mM sodio tetraborato dekahidratatua, 25 mM SDS (MEKC), %10 azetonitriloa, 25 kV-eko potentzial-diferentzia, eta 8 s-ko eta 45 mbar-eko injekzio hidrodinamikoa. Kapilarraren luzera totala 50 cm-koa da. Irudia: J. Lopez-Gazpio (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013).

MEKC teknikan, banaketak prozesu kromatografikoari jarraitzen dio; alegia, bigarren fasearekiko duten afinitatearen arabera migratzen dute analitoek. Horregatik, kromatografian erabiltzen diren antzeko adierazpenak baliagarriak dira MEKC aplikatzen denean, baina aldaketa batzuekin. Kromatografian, ahalmen-faktorea (k') (4.27) ekuazioaren bidez lortzen da,

$$k' = \frac{t_m - t_0}{t_0} \quad (4.27)$$

eta konposatu bakoitzak fase geldikorrarekiko duen afinitatea kuantifikatzen du. Kromatografia elektrozinetiko mizelarrean, mizelen migrazioa ahalmen-faktorean sartu behar da, fase mizelarra mugitu egiten delako. Hortaz, ahalmen-faktorea honela definitzen da (Terabe, *et al.*, 1984):

$$k' = \frac{t_m - t_{EOF}}{t_{EOF} \cdot (1 - t_m/t_{EOF})} \quad (4.28)$$

Kontuan izan behar da t_{mc} -k infinitura jotzen duenean (4.27) eta (4.28) adierazpenak berdinak direla. Ahalmen-faktorea esperimenterki lortzeko, fluxu elektroosmotikoaren eta mizelen abiaduraren konposatu markatzaileak behar dira, (4.27) ekuazioa aplikatu ahal izateko. Ahalmen-faktoreak adierazten du zenbat denbora dagoen solutu jakin bat mizelarekin interakzioan eta interakziorik gabe. Analito guztiak, batez beste, mizelaren abiaduran migratzen ari dira $k'/(1+k')$ denboraz, eta $1/(1+k')$ denboraz fluxu elektroosmotikoarekin batera.

Hori kontuan hartuz, analito neutroen kasuan, honela berridatzi behar da mugikortasun totala MEKC banaketetan:

$$\mu_T = \mu_{EOF} + \frac{k'}{1+k'} \mu_{mc} \quad (4.29)$$

Konposatu kargatuen kasuan, berriz, kontuan izan behar da mugikortasun elektroforetikoa ere baduela, eta, ondorioz, mugikortasun totalak hiru kontribuzio ditu (Ferguson *et al.*, 1998):

$$\mu_T = \mu_{EOF} + \frac{1}{1+k'} \mu_e + \frac{k'}{1+k'} \mu_{mc} \quad (4.30)$$

Ahalmen-faktorea ezaugarri fisiko eta kimiko askoren menpe dago, baina, molekula neutroen kasuan, konposatuaren oktanol/ur partizio-koefizientearekin (K_{ow}) erlaziona daiteke, koefiziente horrek molekularen hidrofobotasuna

adierazten baitu, eta, neurri batean, mizelekiko interakzioaren erantzule nagusia da efektu hori (Lamalle *et al.*, 2012).

Azaldu den bezala, komertzialki eskuragarri dauden surfaktanteen artean MEKC aplikazioetan gehien erabiltzen dena SDSa da, dudarik gabe. Horretaz gainera, beste hainbat ere baliagarriak dira pseudofase mizelarra osatzeko. Haien artean bereizten dira anionikoak —sodio dezilsulfatoa, sodio tetradezilsulfatoa, sodio dodezilsulfonatoa eta SDSa bera, besteak beste—, kationikoak —dodeziltrimetilamonio kloruroa (DTAC), zetiltrimetilamonio kloruroa (CTAB), eta abar— eta *zwitterionikoak* —3-[(3-kolamidopropil)dimetilamonio] 3-propanosulfonatoa (CHAPS), adibidez—. Mizela mota guztien eta haien aplikazioaren analisi sakona bibliografian aurkitu dezake irakurleak (Poole, 2003).

MEKC erabiliz lortutako eraginkortasuna —normalean, $N < 200.000$ — CZE_n lortzen dena baino urriagoa bada ere, banaketa oso onak lortzen dira (Perrett, 2010). Gainera, MEKC erabiltzeak CZE_k dituen abantaila gehienak mantentzen dituzenez, konposatu kargadunak zein neutroak dituzten nahaste konplexuak analizatzeko erabilgarriak da; adibidez, metabolomikan (Guillo *et al.*, 2004) eta analisi kimikoan (Buszewski *et al.*, 2013). Azpiatalari amaiera emateko, M. Silva-k argitaratutako berrikuspen-artikuluak irakurtzea gomendagarria dela aipatu behar da, haietan kromatografia elektroinetiko mizelarrak azken urteotan izandako garapenaren ñabardura guztiak zehatz-mehatz aztertzen baitira (Silva 2007, Silva 2009, Silva 2011, Silva 2013).

4.6.3. Elektroforesi kapilar ez-akuosoa (NACE)

Elektromigrazio-teknika klasikoetan disolbatzaile akuoso edo hidroorganikoak erabiltzen dira, baina badira disolbatzaile ez-akuosoeekin lor daitezkeen banaketa elektroforetikoak. Elektromigrazio mota jakin horri elektroforesi kapilar ez-akuosoa (NACE) deritzo eta garrantzi handiko banaketa mota da. NACEren lehen aplikazioa 1984an argitaratu zuten Walbroehl eta bere lankideek (Walbroehl eta Jorgenson, 1984), eta azetonitriloa erabili zuten ura ordezkatzeko. Hasiera batean, ingurune ez-akuosoan lan egitea nekeza izan zen muga instrumentalak zirela-eta (Walbroehl eta Jorgenson, 1986), baina 1994tik hona NACEri buruzko ikerkuntzak asko ugartu dira (Szumski eta Buszewski, 2013).

NACE teknika aplikatzeko abantailak honako hauek dira: 1) selektibitatea areagotzea, 2) uretan disolbagarritasun urria duten edo disolbaezinak diren konposatuak banatu ahal izatea, 3) eskala handiko elektroforesi kapilarra (CE) egin ahal izatea, 4) elkarrekintza polarrak erabiltzea, 5) eraginkortasuna hobetzea —plater teoriko kopurua handitzen delako—, 6) Joule efektuaren ondorioak murriztea eta, ondorioz, potentzial-diferentzia handiagoak aplikatu ahal izatea eta

7) fluoreszentzia areagotzea —hori zenbait kasutan bakarrik gertatuko da eta, jakina, detekzioa fluoreszentziaz egiten denean bakarrik izango du eragina— (Szumski eta Buszewski, 2013; Kenndler, 2014).

Sistema akuosoekin alderatzen denean, elektroforesi ez-akuosoak abantaila handiak eskaintzen ditu, izan ere, disolbatzaile organiko bat edo horien konbinaketak erabil daitezke disolbatzaile moduan. Horrek ezaugarri oso desberdinak dituzten nahasteak lortzeko aukera ematen du eta, ondorioz, selektibitatea kontrolatzeko bideak zabaltzen ditu. Bestalde, uretan banezinak diren konposatu askok pK_a aldaketa nabarmenak jasan ditzakete ingurune organikoan eta beraz, NACE bidez banangarriak izan daitezke. Aldaketa horiek kontrolatzeko garrantzitsua da disolbatzaile organikoen azido-base ezaugarriak ezagutzea (4.4. Taula).

4.4. Taula. Disolbatzaile organikoen sailkapena, azido-base ezaugarrien arabera (Kolthoff, 1974; Szumski eta Buszewski, 2013).

Ezaugarriak		Adibideak
Anfiprotikoa	Neutroa	Metanola (MeOH), glizerola, <i>tert</i> -butil alkohola
	Protogenikoa	Azido azetikoa, azido formikoa, azido sulfonikoa
	Protofilikoa	Formamida (FA), N-metil-azetamida, N-metilformamida (NMF)
Aprotikoa	Neutroa	Dimetilsulfoxidoa (DMSO), N,N-dimetilformamida (DMF), tetrahidrofuranoa (THF)
	Dipolar protogenikoa	Azetonitriloa (ACN), azetona, nitrobenzenoa
	Dipolar protofilikoa	Benzenoa, karbono tetrakloruroa, hidrokarburu alifatikoak

4.4. Taulan jasotako informazioari erreparatuz, NACEn gehien erabiltzen diren disolbatzaile organikoak anfiprotiko neutroak —metanola, MeOH—, aprotiko dipolar protogenikoak —azetonitriloa, ACN— eta anfiprotiko protofilikoak —formamida, FA— dira. Disolbatzaile puru gehienak erabiliz agertzen da fluxu elektroosmotikoa elektroforesiko kapilarrean, eta hori behar-beharrezkoa da elektromigrazioa gertatuko bada. Arrazoi praktikoak direla-eta, NACEn erabili ahal izateko honako baldintza hauek bete behar dituzte disolbatzaile ez-akusok:

1) biskositate baxua izatea, 2) lurrinkortasun baxua izatea, 3) ultramore-absortzio urria izatea —ultramore-detektagailua erabili behar denean behintzat—, 4) toxikoak ez izatea eta 5) banaketa-disoluzioan ezinbestekoa den elektrolitoa disolbatzeko gai izatea, besteak beste.

NACE aplikazioan ohikoenak diren disolbatzaileen beste zenbait ezaugarri fisikokimiko 4.5. taulan laburbildu dira. Bereziki garrantzitsua dira biskositateei eta konstante dielektrikoei dagozkien datuak, baina baita bi horien arteko erlazioa ere —gogoratu fluxu elektrosmotikoa zuzentzen duen Helmholtz-Smoluchowski ekuazioan bi parametro horien arteko zatiketa agertzen dela—. Jakina, hori ez da fluxu elektrosmotikoan eragina duen faktore bakarra, esaterako, kapilarraren eta banaketa-disoluzioaren arteko zeta-potentzialak ere zeresan handia du, baina, hori ere disolbatzailearen araberakoa da.

4.5. Taula. Elektroforesi kapilarrean ohikoak diren disolbatzaileen ezaugarri fisikokimikoak (Poole, 2003).

Disolbatzailea	Irakite-puntua (°C)	Biskositatea, η (10^{-3} Pa s)	Konstante dielektrikoa, ϵ	ϵ/η
Ura	100	0,89	78,39	88,1
Metanola	64,7	0,545	32,70	60,0
Azetonitriloa	81,6	0,341	37,5	110,0
Formamida	210,5	3,30	111,0	33,6
NMF	180	1,65	182,4	110,5
DMF	153	0,802	36,71	45,8
THF	66	0,46	7,58	16,5

Bestalde, aipatu behar da disolbatzaile organikoetan elektrolito-disoluzioak prestatzen direnean pH-a ur-inguruneetarako prestatuta dauden elektrodoekin neurtzen denez pH* erabiltzen dela —itxurazko pH-a—. pH-ak eta pH*-ak fluxu elektrosmotikoan duten eraginaren analisia biliografia espezializatuan aurki daiteke (Belder *et al.*, 2000).

Azpiatalaren hasieran aipatu den bezala, konposatu hidrofoboek disolbagarritasuna areagotzeko erabili ohi da NACE —uretan guztiz disolbaezinak diren analitoak ezin dira banatu zonako elektroforesi kapilarra erabiliz—. Baina, hori ez da arrazoi bakarra. NACEk eskaintzen duen beste abantaila garrantzitsu bat selektibitatearen kontrola da. Gogoratu selektibitatea bi konposaturen arteko banaketaren kalitatearen adierazle dela, azken finean mugikortasun elektroforetikoa eta elektrosmotikoa oinarritzen dena. Analitoak azido edo base ahulak badira —analito gehienak horrelakoak izaten dira— beraien pK_a-ren araberakoa izango da selektibitatea. Disolbatzaile organikoek analitoen pK_a aldatzeko gaitasuna dutenez, disolbatzaile desberdinak eta disolbatzaile

konbinaketa desberdinak erabiliz banaketa elektroforetikoen selektibitatea asko alda daiteke.

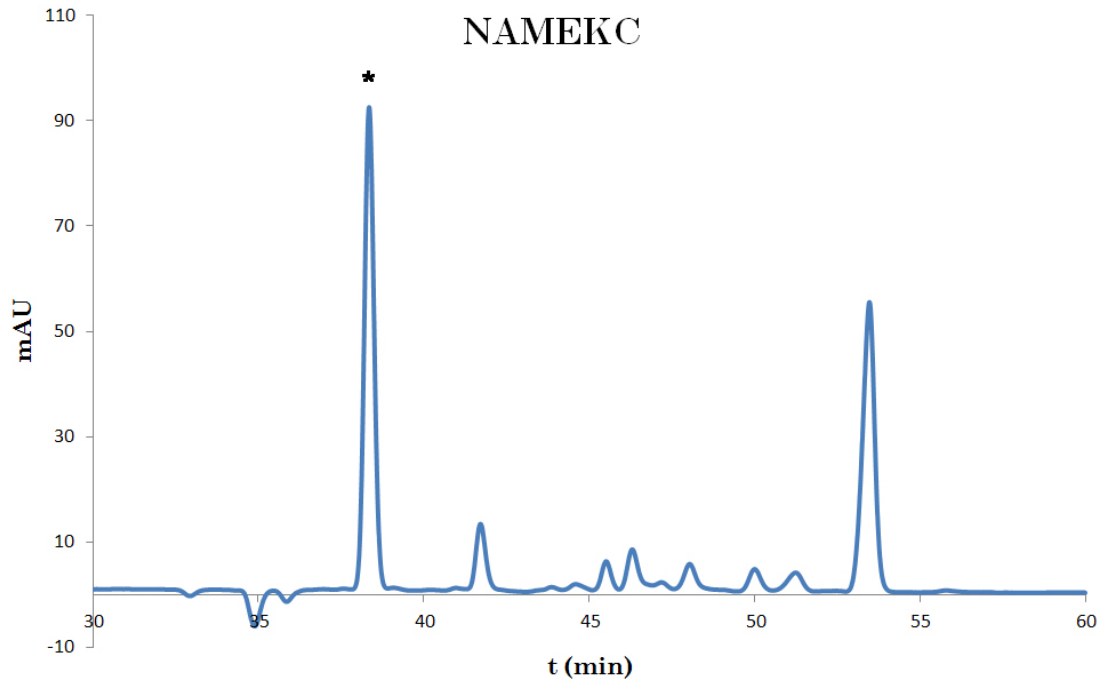
Beti ere disolbatzailea aukeratzeko kontuan izan behar da banaketa gerta dadin analitoek karga izan behar dutela edo gehigarri kargadun batekin elkarrekintza izan behar dutela. Beraz, kargarik ez duten konposatuen banaketa lortzeko, gehigarriak jartzen dira banaketa-disoluzio elektrolitikoan (Bowser *et al.*, 1998). Ur-ingurunean konposatu neutroen eta hidrofoboan banaketarako surfaktante mizelarrak erabiltzen diren arren —kromatografia elektroinetiko mizelar deritzon aldaeraren kasua, hain zuzen ere—, ingurune ez-akuosoa konplexuagoa da. Izan ere, disolbatzaile organiko gehienetan mizelak ezin dira osatu surfaktante molekulen eta hidrokarburo kateen arteko elkarrekintza hidrofoboak ahulegiak direlako. Mizelak osatzeko gai diren disolbatzaile organiko bakarrenetakoak formamida eta poli(etilenglikola) dira eta kasu zehatz horiek aurrerago aztertuko dira kromatografia elektroinetiko mizelar ez-akuosari dagokion azpiatalean. Ohar bitez irakurleak, zenbaitetan behinik behin, bibliografian NAMEKC teknika NACEren barruan sailkatzen dela, alegia, ez direla biak bereizten.

NACEri dagokionez, analito neutroen banaketa lortzeko espezie ioi-parekatzaileak (*ion-pairing species*) erabiltzen dira, adibidez, tetrahexilamonio bromuroa (THA) (Tjordelund eta Hansen, 1997). Beste gehigarri garrantzitsu batzuk ere ohikoak dira, esaterako, amonio gatzak, metal alkalinoen ioiak, zenbait anioi —perkloratoa, nitratoa, bromuroa eta kloruroa, kasu—, Brij, korona-eterrak, kinina, tetraalkilamonio gatzak —aipatutako THAz gainera—, azido kanforsulfonikoak, eta abar (Szumski eta Buszewski, 2013). Aipatutako gehigarriek elkarrekintza solbofobikoak, elektrostatikoak eta emaile-hartzaile motakoak ematen dituzte eta horri esker analito neutroak banatu ahal izateko. Aipatu behar da NACEn gertatzen diren elkarrekintzak CEn gertatzen direnak baino askoz ere konplexuagoak direla uste dela. Irakurleak bibliografia espezializatura jo beharko du argibide gehiago eskuratzeko (Bowser *et al.*, 1998; Riekkola *et al.*, 2000; Porras eta Jussila, 2007; Kenndler, 2014).

4.6.4. Kromatografia elektroinetiko mizelar ez-akuosoa (NAMEKC)

CZE ingurune ez-akuosoa egiten denean NACE deritzon bezala, MEKC ere ingurune ez-akuosoa egin daiteke: NAMEKC (*Nonaqueous Micellar Electrokinetic Chromatography*) (4.17 Irudia). Izan ere, CZEN gertatzen den moduan, NACE bidez ezin dira banatu ionikoak ez diren espezieak. NAMEKC teknika erlatiboki berria izanik informazio eskasa dago literatura zientifikoan, nahiz eta gauza

jakina den surfaktante anioniko karboxilikoek agregatu neutroak osa ditzaketela ingurune organikoan, bereziki konstante dielektriko altua duten disolbatzaileen kasuan —aurreko azpiatalean aipatutako formamida eta poli(etilenglikola) kasu— (Felhofer *et al.*, 2013).



4.17. Irudia. Perfume baten analisia, NAMEKC teknikarekin lortua. Disolbatzaile organikoa formamida da, eta fosfatoa gehitu da elektrolito gisa. Izartxoaz markaturiko tontorra analisi kuantitatiboa egiteko erabili den barne-patroiari dagokio. Irudia: J. Lopez-Gazpio (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013).

R.M. Seifar eta bere lankideek konposatu hidrofoboak banatzea lortu zuten SDS surfaktantea eta ur/azetonitrilo nahasteak erabiliz; horri esker frogatu ahal izan zuten azetonitrilo kontzentrazio altuetan ere *sasimizelak* osatzen direla, eta zentzu zorrotzean mizelak ez badira ere, haiei esker konposatu neutroak bana daitezke (Seifar *et al.*, 1997). Aipatutako ikerketa hori NAMEKC teknikaren garapenaren abiapuntutzat har daiteke. Geroago, J.-M. Lin eta bere lankideek, ideia horri jarraituz, 6 *p*-arilzetona kromatografikoki banatzea lortu zuten SDS eta K_2HPO_4 disoluzio elektrolitiko eta formamida disolbatzaile organikoa erabiliz (Lin *et al.*, 1999). Ikerlari horien beste ikerketa batean (Lin *et al.*, 2002), hiru surfaktante aztertzen dira NAMEKC teknika aplikatzeko —kasu horretan ere disolbatzaile formamida da—, baina, berriz ere SDS da emaitza eraginkorrek ematen dituen surfaktante bakarra. 1999an, metanol %70-100 disolbatzaileak erabiliz konposatu ez-ionikoen banaketa posible zela frogatu zen (Li eta Fritz, 1999) eta, ikerketa berean, adierazi zuten ingurune ez-akuosoan banaketa lortzeko mekanismoak bi

parametro dituela; alde batetik, analitoaren eta surfaktantearen arteko elkarrekintza eta, bestetik, ingurune elektroforetikokoaren konstante dielektrikoa/biskositatea erlazioa.

Dena den, azaldu den gisara, mizela egonkorak osatzeko kohesio-indar handiak dituzten disolbatzaileak behar dira, alegia, disolbatzaile anfiprotiko protofilikoak —formamida, N-metilformamida, N,N-dimetilformamida eta N,N-dimetilazetamida dira literaturan gehien aipatzen direnak eta eraginkorrenak direnak (Nozal *et al.*, 2006)—. Aipatzekoa da, bestalde, Gotti eta bere lankideek lortutako musketa nitroaromatikoen banaketa (Gotti *et al.*, 2005). Kasu horretan metanol:ur 85:15 nahastea erabili zuten, azido zitrikoa elektrolito moduan eta sodio taurodeoxikolato surfaktantea.

Aipatu diren ikerketek NAMEKC teknikaren garrantzia adierazten dute, eta garrantzitsua da kontuan hartzea NAMEKCe elektroforesi kapilarraren abantailak dituela (Su *et al.*, 2014), hala nola eraginkortasuna, zehaztasuna eta automatizazioa. Horretaz gainera, CE ekipoak HPLCkoak baino sinpleagoak dira erabilpenari dagokionez eta kontsumo txikiagoa du. Azkenik, kasu askotan muga bat izaten da analitoen ur-disolbagarritasun eskasa eta ezin izaten de elektroforesi kapilarra erabili, hortaz, NAMEKC metodoak garatzea bereziki interesgarria da konposatu oso hidrofoboak elektroforesi bidez banatu ahal izateko (Lopez-Gazpio *et al.*, 2012).

4.7. Resumen traducido: Electroforesis capilar

1. Desarrollo de las técnicas de electromigración

Como ya se ha mencionado en los capítulos anteriores, la electroforesis capilar, y las técnicas de electromigración en general, son ampliamente utilizadas en la cuantificación de todo tipo de compuestos. Una extensa y detallada revisión sobre las técnicas de electromigración puede ser consultada en la bibliografía (Lopez-Gazpio y Millán, 2013). El presente capítulo es un resumen de dicha referencia, adaptado a los objetivos de este texto.

El punto de partida sobre los estudios referentes a la electroforesis capilar puede considerarse el descubrimiento realizado por Ferdinand Friedrich Reuss a principios del siglo XIX (Righetti, 2009). En 1807, el mencionado profesor de la Universidad de Moscú utilizando un tubo en *U* de cuarzo, similar al mostrado en la figura 4.1., llevó a cabo dos experimentos con los que pudo demostrar la existencia del fenómeno electroforético y del flujo electroosmótico (Reuss, 1809).

A lo largo del siglo XIX, se produjeron una larga serie de experimentos a raíz de las investigaciones de Reuss, aunque la mayoría no fueron más que curiosidades científicas que requerían aún unos amplios estudios. Ya en la década de 1930, el bioquímico sueco Arne Tiselius desarrolló un equipo basado en el fenómeno electroforético con el cual podían llevarse a cabo separaciones de proteínas del suero y estableció los principios de la electroforesis. En 1948 Tiselius recibió el premio Nobel de Química por su contribución en este campo (Nobel Foundation, 2013).

Entre 1940 y 1950 las técnicas de electroforesis en soporte sólido experimentaron un gran auge, especialmente las desarrolladas para la separación de proteínas y otras biomoléculas. En 1950, Gordon y sus colaboradores utilizaron por primera vez un gel de agar como soporte para separaciones electroforéticas (Gordon *et al.*, 1950), y se establecieron las bases de una técnica que hoy en día sigue siendo muy utilizada en biología y bioquímica.

Por otro lado, hay que mencionar que uno de los grandes problemas de la electroforesis en soporte sólido es el calor generado por efecto Joule. Para que este calor puede ser disipado de forma más efectiva, es necesario reducir la relación área/volumen del sistema. La solución se encontró en 1967 con el desarrollo de sistemas cilíndricos (tubos), aunque los detectores disponibles en aquel entonces no permitían reducir excesivamente el diámetro de los cilindros. Stellan Hjertén utilizó un tubo de unos 3 mm de diámetro interior, gracias al cual pudo aplicar voltajes superiores a los que se utilizaban en los sistemas electroforéticos de soporte sólido (Hjertén, 1967). Este estudio se considera el inicio del desarrollo de la electroforesis capilar como técnica analítica.

En los años posteriores se fueron investigando las distintas posibilidades que ofrecía la nueva técnica, y se emplearon tubos de diámetros cada vez más pequeños (Hjertén, 1973; Virtanen, 1974; Mikkers *et al.*, 1979); aunque el desarrollo de la electroforesis capilar zonal (CZE, *Capillary Zone Electrophoresis*), se le debe a Jorgenson y Lukacs. En 1981, estos dos investigadores utilizaron por primera vez un capilar de diámetro inferior a 100 μm (es decir, verdaderamente *capilar*) para separar una mezcla de aminoácidos (Jorgenson y Lukacs, 1981a; Jorgenson y Lukacs, 1981b). La evolución de los diámetros de los capilares puede verse en la figura 4.4.

Pie de figura 4.4. (4.4. Irudia): Evolución de los diámetros internos de los capilares utilizados en electroforesis (representados a escala): Hjertén (3 mm, izq), Virtanen (500 μm , centro) y Jorgenson y Lukacs (75 μm , der.).

Otro de los hitos en el desarrollo de la electroforesis capilar fue el uso de micelas para la separación de compuestos neutros desarrollado por Terabe y sus colaboradores (Terabe *et al.*, 1984; Terabe *et al.*, 1985). Esta nueva variante fue denominada cromatografía electrocinética micelar (MEKC, *Micellar Electrokinetic Chromatography*) y supuso un gran avance ya que permitió poder separar compuestos neutros por vía electroforética.

A partir de 1990 la electroforesis capilar empezó a ser ampliamente utilizada en análisis químico y se desarrollaron una gran variedad de equipos comerciales (Shekon, 2011). Hoy en día la mayoría de fabricantes de cromatógrafos tienen en sus catálogos equipos de electroforesis capilar. Durante la última década, las técnicas basadas en la electromigración se han utilizado en campos muy diversos, como por ejemplo, la farmacología, análisis alimentario, cuantificación de contaminantes, control de calidad, proteómica, metabolómica genómica, entre otros (Ahuja, 2008; García-Campaña *et al.*, 2009; Leopold *et al.*, 2010; Zhong *et al.*, 2011; Haselberg *et al.*, 2011; Breadmore, 2013).

2. Fenómeno de electroforesis

Tal y como se ha mencionado, la electroforesis capilar es una técnica basada en la electromigración, que se sirve del efecto que provoca un campo eléctrico sobre una mezcla o disolución para conseguir la separación de ciertas moléculas. Los equipos disponibles actualmente aplican voltajes de hasta 30 kV y el diámetro interno de los capilares suele ser de entre 25 y 150 μm .

En lo referente al fenómeno de la electroforesis, si se toma una partícula de carga q (C), inmersa en un fluido sobre la que se aplica un campo eléctrico E (V m^{-1}), la fuerza eléctrica F_e (N) sobre la partícula está definida por la ecuación (4.1). De la misma manera, la disolución ejerce sobre la partícula una fuerza de fricción F_m

(N), determinada por la velocidad v_e (m/s) y f_t , conocido como coeficiente de fricción translacional (kg/s) (Ecuación 4.2).

En el caso de partículas esféricas el coeficiente f_t viene dado por la Ley de Stokes, que define dicho parámetro en función del radio de la partícula, R (m) y de la viscosidad del medio, η ($\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1}$) (Ecuación 4.3). En la práctica, este radio también se conoce como radio hidrodinámico aparente, definido como el radio equivalente en el caso de moléculas no esféricas (la mayoría) en base a la movilidad observada. Combinando las ecuaciones anteriores y aplicando la 2ª Ley de Newton sobre esta partícula se obtiene la ecuación (4.5).

Suponiendo que la velocidad inicial de la partícula es nula y la fuerza eléctrica constante, la partícula acelerará poniéndose en movimiento. Al aumentar la velocidad, la fuerza de fricción aumenta hasta alcanzar el estado estacionario en el que la aceleración sea nula y la velocidad constante (velocidad límite). En ese momento, que se alcanza en un lapso de tiempo despreciable en la práctica, se cumplirá la relación descrita en la ecuación (4.6). Despejando la velocidad se obtiene la ecuación (4.7).

Por otra parte, teniendo en cuenta que la movilidad electroforética μ_e ($\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$) es la definida en la ecuación (4.8), se pueden combinar ambas ecuaciones para lograr, finalmente la definición de la movilidad electroforética (Ecuación 4.9), parámetro esencial que rige las separaciones electroforéticas (Lopez-Gazpio y Millán, 2013).

3. Electroósmosis

El segundo fenómeno físico imprescindible para que se produzcan las separaciones por electromigración es la electroósmosis. Los capilares de sílice fundido utilizados tienen en sus paredes interiores grupos silanol (-SiOH), que tras una desprotonación son ionizados. Se estima que hay entre 4 y 5 grupos silanol ionizados por nanómetro cuadrado de capilar (Horvath y Dolník, 2001), grupos que pueden tener distintas configuraciones, mostradas en la figura 4.7. (Dandenau y Zerenner, 1990).

Pie de figura 4.7. (4.7. Irudia): Tipos de grupos silanol en la superficie de los capilares: (A) aislados, (B) geminales y (C) vecinales.

La carga inmóvil creada en la superficie del capilar atrae una nube de iones libres de carga opuesta creando una fina ($\sim 1-10$ nm en condiciones típicas de electroforesis) doble capa eléctrica. La capa inmóvil fuertemente adsorbida de cationes adyacente a la superficie negativa neutraliza parcialmente la carga negativa. El resto de carga negativa se neutraliza por el exceso de cationes solvatados y móviles que se encuentran en la parte difusa de la doble capa de la disolución próxima a la pared.

Con la presencia de un campo eléctrico externo E , los cationes en exceso en la parte difusa de la doble capa adquieren un momento neto en dirección al cátodo (polo negativo), que se transmite a las capas adyacentes del fluido por efecto de la viscosidad. Este fenómeno, llamado electroósmosis, hace que se cree un frente uniforme que se conoce como flujo electroosmótico (EOF, *ElectroOsmotic Flow*) en toda la disolución hacia el cátodo. Este efecto es el mismo que pudo observar Reuss en su experimento de 1807 (Reuss, 1809). El EOF suele tener una velocidad aproximada de 1 mm s^{-1} en las condiciones habituales empleadas en electroforesis capilar, aunque esa velocidad depende de una gran variedad de factores (Lopez-Gazpio y Millán, 2013).

3.1. Descripción de la doble capa eléctrica

La doble capa eléctrica formada en la zona próxima a la superficie interna del capilar puede ser descrita por varios modelos, aunque en adelante se utilizará el modelo Gouy-Chapman-Stern (Hunter, 1989). Este modelo define tres zonas en el entorno de la pared del capilar: 1) Capa de Stern, 2) Capa difusa y 3) electrolito libre (Hunter, 1989; Kirby y Hasselbrink, 2004). La Capa de Stern es la más cercana a la superficie del capilar, capa en la que los contraiones positivos están fuertemente unidos, formando una capa rígida. A continuación, se encuentra la capa difusa, en la cual la concentración de cationes es mayor a la de aniones. Es precisamente debido a esta capa difusa donde se forma el flujo electroosmótico, ya que en presencia de un campo eléctrico la capa difusa se desplaza hacia el electrodo de signo opuesto. El plano de la capa difusa donde se forma dicho desplazamiento se denomina plano de cizalla (SP, *Shear plane*) y el potencial eléctrico en ese plano es el potencial zeta (ζ , V) (Figura 4.8.). La disolución que se encuentra en la parte exterior del plano de cizalla, es la que se desplaza formando el EOF.

Pie de figura 4.8. (4.8. Irudia): Representación esquemática de la doble capa eléctrica. Kapilarraren gainazala: Superficie del capilar; Stern geruza: Capa de Stern; Geruza Lausoa: Capa difusa; Elektrolito askea: Electrolito libre; Kanpoko Helmholtz Planoa: Plano Exterior de Helmholtz; Zizaila Planoa: Plano de Cizalla; Potentzial-elektrika: Potencial eléctrico.

Por otra parte, la velocidad del flujo electroosmótico está definida por la ecuación (4.10), ecuación cuya obtención está descrita detalladamente en la bibliografía (Lopez-Gazpio y Millán, 2013). Dicha ecuación es la denominada Helmholtz-Smoluchowski, en honor a las aportaciones que Hermann von Helmholtz (Helmholtz, 1879) y Marian von Smoluchowski (Smoluchowski, 1903) hicieron en este campo. Teniendo en cuenta que la movilidad electroosmótica es la proporcionalidad entre la velocidad y el campo eléctrico, se obtiene la ecuación (4.11), que define la movilidad electroosmótica (Ecuación 4.12). Cabe destacar que

esta ecuación sólo se cumple cuando la doble capa eléctrica cumple ciertas condiciones. Para los casos en los que dichas condiciones no se cumplen, se han definido ecuaciones más complejas (Ghosal, 2004), la ecuación (4.12) es la aceptada por la IUPAC como definición de la movilidad electroosmótica (Riekkola *et al.*, 2014).

3.2. Perfil de velocidad del flujo electroosmótico

La velocidad del EOF a lo largo del diámetro del capilar está descrita por la ecuación (4.13), que también puede plantearse en función de la movilidad electroosmótica (4.14) o de la densidad de carga de la superficie del capilar (4.15). Teniendo en cuenta que la densidad de carga de los capilares es aproximadamente de $0,01 \text{ C m}^{-2}$ (Churaev *et al.*, 1981), y dando al resto de parámetros los valores aproximados descritos en la bibliografía (Grossman y Colburn, 1992), puede demostrarse que aproximadamente a 14 nm de la pared del capilar se obtiene el 99% de la velocidad máxima del EOF. Es decir, en un capilar de $50 \mu\text{m}$ de diámetro interno, se cumple $v_z(x) = v_\infty = v_{EOF}$ en el 99,95% del diámetro. Esto tiene una implicación esencial en la alta resolución de las separaciones electroforéticas, ya que puede considerarse que el flujo es plano, a diferencia de lo que ocurre en otras técnicas cromatográficas (Figura 4.9).

Pie de figura 4.9. (4.9. Irudia): A: Perfil de velocidad del flujo electroosmótico y B: perfil parabólico correspondiente al flujo hidrodinámico.

4. Instrumentación

Los equipos actuales de electroforesis capilar cuentan con un alto grado de automatización y disponen también de sistemas fiables de seguridad (Poole, 2003), a diferencia de los primeros equipos que se desarrollaron. En la figura 4.10. puede verse el esquema general de un equipo de electroforesis capilar.

Pie de figura 4.10. (4.10. Irudia): Esquema de un equipo de electroforesis capilar: 1) ordenador para controlar el equipo, 2) muestra inyectada en el capilar, 3) detector, 4) inlet o entrada, 5) outlet o salida, 6) electrodo de entrada inmerso en el vial que contiene BGE, 7) electrodo de salida entrada inmerso en el vial que contiene BGE y, 8) fuente de alto voltaje.

Cuando se emplea una técnica de electromigración, el primer paso es colocar el capilar en el casete que se introduce a continuación en el equipo. Cada uno de los extremos del capilar queda situado en el correspondiente electrodo, y sumergido en un vial con disolución reguladora electrolítica (BGE, *Background Electrolyte*). Como se ha mencionado, habitualmente el flujo electroosmótico se desplaza del electrodo

positivo al negativo; si bien, también es posible aplicar polaridad inversa. Posteriormente, se inyecta la muestra y, una vez el circuito está cerrado, se aplica la diferencia de potencial deseada para que se produzca la separación de los analitos según su movilidad electroforética. Los analitos darán su señal correspondiente en el detector, que se sitúa antes del electrodo de salida, con lo que el ordenador registrará el electroferograma relativo a dicha muestra. En la figura 4.11. se muestran unos ejemplos de electroferogramas de muestras de patrones de ácidos orgánicos (Schober *et al.*, 2009).

*Pie de figura 4.11. (4.11. Irudia): Algunos electroferogramas obtenidos en un método para controlar la producción de ácido láctico en la fermentación del sorgo (Sorghum sp.). En la figura pueden verse inyecciones correspondientes a patrones de ácidos orgánicos. Condiciones electroforéticas: disolución reguladora de fosfato 0,5 M (pH 6,25) y surfactante micelar bromuro de cetiltrimetilamonio 0,5 mM (Schober *et al.*, 2009).*

4.1. Fuente de alto voltaje

La fuente de alto voltaje permite aplicar diferencias de potencial de hasta 30 kV con un control del voltaje de $\pm 0,1\%$, gracias al cual pueden mantenerse constantes los tiempos de migración. La fuente de alto voltaje está conectada a los dos electrodos del sistema y permite trabajar en voltaje, corriente o potencia constante, que dependerá del tipo de técnica que se vaya a utilizar. Generalmente se trabaja en voltaje constante. Otra posibilidad que permiten los equipos actuales es aplicar gradientes de voltaje, de manera similar a los gradientes de temperatura o de polaridad de disolventes en GC y LC, respectivamente (Felhofer *et al.*, 2010).

4.2. Capilares

Los capilares más comunes son de sílice fundida, ya que es un material químicamente y eléctricamente estable, relativamente duro, flexible y barato (Buszewski *et al.*, 2010), aunque también existen otros materiales, como por ejemplo el vidrio pyrex o el teflón. En el caso de los capilares de sílice, tienen un recubrimiento de poliimida de 15 μm para darle una mayor robustez. Los capilares más habituales son de entre 50 y 100 cm de largo y su diámetro interno está en el rango 25-100 μm .

En la posición del detector o celda de detección, a los capilares se les retira el recubrimiento de poliimida para que los analitos puedan ser detectados. Además de ello, algunos capilares disponen de burbujas (*bubble-cell*) o caminos en Z (*z-cell*) con el fin de aumentar el camino óptico (Figura 4.12.).

Pie de figura 4.12. (4.12. Irudia): Tipos de celdas de detección: A) con forma de burbuja y B) con forma de Z.

4.3. Sistemas de inyección

La cantidad de muestra inyectada en electroforesis capilar está entre 1 y 50 nL, dependiendo del diámetro interno del capilar y ocupan, dependiendo del capilar, el 1-2% de la longitud total del capilar. Debido a los pequeños volúmenes utilizados es preciso disponer de sistemas de inyección extremadamente precisos, ya que pequeñas variaciones pueden provocar grandes errores. Por otro lado, estas fluctuaciones en el volumen inyectado pueden evitarse de modo notable utilizando un patrón interno como referencia. Los tipos de inyección más comunes son la inyección hidrodinámica y la inyección electrocinética (Mayer, 2001; Poole, 2003).

La inyección hidrodinámica es la más utilizada, y se consigue aplicando presión (25-100 mbar) durante un corto periodo de tiempo (0,5-5 s). Para obtener precisiones óptimas, se suelen emplear tiempos de inyecciones superiores a 1-2 segundos y también es habitual el uso de patrones internos para mejorar la reproducibilidad de la inyección. En condiciones óptimas, se pueden obtener valores del 1-2% de RSD (*Relative Standard Deviation*)

La segunda opción más común para introducir la muestra es la inyección electrocinética. En este caso, el vial de muestra reemplaza al vial de la disolución de separación en el extremo de inyección del capilar y a continuación se aplica una diferencia de potencial en el capilar (entre 3 y 5 veces menor que la empleada en la separación) durante 10-30 segundos, haciendo que los analitos se introduzcan en el capilar por el efecto conjunto de la migración y del flujo electroosmótico. Una propiedad de la inyección electrocinética que hay que tener en cuenta es que la cantidad de cada analito inyectada depende de su movilidad electroforética. Aunque esta más limitada en cuanto a aspectos cuantitativos, puede ser útil en casos en los que las disoluciones sean muy viscosas (Quirino, 2013).

4.4. Sistemas de detección

Los sistemas de detección que se acoplan a equipos de electroforesis capilar deben ser sensibles a pequeñas cantidades de muestra y compatibles con las dimensiones físicas del capilar, aún en detrimento de otras cualidades. Hasta ahora, se han adaptado gran variedad de técnicas de detección a la electroforesis capilar con diferente éxito, entre las que destacan las técnicas ópticas (p. ej.: absorción UV-Visible, fluorescencia, fosforescencia, quimioluminiscencia, infrarrojo, resonancia magnética nuclear, índice de refracción), técnicas electroquímicas (p. ej.: conductimetría, potenciometría, amperometría) y otras técnicas como la espectrometría de masas o la radiometría. Un estudio detallado sobre los pros y contras de cada tipo de detección, así como sus límites de detección puede

consultarse en la bibliografía (Fernández Gutiérrez y Segura Carretero, 2005; Lopez-Gazpio y Millán, 2013). En la tabla 4.2. se resumen los principales sistemas de detección así como sus límites de detección.

Encabezado de tabla 4.2. (4.2. Taula): Sistemas de detección utilizados en electroforesis capilar y sus límites de detección (Swinney y Bornhop, 2000; Fernández Gutiérrez et al., 2005). Detekzio-sistema: Sistema de detección; Detekzio muga: Límite de detección; Zuzena: Directa; Ez-zuzena: Indirecta; Laserrez induzitutako fluoreszentzia: Fluorescencia inducida por láser; Eroankortasuna: Conductividad; Potentziometria: Potenciometría; Amperometria: Amperometría; Masa-espektrometria: Espectrometría de masas.

5. Calidad de las separaciones

Las separaciones por electromigración se producen debido a las distintas movilidades de los analitos. Al aplicar un campo eléctrico, la mezcla de compuestos se separa y se forman ciertas zonas separadas de cada analito, también denominadas bandas. Para evaluar si dos compuestos dados se separarán se han de conocer tanto sus tiempos de migración como las anchuras de las bandas.

La anchura de la banda correspondiente a cada analito depende de varios procesos, denominados *band broadening mechanisms* o mecanismos de ensanchamiento de banda. Entre estos mecanismos, caben destacar 1) los gradientes de temperatura generados a consecuencia del efecto Joule (Cifuentes *et al.*, 1995), 2) la difusión longitudinal, 3) la inyección de la muestra, 4) la interacción entre el analito y la pared interna del capilar, 5) la detección y 6) la electrodispersión, entre otros (Culberston *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2003; Kanoatov *et al.*, 2012). La varianza debida al ensanchamiento total de la banda puede describirse según la ecuación (4.18) teniendo en cuenta todos los efectos.

6. Tipos de técnicas de electromigración

Existe una amplia gama de variantes de técnicas de electromigración (Lopez-Gazpio y Millán, 2013), algunas de las cuales serán tratadas a continuación. En la tabla 4.3. se recoge un breve resumen de las principales variantes, mencionado el aspecto fundamental de la separación en cada caso.

6.1. Electroforesis capilar zonal (CZE)

La electroforesis capilar zonal (CZE, *Capillary Zone Electrophoresis*) es la más simple de las técnicas de electroforesis capilar y se basa únicamente en los dos fenómenos mencionados anteriormente: electroforesis y electroósmosis. Desde un punto de vista práctico, si el flujo electroosmótico es lo suficientemente elevado

pueden separarse y detectarse de forma simultánea cationes y aniones. El flujo electroosmótico afecta por igual a todas las moléculas presentes en la muestra y hará que la disolución se desplace del ánodo al cátodo, es decir, del electrodo positivo al negativo, mientras que la movilidad electroforética es característica de cada compuestos (si tiene carga), por lo que los iones se separarán (Figura 4.14).

Pie de figura 4.14. (4.14. Irudia): El flujo electroosmótico afecta a todas las moléculas presentes en la muestra, desplazándolas hacia el detector, como si fuera una escalera mecánica. Esta analogía fue propuesta por los investigadores Vetter y McGowan (Vetter y McGowan, 2001).

Tabla 4.3. Resumen de las técnicas de electromigración (Poole, 2003; Buszewski *et al.*, 2013).

Técnica	Fundamento de la separación	Aplicaciones más importantes
CZE / NACE	Relación carga/tamaño	Iones y compuestos ionizables
MEKC / NAMEKC	Interacción con las micelas	Compuestos neutros y cargados
CEC ^a	Interacción con la fase estacionaria	Compuestos neutros y cargados
CIEF ^b	Punto isoeléctrico	Proteínas y compuestos zwitteriónicos
CITP ^c	Movilidad de los iones en forma de <i>sandwich</i>	Preconcentración de iones
CGE ^d	Carga y tamaño (pero no su relación)	Macromoléculas biológicas, DNA, proteínas

^aCapillary electrochromatography, *Electrocromatografía capilar*.

^bCapillary isoelectric focusing, *Enfoque isoeléctrico capilar*.

^cCapillary isotachopheresis, *Isotacoforesis capilar*.

^dCapillary gel electrophoresis, *Electroforesis capilar en gel*

^{a,b,c,d}Más información sobre estas técnicas en la bibliografía (Lopez-Gazpio y Millán, 2013)

La movilidad aparente (Ecuación 4.19) es la suma de estos dos efectos, y lo mismo puede plantearse para la velocidad aparente (Ecuación 4.20). En el caso de los cationes, la movilidad aparente se *suma*, con lo cual son más veloces que el EOF. Los aniones, sin embargo, tienen movilidad electroforética negativa, por lo que las dos contribuciones se *restan* y son más lentos que el EOF. Por tanto, los cationes son los primeros compuestos de la muestra en llegar al detector, después llega el EOF y finalmente los aniones. Nótese que los compuestos neutros, al no tener movilidad electroforética llegan junto con el EOF sin separarse.

En CZE (y también en el resto de técnicas de electromigración) uno de los parámetros más importantes es el tiempo de migración (t_m , s), que no debe confundirse con el tiempo de retención utilizado en cromatografía. El tiempo de migración es el tiempo necesario para que un compuesto llegue al detector y está relacionado con su velocidad total (v_T , m s⁻¹) y, obviamente, con la distancia hasta el detector (L_D , m) según la ecuación básica (4.21) (Poole, 2003; Buszewski *et al.*, 2013). Sustituyendo la movilidad por la velocidad, se obtiene la ecuación (4.22) donde E (V m⁻¹) es el campo eléctrico. Finalmente, se puede obtener la ecuación (4.24), donde L_T es la longitud total del capilar (m) y V la diferencia de potencial (volt).

Esta ecuación es probablemente la más importante de las descritas hasta ahora, ya que es la que rige las separaciones electroforéticas. Finalmente, añadiendo a dicha ecuación la contribución electroosmótica (Ecuación 4.25) (que puede obtenerse de manera análoga) se obtiene la ecuación (4.26), esencial para entender el fundamento de las separaciones electroforéticas.

$$\mu_e = \mu_T - \mu_{EOF} = \frac{L_D L_T}{t_m V} - \frac{L_D L_T}{t_{EOF} V} = \frac{L_D L_T}{V} \left(\frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_{EOF}} \right) \quad (4.26)$$

6.2. Cromatografía electrocinética micelar (MEKC)

La cromatografía electrocinética micelar (MEKC, *Micellar Electrokinetic Chromatography*) no se basa únicamente en la movilidad electroforética para conseguir separaciones, sino que incorpora aditivos (surfactantes) cuyas interacciones con los analitos tienen un papel crucial. La MEKC comparte con la electroforesis capilar la separación de partículas cargadas en función de la distinta migración electroforética que experimentan al ser sometidas a un campo eléctrico. No obstante, la separación de moléculas no cargadas no sería posible si esta fuera la única fuerza que produjera la separación.

Es por ello que la MEKC incorpora un agente micelar o surfactante a la disolución de separación. Si este agente micelar está en concentración suficiente, superior a la concentración crítica micelar (CMC, *Critic Micelle Concentration*), se forman agregados esféricos denominados micelas. Estas micelas forman una segunda fase en el medio, haciendo que los solutos se distribuyan de manera diferente entre las dos fases, es decir, entre la fase micelar y la disolución tampón. La interacción entre los analitos y la fase micelar es precisamente la que permite la separación de moléculas sin carga. En sentido cromatográfico, la fase micelar puede considerarse una *fase estacionaria en movimiento*, descrita en la bibliografía como fase *pseudoestacionaria*. Es por ello que la MEKC se considera una técnica a caballo entre la electroforesis capilar y la cromatografía de líquidos. Según las

recomendaciones de la IUPAC (Riekkola *et al.*, 2004) las características de la cromatografía electrocinética micelar no serían *totalmente compatibles* con la definición de la cromatografía, que establece que una de las dos fases sea estacionaria.

El surfactante más habitual es el dodecilsulfato de sodio (SDS), que forma micelas de carga negativa. Uno de los aspectos más interesantes de la MEKC es el tipo de interacciones que se pueden dar entre las moléculas y la fase micelar. Fundamentalmente existen tres tipos de interacciones: 1) incorporación del analito en el interior de la micela, 2) adsorción en la superficie micelar, y 3) incorporación en el agregado como cosurfactante (Figura 4.15.). El tipo de interacción depende en gran medida tanto de la hidrofobicidad de cada analito como de su tamaño, y esta interacción es, precisamente, la que rige el proceso de separación.

Las micelas inyectadas con la muestra llegan al detector en un tiempo t_{mc} , que es mayor que t_{EOF} , ya que las micelas migran a contracorriente al estar cargadas negativamente. Si una molécula neutra alcanza el equilibrio entre la disolución libre y la micela por vía de las interacciones mencionadas, su tiempo de migración aumenta, porque migra en parte a la velocidad inferior que tiene la micela. Por tanto, las moléculas neutras llegarán al detector en un tiempo de migración entre t_{EOF} y t_{mc} . En la figura 4.16. puede verse claramente la separación por MEKC de compuestos neutros, que como tales no pueden separarse por CZE.

El grado de interacción con las micelas queda definido por el factor de retención (o factor capacidad), k' , descrito en la ecuación 4.28, que es similar al definido para las separaciones cromatográficas por GC o LC (Ecuación 4.27). Por tanto, si la fase micelar estuviera inmovilizada, de manera análoga a la cromatografía, el tiempo de migración sería infinito con lo que el factor capacidad sería exactamente el mismo que en el caso de la cromatografía. t_{EOF} y t_{mc} se pueden determinar utilizando los marcadores adecuados. El tratamiento teórico de la separación resulta ahora más complejo que en electroforesis capilar zonal. Además de la movilidad electroforética y la movilidad electroosmótica (definidas anteriormente) también hay que considerar la movilidad electroforética de las micelas (μ_{mc} , $m^2 V^{-1} s^{-1}$) y su velocidad (v_{mc} , $m s^{-1}$), obteniendo finalmente la ecuación (4.30), que incluye los tres factores (Ferguson *et al.*, 1998).

Por último, otro parámetro a tener en cuenta si se quiere optimizar al máximo el proceso de separación es el uso de aditivos. Los aditivos son muy comunes en cualquiera de las variantes de la electroforesis y su función puede ser muy diversa, aunque a grandes rasgos se puede decir que su función principal es la modificación del equilibrio de distribución entre la disolución tampón y la fase micelar (Poole, 2003). La efectividad, medida en platos teóricos, de las separaciones MEKC suele ser superior a 200.000, por lo que son altamente eficaces (Perrett, 2010). Finalmente, cabe recomendar la lectura de las revisiones sobre MEKC de M. Silva para profundizar en los últimos avances que ha experimentado la técnica (Silva, 2007; Silva, 2009; Silva, 2011; Silva, 2013).

6.3. Electroforesis capilar no acuosa (NACE)

En las técnicas clásicas de electromigración los disolventes acuosos o hidroorgánicos son los más utilizados. Sin embargo, también es posible conseguir separaciones electroforéticas en medios no acuosos por medio de la electroforesis capilar no acuosa (NACE, *NonAqueous Capillary Electrophoresis*). La primera aplicación NACE fue descrita en 1984 (Walbroehl *et al.*, 1984), en la que se utilizó acetonitrilo como medio orgánico. A pesar de que en un principio los límites de la instrumentación de la época fueron un límite importante para el desarrollo de la electroforesis capilar no acuosa, a partir de mediados de la década de los 90 el número de publicaciones relacionadas con NACE aumentó de manera considerable (Szumski y Buszewski, 2013). Entre sus ventajas destacan: 1) mayor selectividad, 2) posibilidad de separar compuestos insolubles en agua, 3) poder aplicar CE a mayor escala, 4) uso de interacciones polares, 5) mejora de la efectividad (más platos teóricos), 6) reducción de los efectos perjudiciales del efecto Joule y por tanto poder aplicar mayores voltajes y 7) aumento de la fluorescencia (interesante si esta es la técnica de detección) (Szumski y Buszewski, 2013; Kenndler, 2014).

Los disolventes orgánicos más utilizados pertenecen a distintos grupos de disolventes, que pueden ser anfipróticos neutros (metanol, glicerol), anfipróticos protogénicos (ácido acético, ácido fórmico), anfipróticos protofílicos (formamida, N-metilacetamida, N-metilformamida), apróticos neutros (dimetilsulfóxido, tetrahidrofurano), apróticos dipolares protogénicos (acetonitrilo, acetona), o apróticos dipolares protofílicos (benceno, tetracloruro de carbono). Destaca especialmente el uso del metanol, acetonitrilo y formamida en aplicaciones NACE.

6.4. Cromatografía electrocinética micelar no acuosa (NAMEKC)

En cuanto a la electroforesis capilar en medios micelares, MEKC, también hay bibliografía en medios no acuosos. El uso de micelas en disolventes orgánicos (NAMEKC, *NonAqueous Micellar Electrokinetic Chromatography*) es un tema no demasiado estudiado en la bibliografía por ser relativamente reciente, se sabe que los surfactantes aniónicos carboxílicos son capaces de formar agregados neutros en medios orgánicos (Felhofer *et al.*, 2013). R.M. Seifar y colaboradores separaron compuestos hidrófobos con SDS como surfactante en mezclas de acetonitrilo-agua, demostrando que incluso a altas concentraciones de acetonitrilo se forman pseudo-micelas de surfactante capaces de separar compuestos neutros según su afinidad con estas estructuras (Seifar *et al.*, 1997). Este trabajo puede considerarse el punto de partida del desarrollo de NA-MEKC. Posteriormente J.-M. Lin y colaboradores separaron por esta técnica 6 p-arilacetofenonas utilizando SDS en formamida y K_2HPO_4 como electrolito (Lin *et al.*, 1999). Otro estudio de los mismos autores compara tres surfactantes aniónicos en formamida para separar compuestos

hidrófobos, y concluyen que SDS es el surfactante más adecuado en este tipo de medio (Lin *et al.*, 2002). J. Li y J.S. Fritz mostraron que la separación de compuestos no iónicos también es posible en mezclas que contienen entre 70-100% de metanol utilizando surfactantes aniónicos como electrolito. También afirmaron que la separación en medios no acuosos se produce por una parte por la interacción entre los analitos y el surfactante y por otra parte por la relación constante dieléctrica/viscosidad del medio electroforético (Li y Fritz, 1999). No obstante, la formación de micelas relativamente estables sólo se produce en disolventes con fuerzas de cohesión relativamente altas, como es el caso de disolventes anfipróticos profílicos (formamida, N-metilformamida, N,N-dimetilformamida, N,N-dimetilacetamida), hecho confirmado por estudios más recientes (Nozal *et al.*, 2006). Destaca también la separación de compuestos nitroaromáticos de almizcle por R. Gotti y colaboradores utilizando una mezcla metanol-agua 85:15, ácido cítrico como electrolito y taurodeoxicolato de sodio como surfactante (Gotti *et al.*, 2005). En este caso con SDS no es posible alcanzar la selectividad deseada.

Las investigaciones a las que se ha hecho referencia ponen de manifiesto la utilidad de la técnica NAMEKC, que ofrece las ventajas de la electroforesis capilar (Su *et al.*, 2014); entre las que destacan la mayor eficiencia, precisión y automatización. Además, es una técnica más sencilla de utilizar y supone un coste menor tanto en mantenimiento como en consumo de disolventes. Finalmente cabe destacar que, en ocasiones, la escasa solubilidad en agua de muchos analitos es un problema insalvable en cuanto a poder cuantificarlos por electroforesis capilar. El desarrollo de métodos NAMEKC está especialmente indicado para estos casos, ya que amplía la aplicabilidad de la electroforesis capilar para la cuantificación de sustancias extremadamente hidrófobas.

4.8. Erreferentziak / Referencias

Ahuja, S.: *Overview of Capillary Electrophoresis in Pharmaceutical Analysis*. In Ahuja, S.; Jimidar, M.I.: *Capillary Electrophoresis Methods for Pharmaceutical Analysis*, Academic Press, San Diego, 2008, 1-8.

Álvarez Llamas, G.; Fernández de la Campa, M. del R.; Blanco González, E.; Medel Sanz, A.: *La Espectrometría de Masas con Fuente de Plasma Acoplado por Inducción como Técnica de Detección en Electroforesis Capilar*. In Fernández Gutiérrez, A.; Segura Carretero, A.: *Electroforesis Capilar: Aproximación según la Técnica de Detección*, Editorial Universidad de Granada, Granada, 2005, 439-461.

Baldwin, R.P.: *Recent Advances in Capillary Electrophoresis*, *Electrophoresis*, 21, 4017-4028, 2000.

Baker, D.R.: *Capillary Electrophoresis Techniques in Analytical Chemistry*, Wiley, New York, 1995.

Belder, D.; Elke, K.; Husmann, H.: *Influence of pH*-value of Methanolic Electrolytes on Electroosmotic Flow in Hydrophilic Coated Capillaries*, *Journal of Chromatography A*, 868, 63-71, 2000.

Bowser, M.T.; Kranack, A.R.; Chen, D.D.Y.: *Analyte-Additive Interactions in Nonaqueous Capillary Electrophoresis: A Critical Review*, *Trends in Analytical Chemistry*, 17, 424-434, 1998.

Breadmore, M.C.: *Approaches to Enhancing the Sensitivity of Carbohydrate Separations in Capillary Electrophoresis*, *Methods in Molecular Biology*, 984, 27-43, 2013.

Brechtel, R.; Hohmann, W.; Rüdiger, H.; Wätzig, H.: *Control of the Electroosmotic Flow by Metal-Salt-Containing Buffers*, *Journal of Chromatography A*, 716, 97-105, 1995.

Buszewski, B.; Dziubakiewicz, E.; Szumski, M.: *Electromigration Techniques: Theory and Practice*, Springer, Heidelberg, 2013.

Caslavska, J.; Thormann, W.: *Stereoselective Determination of Drugs and Metabolites in Body Fluids, Tissues and Microsomal Preparations by Capillary Electrophoresis (2000-2010)*, *Journal of Chromatography A*, 1218, 588-601, 2011.

Churaev, N.V.; Sergeeva, I.P.; Sobolev, V.D.; Derjaguin, B.V.: *Examination of the Surface of Quartz Capillaries by Electrokinetic Methods*, Journal of Colloid and Interface Science, 84, 451-460, 1981.

Cifuentes, A.; Xu, X.; Kok, W.Th.; Poppe, H.: *Optimum Conditions for Preparative Operation of Capillary Zone Electrophoresis*, Journal of Chromatography A, 716, 141-156, 1995.

Culberston, C.T.; Jacobson, S.C.; Ramsey, J.M.: *Diffusion Coefficient Measurements in Microfluidic Devices*, Talanta, 56, 365-373, 2002.

Dandenau, R.D.; Zerenner, E.H.: *The Invention of the Fused-Silica Column: An Industrial Perspective*, LC/GC, 8, 908-912, 1990.

Deshiikan, S.R.; Papadopoulos, K.D.: *Modified Booth Equation for the Calculation of Zeta Potential*, Colloid and Polymer Science, 276, 117-124, 1998.

Elhamili, A.; Wetterhall, M.; Puerta, A.; Westerlund, D.; Bergquist, J.: *The Effect of Sample Salt Additives on Capillary Electrophoresis Analysis of Intact Proteins Using Surface Modified Capillaries*, Journal of Chromatography A, 1216, 3613-3620, 2009.

Etxebarria, J.R.: *Fisika Orokorra*, Udako Euskal Unibertsitatea, Bilbo, 2003.

Felhofer, J.L.; Chumbimuni-Torres, K.Y.; Mora, M.F.; Haby, G.G.; García, C.D.: *Critical Evaluation of the Use of Surfactants in Capillary Electrophoresis*. In García, C.D.; Chumbimuni-Torres, K.Y.; Carrilho, E.: *Capillary Electrophoresis and Microchip Capillary Electrophoresis, Principles, Applications, and Limitations*, Wiley, Hoboken, 2013.

Felhofer, J.L.; Blanes, L.; García, C.D.: *Recent Developments in Instrumentation for Capillary Electrophoresis and Microchip-Capillary Electrophoresis*, Electrophoresis, 31, 2469-2486, 2010.

Ferguson, P.D.; Goodall, D.M.; Loran, J.S.: *Systematic Approach to Links between MEKC and Reversed-Phase HPLC*, Analytical Chemistry, 70, 4054-4062, 1998.

Fernández Gutiérrez, A.; Segura Carretero, A.: *Electroforesis Capilar: Aproximación según la Técnica de Detección*, Editorial Universidad de Granada, Granada, 2005.

Fernández Gutiérrez, A.; Segura Carretero, A.; Carrasco Pancorbo, A.: *Fundamentos Teóricos y Técnicas de Separación*. In Fernández Gutiérrez, A.; Segura Carretero, A.: *Electroforesis Capilar: Aproximación según la Técnica de Detección*, Editorial Universidad de Granada, Granada, 2005, 11-54.

Foret, F.: *Capillary Electrophoresis of Small Ions Using Complex Formation and Indirect Detection*, *Electrophoresis*, 30(S1), S34-S39, 2009.

García-Campaña, A.M.; Gámiz-Gracia, L.; Lara, F.J.; Iruela, M. del O.; Cruces-Blanco, C.: *Applications of Capillary Electrophoresis to the Determination of Antibiotics in Food and Environmental Samples*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395, 967-986, 2009.

Ghosal, S.: *Fluid Mechanics of Electroosmotic Flow and its Effect on Band Broadening in Capillary Electrophoresis*, *Electrophoresis*, 25, 214-228, 2004.

Ghosh, A.; Dey Dr, J.: *Enantiomeric Separations of Binaphthyl Derivatives by Capillary Electrophoresis Using N-(2-hydroxydodecyl)-L-threonine as Chiral Selector: Effect of Organic Additives*, *Electrophoresis*, 29, 1540-1547, 2008.

Gordon, A.H.; Keil, B.; Sebasta, K.; Knessl, O.; Sorm, F.: *Electrophoresis of Proteins in Agar Jelly*, *Collections of Czechoslovak Chemical Communications*, 15, 1-16, 1950.

Gotti, R.; Fiori, J.; Mancini, F.; Cavrini, V.: *Analysis of Neutral Nitromusks in Incenses by Capillary Electrophoresis in Organic Solvents and Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, *Electrophoresis*, 26, 3325-3332, 2005.

Grossman, P.J.; Colburn, J.C.: *Capillary Electrophoresis, Theory and Practice*, Academic Press, San Diego, 1992.

Guillo, C.; Barlow, D.; Perrett, D.; Hanna-Brown, M.: *Micellar Electrokinetic Chromatography and Data Alignment Analysis: A New Tool in Urine Profiling*, *Journal of Chromatography A*, 1027, 203-212, 2004.

Haselberg, R.; De Jong, G.; Somsen, G.W.: *Capillary Electrophoresis – Mass Spectrometry for the Analysis of Intact Proteins: 2007-2010*, *Electrophoresis*, 32, 66-82, 2011.

Helmholtz, H. von: *Studien über Elektrische Grenzschichten*, *Annalen der Physik und Chemie*, 243, 337-382, 1879.

Hjertén, S.: *Free Zone Electrophoresis*, Chromatographic Reviews, 9, 122-143, 147-219, 1967. Ph.D. thesis.

Hjertén, S.: *Dedication to Professor Arne Tiselius*, Annals of the New York Academy of Sciences, 209, 5-7, 1973.

Horvath, J.; Dolník, V.: *Polymer Wall Coating for Capillary Electrophoresis*, Electrophoresis, 22, 644-655, 2001.

Horwitz, W.: *The Theory of Electrokinetic Phenomena*, Journal of Chemical Education, 16, 519-535, 1939.

Hunter, R.J.: *Zeta Potential in Colloid Science: Principles and Application*, Academic Press, London, 1981.

Hunter, R.J.: *Foundations of Colloid Science*, Vol. 2, Clarendon Press, Oxford, 1989.

Hunter, R.J.: *The Significance of Stagnant Layer Conduction in Electrokinetics*, Advances in Colloid and Interface Sciences, 100, 153-167, 2003.

Hutterer, K.M.; Jorgenson, J.W.: *Ultrahigh-Voltage Capillary Zone Electrophoresis*, Analytical Chemistry, 71, 1293-1297, 1999.

Jorgenson, J.W.; Lukacs, K.D.: *Zone Electrophoresis in Open-Tubular Glass Capillaries: Preliminary Data on Performance*, Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications, 4, 230-231, 1981a.

Jorgenson, J.W.; Lukacs, K.D.: *Zone Electrophoresis in Open-Tubular Glass Capillaries*, Analytical Chemistry, 53, 1298-1302, 1981b.

Kanoatov, M.; Retif, C.; Cherney, L.T.; Krylov, S.N.: *Peak-Shape Correction to Symmetry for Pressure-Driven Sample Injection in Capillary Electrophoresis*, Analytical Chemistry, 84, 149-154, 2012.

Kenndler, E.: *A Critical Overview of Non-Aqueous Capillary Electrophoresis. Part I: Mobility and Separation Selectivity*, Journal of Chromatography A, 1335, 16-30, 2014.

Kirby, B.J.; Hasselbrink, J.E.F.: *Zeta Potential of Microfluidic Substrates: 1. Theory, Experimental Techniques, and Effects on Separations*, Electrophoresis, 25, 187-202, 2004.

Klobusitzky, D.; König, P.: *Biochemische Studien über die Gifte der Schlangengattung Bothrops*, Naunyn-Schmiedebergs Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie, 192, 271-275, 1939.

Kolthoff, I.M.: *Acid-Base Equilibriums in Dipolar Aprotic Solvents*. Analytical Chemistry, 46, 1992-2003, 1974.

Lamalle, C.; Servais, A.-C.; Fradi, I.; Crommen, J.; Fillet, M.: *Micellar Electrokinetic Chromatography Systems for the Separation of Mixtures of Charged and Uncharged Compounds*, Journal of Separation Science, 35, 1933-1939, 2012.

Lee, Y.-H.; Maus, R.G.; Smith, B.W.; Winefordner, J.D.: *Laser-Induced-Fluorescence Detection of a Single Molecule in a Capillary*, Analytical Chemistry, 66, 4142-4149, 1994.

Leopold, K.; Foulkes, M.; Worsfold, P.: *Methods for the Determination and Speciation of Mercury in Natural Waters – A Review*, Analytica Chimica Acta, 663, 127-138, 2010.

Li, J.; Fritz, J.S.: *Nonaqueous Media for Separation of Nonionic Compounds by Capillary Electrophoresis*, Electrophoresis, 20, 84-91, 1999.

Lin, J.-M.; Nakagawa, M.; Uchiyama, K; Hobo, T.: *Determination of Critical Micelle Concentration of SDS in Formamide by Capillary Electrophoresis*, Chromatographia, 50, 739-744, 1999.

Lin, J.-M.; Nakagawa, M.; Uchiyama, K; Hobo, T.: *Comparison of Three Different Anionic Surfactants for the Separation of Hydrophobic Compounds by Non-Aqueous Capillary Electrophoresis*, Electrophoresis, 23, 421-425, 2002.

Liu, B.-F.; Hisamoto, H.; Terabe, S.: *Subsecond Separation of Cellular Flavin Coenzymes by Microchip Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence Detection*, Journal of Chromatography A, 1021, 201-207, 2003.

Lopez-Gazpio, J.; Garcia-Arrona, R.; Ostra, M.; Millán, E.: *Optimization and Validation of a Nonaqueous Micellar Electrokinetic Chromatography Method for Determination of Polycyclic Musks in Perfumes*, Journal of Separation Science, 35, 1344-1350, 2012.

Lopez-Gazpio, J.; Millán, E.: *Elektroforesi Kapilarraren Oinarriak*, UPV/EHUko Argitalpen Zerbitzua, Leioa, 2013.

Mayer, B.X.: *How to Increase Precision in Capillary Electrophoresis*, Journal of Chromatography A, 907, 21-37, 2001.

Mikkers, F.E.P.; Everaerts, F.M.; Verheggen, P.E.M.: *High-Performance Zone Electrophoresis*, Journal of Chromatography, 169, 11-20, 1979.

Nakagawa, T.: *A Note to Those who are Interested in Solubilization Phenomena*, Division of Colloid and Surface Chemistry of the Chemical Society of Japan, 6, 1, 1981.

Nobel Foundation: *The Nobel Prize in Chemistry 1948*, nobelprize.org, 2013 (last access 2014/07/30).

Nozal, L.; Simonet, B.M.; Arce, L.; Rios, A; Valcárcel, M.: *Use of Basic Amphiprotic Organic Solvents Containing Neutral-Surfactant Aggregates as Pseudostationary Phase in Non-Aqueous Capillary Electrophoresis*, Analytica Chimica Acta, 560, 69-76, 2006.

Pascali, J.; Liotta, E.; Gottardo, R.; Bortolotti, F.; Tagliaro, F.: *Rapid Optimized Separation of Bromide in Serum Samples with Capillary Zone Electrophoresis by Using Glycerol as Additive to the Background Electrolyte*, 1216, 3349-3352, 2009.

Perrett, D.: *200 Years of Electrophoresis*, Chromatography Today, 4-7, Dec. 2010.

Poole, C.F.: *The Essence of Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, 2003.

Porras, S.P.; Jussila, M.: *Electromigration of a Heteroconjugated Imidazole-Acetate Complex in ACN*, Electrophoresis, 28, 3590-3599, 2007.

Porras, S.; Riekkola, M.-L.; Kenndler, E.: *The Principles of Migration and Dispersion in Capillary Zone Electrophoresis in Nonaqueous Solvents*, Electrophoresis, 24, 1485-1498, 2003.

Qi, S.; Tian, K.; Zhang, H.; Chen, X.: *High Electric Field Strengths in Micellar Electrokinetic Capillary Electrophoresis with Ionic Liquids as Modifiers*, Analytical Letters, 39, 2039-2053, 2006.

Quirino, J.P.: *Electrokinetic Removal of Charged Species from Small Sample Volumes*, Journal of Chromatography A, 1299, 131-135, 2013.

Reuss, F.F.: *Notice sur un Nouvel Effet de L'électricité Galvanique*, Mémoires de la Société Impériale des Naturalistes de Moscou, 2, 327-347, 1809.

Riekkola, M.-L.; Jönsson, J.A.; Smith, R.M.: *Terminology for Analytical Capillary Electromigration Techniques (IUPAC Recommendations, 2003)*, Pure and Applied Chemistry, 76, 443-451, 2004.

Riekkola, M.L.; Jussila, M.; Porras, S.P.; Valko, I.E.: *Non-Aqueous Capillary Electrophoresis*, Journal of Chromatography A, 892, 155-170, 2000.

Righetti, P.G.: *Electrophoresis: The March of Pennies, the March of Dimes*, Journal of Chromatography A, 1079, 24-40, 2005.

Righetti, P.G.: *Happy Bicentennial, Electrophoresis!*, Journal of Proteomics, 73, 181-187, 2009.

Ross, G.A.: *Capillary Electrophoresis – Mass Spectrometry: Practical Implementation and Applications*, LCGC Europe, January, 2-4, 2001.

Sandoval, J.E.; Chen, S.-M.: *Method for the Accelerated Measurement of Electroosmosis in Chemically Modified Tubes for Capillary Electrophoresis*, Analytical Chemistry, 68, 2771-2775, 1996.

Schober, T.J.; Bean, S.R.; Wang, D.: *Capillary Electrophoresis as a Tool for Evaluating Lactic Acid Production from Sorghum*, Cereal Chemistry, 86, 117-221, 2009.

Seifar, R.M.; Kraak, J.C.; Kok, W.T.: *Mechanism of Electrokinetic Separations of Hydrophobic Compounds with Sodium Dodecyl Sulfate in Acetonitrile-Water Mixtures*, Analytical Chemistry, 69, 2772-2778, 1997.

Sekhon, B.S.: *An Overview of Capillary Electrophoresis: Pharmaceutical, Biopharmaceutical and Biotechnology Applications*, Journal of Pharmaceutical Education and Research, 2, 2-36, 2011.

Silva, M.: *MEKC: An Update Focusing on Practical Aspects*, Electrophoresis, 28, 174-192, 2007.

Silva, M.: *Micellar Electrokinetic Chromatography: Methodological and Instrumental Advances Focused on Practical Aspects*, Electrophoresis, 30, 50-64, 2009.

Silva, M.: *Micellar Electrokinetic Chromatography: A Practical Overview of Current Methodological and Instrumental Advances*, *Electrophoresis*, 32, 149-165, 2011.

Silva, M.: *Micellar Electrokinetic Chromatography: A Review of Methodological and Instrumental Innovations Focusing on Practical Aspects*, *Electrophoresis*, 34, 141-158, 2013.

Simó, C.; Cifuentes, A.: *Electroforesis Capilar: Detección mediante Espectrometría de Masas*. In Fernández Gutiérrez, A.; Segura Carretero, A.: *Electroforesis Capilar: Aproximación según la Técnica de Detección*, Editorial Universidad de Granada, Granada, 2005, 409-438.

Simó, C.; Cifuentes, A.; Kasicka, V.: *Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry for Peptide Analysis: Target-Based Approaches and Proteomics/Peptidomics Strategies*, *Methods in Molecular Biology*, 984, 139-151, 2013.

Smoluchowski, M. von: *Contribution à la Théorie de l'Endosmose Électrique et de Quelques Phénomènes Corrélatifs*, *Bulletin International de l'Académie des Sciences de Cracovie*, 8, 182-200, 1903.

Su, J.; Xu, J.; Zhong, S.; Chen, L.; Li, X.; Zou, H.: *Analysis of Dye Components in Red Ballpoint Pen Inks by Nonaqueous Micellar Electrokinetic Chromatography with LIF Detection*, *Chromatographia*, 77, 471-474, 2014.

Swinney, K.; Bornhop, D.J.: *Detection in Capillary Electrophoresis*, *Electrophoresis*, 21, 1239-1250, 2000.

Szumski, M.; Buszewski, B.: *Non-Aqueous Capillary Electrophoresis*. In Buszewski, B.; Dziubakiewicz, E.; Szumski, M.: *Electromigration Techniques, Theory and Practice*, Springer, Heidelberg, 2013.

Tabara, A.; Kaneta, T.: *Discrimination of Glycoproteins Via Two-Color Laser-Induced-Fluorescence Detection Coupled with Postcolumn Derivatization in Capillary Electrophoresis*, *Electrophoresis*, 34, 2316-2322, 2013.

Terabe, S.; Otsuka, K.; Ando, T.: *Electrokinetic Chromatography with Micellar Solution and Open-Tubular Capillary*, *Analytical Chemistry*, 57, 834-841, 1985.

Terabe, S.; Otsuka, K.; Ichikawa, K.; Tsuchiya, A.; Ando, T.: *Electrokinetic Separations with Micellar Solutions and Open-Tubular Capillaries*, *Analytical Chemistry*, 56, 111-113, 1984.

Tjornelund, J.; Hansen, S.H.: *Separation of Neutral Substances by Non-Aqueous Capillary Electrophoresis through Interactions with Cationic Additives*, Journal of Chromatography A, 792, 475-482, 1997.

Vetter, A.J.; McGowan, G.J.: *The Scalator – An Analogy for Explaining Electroosmotic Flow*, Journal of Chemical Education, 78, 209-211, 2001.

Virtanen, R.: *Zone Electrophoresis in a Narrow-Bore Tube Employing Potentiometric Detection*, Acta Polytechnica Scandinavica, 123, 1-67, 1974. Ph.D. thesis.

Walbroehl, Y.; Jorgenson, J.W.: *On-Column UV Absorption Detector for Open Tubular Capillary Zone Electrophoresis*, Journal of Chromatography A, 315, 135-143, 1984.

Walbroehl, Y.; Jorgenson, J.W.: *Capillary Zone Electrophoresis of Neutral Organic Molecules by Solvophobic Association with Tetraalkylammonium Ion*, Analytical Chemistry, 58, 479-481, 1986.

Wang, J.: *Electrochemical Detection for Capillary Electrophoresis Microchips: A Review*, Electroanalysis, 17, 1133-1140, 2005.

Weinberger, R.: *Practical Capillary Electrophoresis*, Academic Press Inc., New York, 1993.

Wolf, W.J.: *Gel Electrophoresis and Amino Acid Analysis of the Nonprotein Nitrogen Fractions of Defatted Soybean and Almond Meals*, Cereal Chemistry, 72, 115-121, 1995.

Zhang, T.; Fang, Q.; Du, W.-B.; Fu, J.-L.: *Microfluidic Picoliter-Scale Translational Spontaneous Sample Introduction for High-Speed Capillary Electrophoresis*, Analytical Chemistry, 81, 3693-3698, 2009.

Zhong, S.; Tan, S.N.; Ge, L.; Wang, W.; Chen, J.: *Determination of Bisphenol A and Naphthols in River Water Samples by Capillary Zone Electrophoresis after Cloud Point Extraction*, Talanta, 85, 488-492, 2011.

HELBURUAK

HELBURUAK

Ikerketa honen helburu orokorra honako hau izan zen:

1) Kromatografia elektrozinetiko mizelarrean oinarritutako metodoen garapena, zainketa pertsonalerako produktuetan musketa poliziklikoak, lurrin alergenokoak, kontserbagarriak eta ultramore-iragazkiak banatzeko eta kuantifikatzeko.

Helburu espezifikoak honako hauek izan ziren:

2) Diseinu esperimental eta erantzun-gainazalen metodologia aplikatzea, garatutako metodoetan eragin adierazgarria duten aldagaiak identifikatzeko eta ikertutako baldintza esperimentalen erantzun optimoa bilatzeko.

3) Erantzun-funtzio bat proposatzea, diseinu esperimentalarekin batera metodo elektroforetikoa edota kromatografikoak optimizatzeko tresna erraz eta eraginkorra izango dena eta, erantzun-funtzioaren aplikagarritasuna ebaluatzea.

4) Kromatografia elektrozinetiko mizelarraren erabilpena zabaltzea, konposatu hidrofoboak (musketa poliziklikoak) banaketa lortzeko metodo ez-akuosoa garatuz.

5) Garatutako metodoen ezaugarri analitikoak ebaluatzea, baldintza optimoetan kalibraketa zuzenak, zehaztasuna, doitasuna, detekzio mugak eta kuantifikazio mugak aztertuz.

6) Garatutako eta optimizatutako metodoak zainketa pertsonalerako produktuen eta etxeko beste produktuen analisisan erabiltzea, metodoak matrize desberdinetan aplikatu daitezkeela frogatzeko.

Helburu osagarria honako hau izan zen:

7) Elektromigrazio tekniken esparruan euskarazko terminologia garatzea, oraingoz oso urria baita.

OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo de investigación fue el siguiente:

1) Desarrollar métodos de separación y cuantificación de almizcles policíclicos, fragancias alérgenas, conservantes y filtros ultravioleta en productos para el cuidado personal por cromatografía electrocinética micelar.

Los objetivos específicos fueron los siguientes:

2) Aplicar el diseño experimental y la metodología de superficies de respuesta para determinar las variables significativas que afectan al sistema objeto de estudio y buscar la respuesta óptima de las condiciones experimentales estudiadas.

3) Proponer una función de respuesta que, junto con el diseño experimental, sirva como instrumento sencillo y eficaz para optimizar métodos electroforéticos y/o cromatográficos, y evaluar su aplicabilidad.

4) Ampliar la utilidad de la cromatografía electrocinética micelar desarrollando un método para la separación de compuestos hidrófobos (almizcles policíclicos) en medio no acuoso.

5) Evaluar las características analíticas de los métodos desarrollados, llevando a cabo los correspondientes estudios de las rectas de calibrado, precisión, exactitud, límites de detección y cuantificación, en las condiciones óptimas.

6) Utilizar las metodologías desarrolladas y optimizadas para analizar distintos tipos de productos comerciales para el cuidado personal y del hogar para demostrar la aplicabilidad de las mismas en diferentes matrices.

Como objetivo complementario:

7) Desarrollar nueva terminología en euskara en el campo de las técnicas de electromigración, hasta ahora deficitaria.

II. ZATIA

Atal experimentalala

II. ZATIA: Atal esperimentalala

5- Perfumeetan musketa poliziklikoak determinatzeko kromatografia elektroinetiko mizelar ez-akuosoan oinarritutako metodoaren garapena eta optimizazioa

6- Zainketa pertsonalerako produktuetan lurrin alergenak eta kontserbagarriak aldiberean determinatzeko kromatografia elektroinetiko mizelarrean oinarritutako metodoaren garapena eta optimizazioa

7- Zainketa pertsonalerako produktuetan kontserbagarriak eta ultramore-iragazkiak aldiberean determinatzeko kromatografia elektroinetiko mizelarrean oinarritutako metodoaren garapena eta optimizazioa

— 5 —

Perfumeetan musketa poliziklikoak determinatzeko kromatografia elektrozinetiko mizelar ez-akuosoan oinarritutako metodoaren garapena eta optimizazioa

5.1. Sarrera

Sarrera orokorrean azaldu den bezala, zainketa pertsonalerako produktuek eta produktu farmazeutikoek (PPCP, *Pharmaceutical and Personal Care Products*) interes handia dute ingurugiroa kutsatzen duten konposatuak aurki daitezkeelako haien osaketan. PPCPen artean, musketak asko ikertu diren lurrikak dira, ingurunean eta ekosistemetan edonon aurki baitaitezke (Daughton eta Ternes, 1999; Klaschka eta Kolossa-Gehring, 2007; Jimenez-Diaz *et al.*, 2014). 2. Kapituluaz azaldu den gisara, musketa nitroaromatikoak izan ziren garrantzitsuenak hasiera batean (Rimkus, 1999), baina, erreakzio fotoalergikoei (Barbetta *et al.*, 1988) eta animalia nahiz gizakietan metatzeko duten gaitasunari buruzko ikerketak (Yamagishi *et al.*, 1981; Liebl eta Ehrenstorfer, 1993; Rimkus eta Wolf, 1995) argitaratu zirenean, nitromusketen erabilpena murriztu egin zen eta, haien ordean, musketa poliziklikoen (PCM, *PolyCyclic Musk*) gorakada hasi zen.

Musketa poliziklikoei dagokienez, Tonalide (AHTN) eta Galaxolide (HHCB) dira gehien erabiltzen direnak kosmetikoen eta parfumeen industrian, eta neurri txikiagoan Traseolide (ATII), Celestolide (ADBI) eta Phantolide (AHDI) —horien egitura kimikoak eta xehetasun gehiago 2.5. taulan jaso direla gogoratu—. PCMak edonon aurkitu dira kutsatzaile moduan (Bu *et al.*, 2013; Wang eta Khan, 2014) —baita Ozeano Artikokoan ere (Xie *et al.*, 2007)—, nahiz eta informazio toxikologiko nahiko urria dagoen eskuragarri, 2. kapituluaz azaldu den moduan. Aipatzekoa da, esaterako, AHTN, HHCB eta ATII erresistentzia multixenobiotikoaren inhibitzaileak direla uretako bizidunentzat (Smital *et al.*, 2004).

Eskuragarri dagoen erabilpenari buruzko datuetan eta informazio toxikologikoan oinarrituta, ikerketa honetan AHTN, HHCB eta ATII PCMak aukeratu dira, perfumeetan haien kontzentrazioa ezagutzeko. Ikerketa askok aurkitu dituzte konposatu horiek, bereziki AHTN eta HHCB giza gantzean, esnean eta serumean, besteak beste (Kang *et al.*, 2010; Schiavone *et al.*, 2010; Homem *et al.*, 2013). Hori horrela da PCMak kontsumitzaileek egunero erabiltzen dituzten produktu kosmetiko askotan daudelako, hala nola perfumeak, kremak, xanpuak, xaboiak, garbigarriak, leungarriak, eta etxeko beste hainbat produktu. Europako 1223/2009 araudian hiru PCM horietatik AHTNri mugak ezartzen zaizkio, hain zuzen ere, %2,5eko kontzentrazio maximoan erabil daiteke (European Parliament and European Council, 2009).

Testu honen 2. kapituluaren 2.7. azpiatalean, eta bereziki 2.11. taulan PCMak determinatzeko bibliografian deskribatu diren metodoak jaso dira. Perfumeen analisiari dagokionez, ez dira asko literaturan garatu diren metodoak. Garatutako gehienak GC-MS teknika instrumentalean oinarritzen dira eta bakarrak erabiltzen du elektroforesi kapilarra (CE) (Martínez-Girón *et al.*, 2010).

Elektroforesi kapilarra teknika interesgarri eta eraginkorra da banaketa analitikoak lortzeko, besteak beste, 4. kapituluaren azaldu diren ezaugarriek esker: erraza da erabiltzea, martxan jartzea eta, gainera, automatizazio maila handia du. Horri esker GC-MS edo HPLC ekipoei dituzten desabantaila asko gaindi ditzake. Azaldu diren elektromigrazio-teknika moten artean, AHTN, HHCB eta ATII konposatu neutro eta hidrofoboak determinatzeko, beharrezkoa da bi teknika konbinatzea. Alde batetik, MEKC teknikari esker konposatu neutroak kromatografikoki bana daitezke, eta bestetik, NACEri esker konposatu hidrofoboak CE bidez kuantifika daitezke, beraz, analito horien analisirako derrigor NAMEKC aplikatu behar da.

Kapitulu honetan deskribatzen den ikerketaren helburua MEKC eta NACE tekniken aplikazioa zabaltzea izan zen, sistema ez-akuosoan surfaktante bati esker agregatu mizelarrak lortuz. Agregatu mizelar horiei esker AHTN, HHCB eta ATII PCMak banatu ahal izan ziren, CEren aplikazioak areagotuz. NAMEKC teknikari buruzko literatura zientifikoa 4. kapituluaren 4.6.4. azpiatalean berrikusi da, baina aipatu behar da PCMen determinaziorako Lin eta bere lankideen ikerketak hartu zirela abiapuntutzat (Lin *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2002). Ikerketa horietan sei *p*-arilzetona banatu ahal izan zituzten, formamida disolbatzaile organiko moduan eta K_2HPO_4 elektrolito moduan erabiliz.

Aipatutako arrazoiak eta perfumeetan kuantifikatu nahi ziren konposatuen ur-disolbagarritasun eskasa zela-eta, ikerketaren helburu nagusienetakoa zen NAMEKC metodo sinple, fidagarri eta merkea garatzea AHTN, HHCB eta ATII konposatuak aldeberean perfumeetan determinatzeko. Box-Behnken diseinu esperimentalak (BBD, *Box-Behnken Design*) aplikatu zen baldintza esperimental optimoak bilatzeko eta, horretaz gainera, erantzun-funtzio kromatografiko aldatua

(MCRF, *Modified Chromatographic Response Function*) proposatu zen banaketa elektroforetikoen kalitatea ebaluatzeko. Azkenik, optimizatutako eta balioztatutako NAMEKC metodoa erabiliz, parfumeetan aukeratutako hiru PCMak kuantifikatu ziren.

5.2. Materialak eta metodoa

5.2.1. Erreaktiboak eta laginak

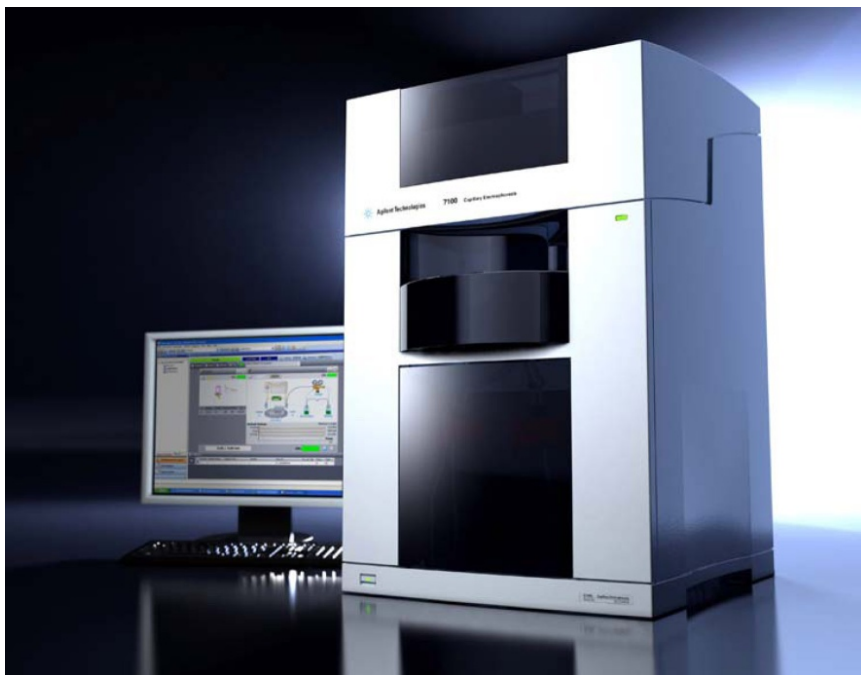
AHTN, HHCB eta ATII musketa poliziklikoek %97ko, %70eko eta %97ko purutasuna zuten, hurrenez hurren. Patroiak Lluch Essence S.L. (Bartzelona, Espainia) enpresaren eskuzabaltasunari esker lortu ziren. Sodio dodezilsulfato (SDS) surfaktantea, metanola (MeOH), sodio dihidrogenofosfato anhidroa (NaH_2PO_4) eta formamida (FA) Panreac Química S.A. (Bartzelona, Espainia) enpresari erosi zitzaizkion. 4-Metil-3-penten-2-ona (purutasuna, >%90) erabili zen barne-patroi bezala (IS, *Internal Standard*) eta Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania) enpresari erosi zitzaion. Guztiek erreaktibo analitiko gradua zuten, besterik aipatzen ez bada. Ikerketan erabilitako ur bidistilatua Aquatron A4D (J. Bibby Sterilin Ltd., Stone, Erresuma Batua) sistemari esker lortu zen. Laginei dagokienez, guztira 27 perfume analizatu ziren eta Gipuzkoako hainbat dendatan lortu ziren borondatezko kolaboratzaileei esker.

Disoluzio elektrolitiko, estandar eta lagin guztiak iragazi egin ziren injektatu aurretik, 0,45 μm -ko nylon iragazkiak erabiliz (Teknokroma, Bartzelona, Espainia). Era berean, disoluzio guztiak hozkailuan gorde ziren (4°C-tan) eta giro tenperaturara egokitu arte itxaron zen erabili aurretik.

5.2.2. Instrumentazioa

Esperimentu guztiak aurrera eramateko Agilent G7100A CE ekipoa (Agilent Technologies International Sarl, Morges, Suitza) erabili zen (5.1. Irudia); ekipoa horrek lerrokatutako diodoen ultramore-ikusgai detektagailua (DAD) zuen. *Chemstation Software (Rev. B.04.02)* delakoa zuen ekipoa kontrolatzeko eta datuak jasotzeko. Kapilarrak 50 μm -ko barne diametroa zuen eta 64,5 cm luze zen; bestetik, 56 cm-ko luzera eraginkorra zuen —hau da, detektagailurainoko luzera—. Detekzio zelda *extended light path* motakoa zen (*bubble cell*) —4.12. irudian ikusgai dagoenaren antzekoa—eta silize urtuzkoa zen (Agilent

Technologies). Diseinu esperimental eta erantzun-gainazalen analisia egiteko Statistica 6.0 softwarea erabili zen (StatSoft, Inc., Tulsa, AEB).



5.1. Irudia. Agilent G7100A CE elektroforesi ekipoa.

5.2.3. Prozedura

Kapilarra lehen aldiz erabili aurretik 1 M NaOH (15 min), 0,1 M NaOH (15 min) eta ur bidistilatua (15 min) igaroarazi ziren. Injekzio batetik bestera kapilarra garbitzeko ur bidistilatua (5 min), 0,1 M NaOH (3 min), ur bidistilatua (3 min) eta BGE disoluzioa (6 min) igaroarazi ziren.

Lagina injektatzeko 45 mbar-eko presioa aplikatu zen 8 segundoz —injekzio hidrodinamikoa— eta banaketa lortzeko 30 kV-ko potentzial-diferentzia aplikatu zen. DAD detektagailuan, 280 nm-ko uhin-luzeran HHCB detektatu zen, eta AHTN eta ATII, berriz, 260 nm-tan detektatu ziren. Bialean jarritako elektrolito disoluzioa analisi bakoitzaren ondoren berritu egin zen, migrazio denboraren errepikakortasuna hobetzeko. Kapilarraren tenperatura 25 °C-tan finkatu zen. Arreta berezia izan behar zen kapilarraren gainestaldurarekin, formamida erabiltzearen ondorioz kapilarra buxatuta gera baitaiteke.

Optimizatutako NAMEKC metodoan erabilitako disoluzio mizelar elektrolitikoaren (BGE, *BackGround Electrolyte*) konposaketa honako hau zen: 195 mM SDS eta 40 mM NaH₂PO₄, formamidatan disolbatuta. Musketa poliziklikoen

stock disoluzio estandarrak 4,8 g/L kontzentraziokoak ziren eta era independentean prestatu ziren analitoak metanoletan disolbatuz. Kalibraketa egiteko patroiak *stock* disoluzioetatik abiatuz prestatu ziren, diluzioa egiteko BGE disoluzioa erabiliz. Kalibraketa 50-400 mg/L tartean egin zen eta, esan bezala, barne-patroiaren metodoa erabili zen kuantifikazioak egiteko. Barne-patroiaren erabilerari buruz hurrengo kapituluaren 6.2.1.1. azpiatalean argibide gehiago emango dira.

Laginak prestatzeko prozedurari dagokionez, kasu gehienetan 1-2 mL-ko laginekin nahikoa izan zen eta prestaketa metodoa sinplea zen: elektroforesiko bialean bertan 400 μ L BGE, 50 μ L barne-patroi —amaierako kontzentrazioa 257 mg/L izan zedin— eta, perfumearen kantitate egokia jartzen ziren. Beraz, laginen analisia aurretratamendurik gabe egin zen; tratamendu bakarra perfumea BGErekin diluitzea —beharrezkoa zenean— eta barne-patroia gehitzea izan zen. Ondoren, metanolez betetzen zen 600 μ L-ko amaierako bolumena izan arte. Hartutako perfume kantitatea PCM kontzentrazioaren arabera zen; beti ere, perfumearen masa ere kontuan hartu zen dentsitatea kalkulatzeko eta emaitza mg/kg-tan ere izateko. Beharrezkoa izan zenean ultrasonikazioa aplikatu zen eta, ondoren, zuzenean elektroforesi ekipoen injektatzen zen.

5.3. Emaitzak eta eztabaida

5.3.1. Metodoaren optimizazioa

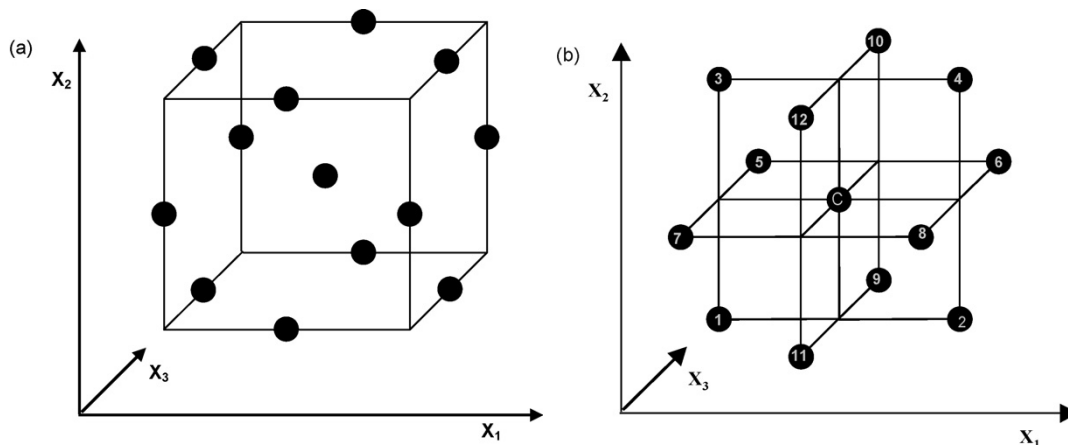
5.3.1.1. Diseinu experimentalaren eta optimizazioaren deskribapena

Metodo analitikoak optimizatzeko hainbat tresna kimiometriko daude eskuragai, esaterako, diseinu experimentalaren eta erantzun-gainazalen metodologia (RSM, *Response Surface Methodology*). Teknika horiei esker aldagai asko dituzten baldintza experimentalak optimiza daitezke, horretarako beharrezkoa den esperimentu kopurua murriztuz. Gainera, prozesu horietan erabiltzen diren eredu matematikoei esker faktore adierazgarrienak identifika daitezke eta baita faktore garrantzitsuenen arteko elkarrekintzak ere. Optimizazioa aldagai bakarreko metodo klasiko bidez egiten denean, oso zaila da aldagaien arteko elkarrekintzak identifikatzea eta, hortaz, elkarrekintzek eragin nabarmena dutenean esperimentuetan metodologia klasikoek huts egiten dute (Ferreira *et al.*,

2007). Bestalde, tresna kimimetroko eraginkor horien aplikazioari esker zorizko aldaketak eta benetako efektuak bereiz daitezke eta egin ez diren esperimenduetan lortuko lirartekeen emaitzak aurrean daitezke.

Optimizazio aldagaien lehen pausoa esperimenduetan eragina duten faktoreak identifikatzea da. Horretarako *screening* prozedura planteatu daiteke, analisten eskarmentuan edota literatura zientifikoan oinarrituta. Behin aldagai horiek identifikatuta eta adierazgarriak aukeratuta, diseinu esperimental konplexuagoa eraman behar da aurrera, hala nola Dohelert matrizea (DM, *Dohelert Matrix*), Box-Behnken diseinua (BBD, *Box-Behnken Design*) edo diseinu konposatu zentrala (CCD, *Central Composite Design*), besteak beste (Bruns *et al.*, 2006). Aipatu behar da diseinu horiek sarritan erabili direla MEKC metodoak optimizatzeko (Mikaeli *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2006; Flores *et al.*, 2008).

Ikerkuntza honetan, metodoa optimizatzeko 3 aldagaiko Box-Behnken diseinu esperimentalaren (BBD) aplikatu zen, aurrerago azalduko den bezala. Horren bitartez, erantzun-gainazal irudikatu eta desiragarritasun optimoari dagozkion baldintza esperimental egokienak aurkitu ziren. BBD diseinua bigarren mailako diseinua da, eta 3 mailako diseinu faktorial osatugabe oinarritzen da (Box eta Behnken, 1960). Hiru faktoreen irudikapen grafikoa bi eratara ikus daiteke: 1) puntu zentral bat eta ertzetako erdiko puntuak dituen kubo (5.2.a. Irudia) edo 2) puntu zentral bat eta 2^2 motako hiru diseinu faktorialen elkarketa (5.2.b. Irudia).



5.2. Irudia. Box-Behnken diseinu esperimentalaren adierazpen grafikoa.

BBD aplikatzeko beharrezkoa den esperimendu kopurua (N) formula honen bidez lor daiteke, $N = 2k(k-1) + C_0$, zeinetan k aldagai kopurua eta C_0 puntu zentral kopurua diren. Hortaz, 3 aldagai dituen diseinuaren kasuan 12 esperimendu beharko dira, puntu zentralaz gainera. 5.1. Taulan 3 faktoreko BBD diseinuaren kodeak ikus daitezke, aldagai bakoitzaren mailak adierazita. Diseinu

konposatu zentralaren (CCD) kasuan, aldiz, $N = 2^k + 2k + C_0$ formularen bidez kalkulatzen da esperimentu kopurua.

5.1. Taula. BBD diseinuaren maila kodifikatuak, hiru aldagaien kasurako.

Esperimentua	x_1	x_2	x_3
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
C	0	0	0

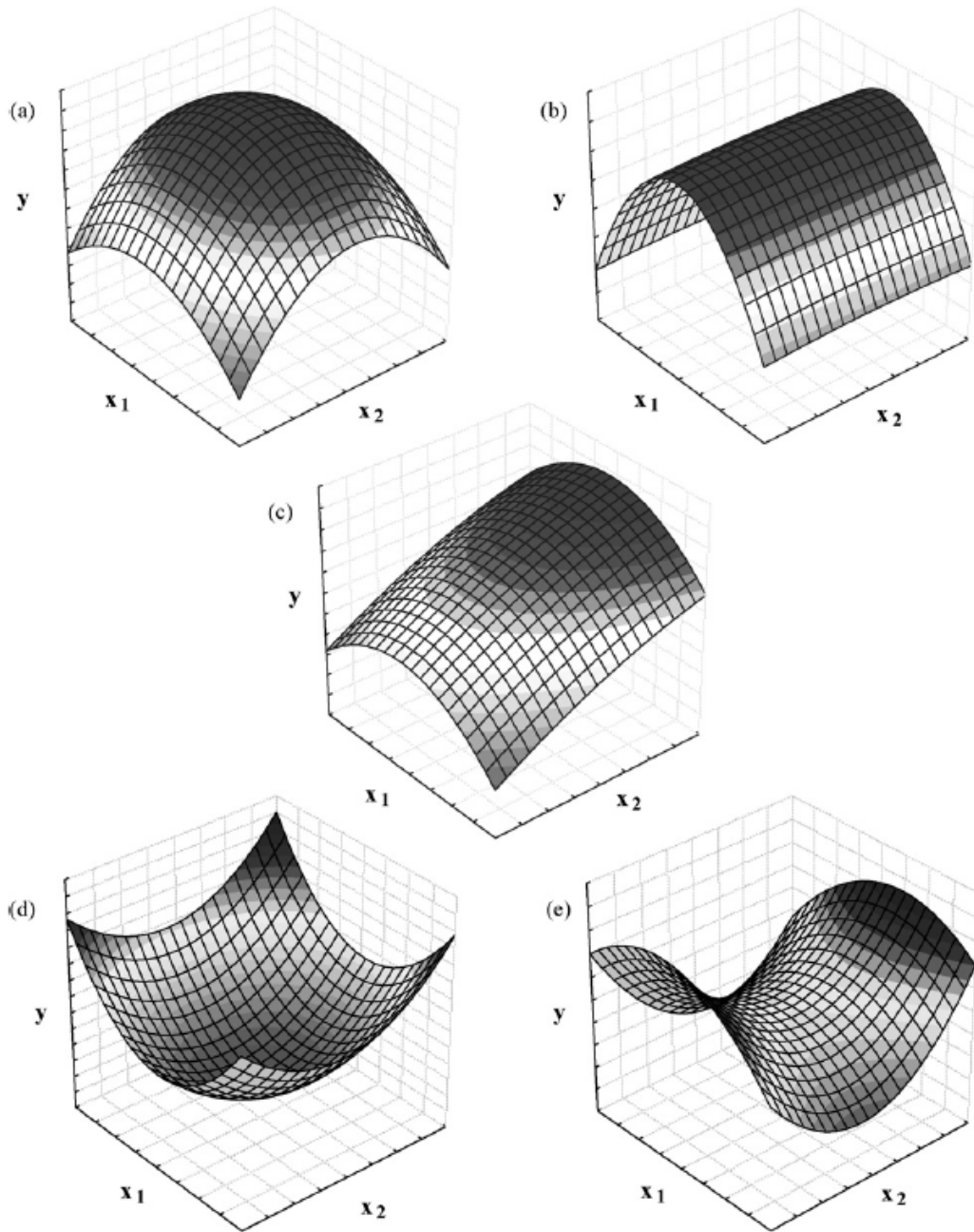
Diseinuko esperimentuak egin ondoren, RSM metodologiaren bidez erantzun-gainazalak irudikatzen dira eta horrek eredu matematikoaren puntu optimoak bilatzeko aukera ematen du. 5.3. Irudian RSM metodologia aplikatu ondoren eredu koadratikoekin lortu ohi diren erantzun-gainazalak daude ikusgai (Bezerra *et al.*, 2008).

5.3.1.2. MCRF erantzun-funtzioaren deskribapena

Elektroferogramen kalitatea ebaluatzeko metodoa garatzea da ikerkuntzaren beste helburuetako bat. Gutxienez bi parametro behar dira banaketa kromatografikoa definitzeko; alde batetik, ondoz ondoko seinale kromatografikoen arteko bereizmena ($R^{k,k+1}$) —jakina, elektroferograman dauden piko guztiena— eta, bestetik, analisi denbora totala (T) kontuan hartu behar dira. Pikoen arteko bereizmena kalkulatzeko, (5.1) ekuazioa erabiltzen da,

$$R^{k,k+1} = \frac{t_m^{k+1} - t_m^k}{(w^{k+1} + w^k)/2} \quad (5.1)$$

non t_m^k , w^k , t_m^{k+1} eta w^{k+1} k pikoaren migrazio denbora, zabalera eta $k+1$ pikoaren migrazio denbora eta zabalera diren, hurrenez hurren (IUPAC, 1993).

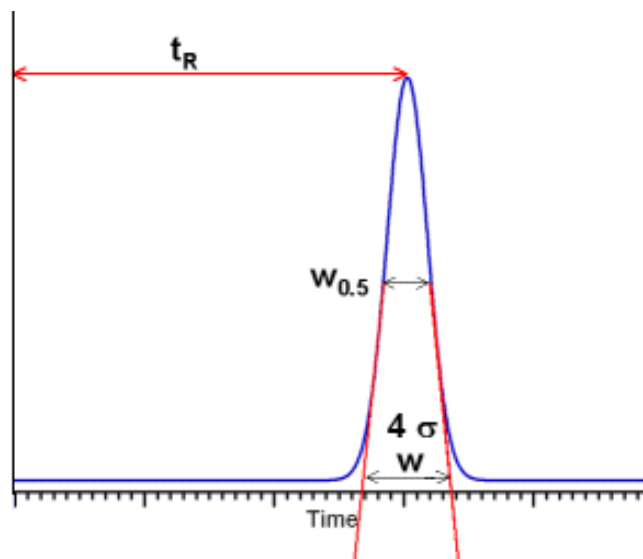


5.3. Irudia. Erantzun-gainazalen adibideak, eredu koadratikoen kasuan. (a) Maximoa, (b) goi-lautada, (c) maximoa tarte esperimentaletik kanpo, (d) minimoa eta (e) zaltokia (Bezerra *et al.*, 2008).

Aipatzekoa da zenbait kasutan errazagoa dela pikoaren altuera erdiko zabalera, $w_{1/2}$, erabiltzea (5.4. Irudia), bereziki seinaleak gainezarrita daudenean. Kasu horretan, (5.1) ekuazioaren orde (5.2) erabili behar da.

$$R^{k,k+1} = \frac{2(t_m^{k+1} - t_m^k)}{1.7(w_{1/2}^{k+1} + w_{1/2}^k)} = \frac{1.18(t_m^{k+1} - t_m^k)}{w_{1/2}^{k+1} + w_{1/2}^k} \quad (5.2)$$

Ohartu $R^{k,k+1} = 0$ bada, komigrazioa gertatzen dela eta $R^{k,k+1} > 2,0$ bada pikoaren guztizko banaketa lortzen dela. Teorikoki, gaussiarrak diren bi piko ezin dira bereizi $R^{k,k+1} < 0,5$ denean eta, hortaz, bereizmen hori duten banaketak ez dira onargarriak kromatografian. Bestalde, 2,0 baino handiagoa den bereizmenak ez du abantaila gehiagorik eskaintzen (Schlabach eta Excoffier, 1988; Divjak *et al.*, 1998).



5.4. Irudia. Seinale kromatografikoaren zabalera oinarrian (w) edo altuera erdian ($w_{0.5}$) neur daiteke bereizmena kalkulatzeko. Irudian seinalearen erretentzio-denbora (t_R) eta pikoaren desbideraketa estandarra (σ) ere ikus daitezke.

Aipatutako irizpide horiek kontuan hartuta, IUPACek definitutako bereizmenaren hainbat transformazio matematiko proposatu dira literaturan. Horien artean, Divjak eta bere lankideek $S^{k,k+1}$ desiragarritasuna deskribatu zuten (Divjak *et al.*, 1998). S parametroak 0-1 tarteko balioa du, non 0 bereizmen minimoari dagokion eta 1 bereizmen maximoari. R bereizmenetik S desiragarritasuna lortzeko (5.3) normalizazio ekuazioa aplikatu behar da.

$$S^{k,k+1} = \frac{1}{1 + e^{-b_0 R^{k,k+1} + b_1}} \quad (5.3)$$

Ekuzioan b_0 eta b_1 parametroak agertzen dira eta, horiek kalkulatzeko zenbait muga-baldintza ezarri behar dira, jarraian azalduko den moduan. Elektroferograman dauden piko guztien arteko $S^{k,k+1}$ desiragarritasunak lortu ondoren, hurrengo pausoa $S^{k,k+1}$ guztiak elkartzea da, elektroferogramari dagokion

bereizmen totala lortzeko. Hori eginda, zenbaki bakar baten bidez hainbat seinale dituen elektroferograma baten kalitatea —bereizmenari dagokionez behintzat— defini daiteke. Horretarako f desiragarritasuna definitzen da (5.4) adierazpenaren bidez, zeina azken finean, N analitoen S desiragarritasunen batez besteko geometrikoa den. Funtzio global hori oso erabilgarria da elektroferogramen eta kromatogramen kalitatea ebaluatzeko, batez ere konposatu asko aztertzen direnean.

$$f = \left(\prod_{k=1}^{N-1} S^{k,k+1} \right)^{1/(N-1)} \quad (5.4)$$

Bestalde, lehenago ere aipatu da banaketa kromatografiko baten kalitatea ebaluatzeko bigarren faktore garrantzitsuena analisi denbora (T) dela. Analisi kromatografiko bat egiteko behar den denbora zenbat eta txikiagoa izan, orduan eta eraginkorragoa izango da metodoa. Beraz, beharrezkoa da bereizmenarekin egin den bezala denbora desiragarritasuna (g) deskribatzea, (5.5) adierazpenean jasotako transformazio sigmoidalaren bidez (Divjak *et al.*, 1998).

$$g = \frac{1}{1 + e^{b_2 \cdot T + b_3}} \quad (5.5)$$

Bereizmenari dagokion S desiragarritasunaren kasuan bezala, g -k 0 inguruko balioa du denbora luzeko elektroferogramen kasuan eta 1 inguruko balio elektroferograma motzen kasuan. Denbora desiragarritasunaren balioak lortzeko —alegia, T balioetatik g balioak lortzeko— (5.5) ekuazioko b_2 eta b_3 parametroak lortu behar dira. Horretarako, bereizmenaren kasuan egin den moduan, muga-baldintzak ezarri behar dira.

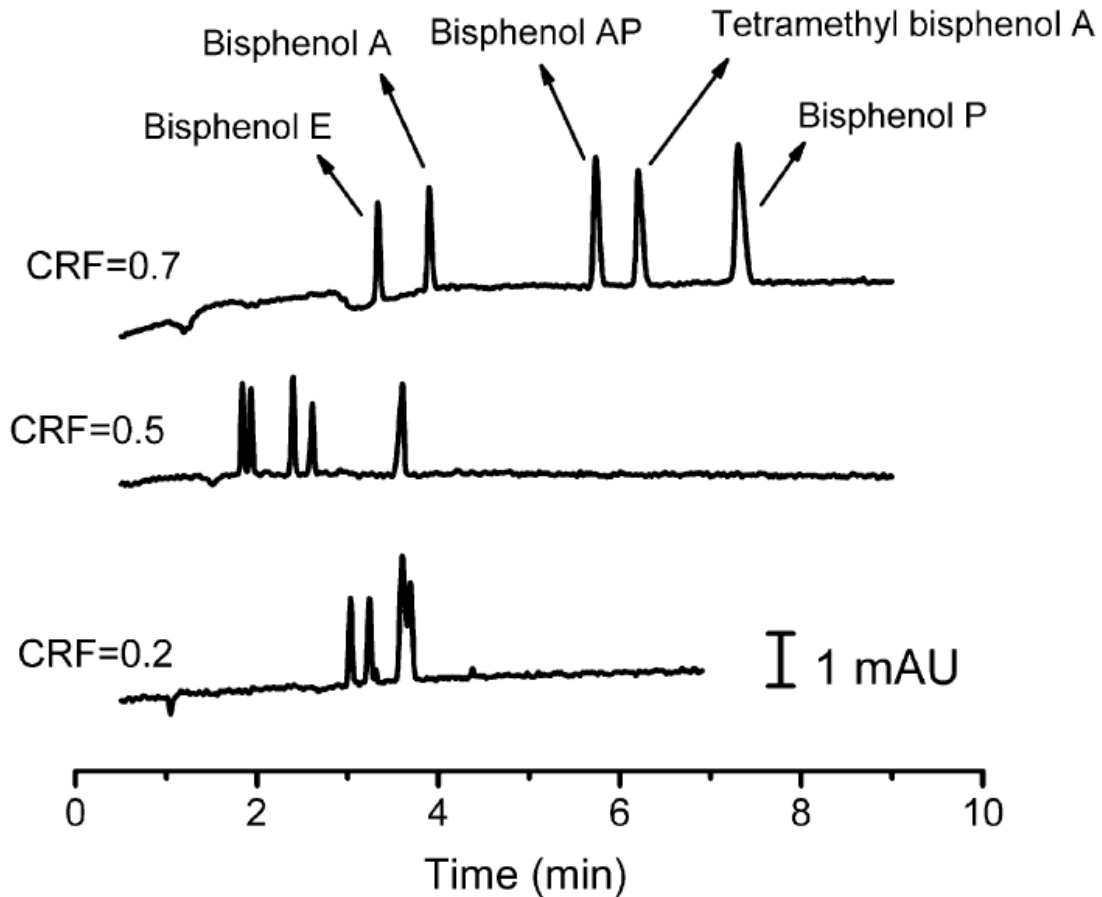
Amaitzeko, Divjak eta bere lankideek f eta g balioak elkartuz erantzun-funtzio kromatografikoa (CRF, *Chromatographic Response Function*) honela definitu zuten:

$$\text{CRF}(f, g) = f \cdot g \quad (5.6)$$

CRF funtzioaren bidez balio bakar bat esleitzen zaio elektroferograma bakoitzari eta, balio horrek elektroferograman banatu diren seinale guztien bereizmena eta analisi denbora totala biltzen ditu (5.5. Irudia). Kontuan izan CRFa zenbat eta handiagoa izan banaketa kromatografikoa hobea dela, eta alderantziz.

CRFren balioak era azkar eta errazean adierazten du elektroferograma baten kalitatea, baina, arazo garrantzitsu bat du, izan ere, bereizmenari eta analisi denborari garrantzi berdina ematen zaie erantzun-funtzioan. Kasu askotan ordea, interesgarria da bi faktore horien arteko garrantzi erlatiboa doitzeko aukera

izatea, eta bibliografian zenbait funtzio deskribatu dira helburu horrekin (Morris *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 2006). Ikerketa honetan, banaketa elektroforetikoak optimizatzeko balio duen erantzun-funtzio kromatografiko aldatua (MCRF, *Modified Chromatographic Response Function*) proposatzen eta deskribatzen da.



5.5. Irudia. BBD batean lortutako kromatogramak eta bakoitzaren CRFa (Felhofer *et al.*, 2009).

MCRF Divjak eta bere lankideen prozeduran oinarritzen da, baina desiragarritasunen konbinaketa egiteko (5.7) ekuazioa erabili behar da.

$$\text{MCRF}(S, g) = \left[\sum_{i=1}^{N-1} e^{\alpha(S_{opt} - S_i)} + 1 \right] \cdot \left[2 - \frac{g}{g_{opt}} \right] \quad (5.7)$$

MCRFn α faktorea sartzen da eta faktore hori da, hain zuzen ere bereizmenari dagokion funtzioaren —(5.7) ekuazioaren ezkerreko atala— eta denborari dagokion funtzioaren —eskuineko atala— doitzeko aukera ematen duena. α parametroari

balio desberdinak emanaz pisu erlatiboak alda daitezke, izan ere, α -ren balioa zenbat eta handiagoa izan bereizmena orduan eta adierazgarriagoa izango da MCRFren balioan —7. kapituluko 7.3.1.1. azpiatalean xehetasun gehiago jaso dira—. Era berean, (5.7) ekuazioan S_{opt} eta g_{opt} ere agertzen dira eta, horiei esker bereizmenaren eta denboraren balio optimoak ezar daitezke, hurrenez hurren.

5.3.1.3. Optimizazioaren garapena

Diseinu esperimentalak, MCRF funtzioa eta RSM metodologia deskribatu ondoren, ikerketa honi dagokion optimizazio prozedurarekin jarraituko da. Azaldu den bezala, elektroforesi kapilarraren kasuan, CCD eta BBD motako diseinuak dira RSMrekin batera erabili diren diseinu ohikoenak (Hanrahan *et al.*, 2007). Adierazi behar da bi arrazoirengatik aukeratu zela ikerketa honetan BBD diseinua, izan ere banaketa kromatografiko luzeak dituzten esperimentuetarako aiposenak dira. Alde batetik, BBD eta beste diseinu esperimentalak alderatuz gero, BBDk Doehlert matrizearen antzeko eraginkortasuna du eta CCD baino eraginkorragoa da. Beti ere kontuan izanik, diseinu esperimentalen ebaluazioan, eraginkortasuna ereduaren esperimentu kopuruaren eta koefiziente kopuruaren arteko erlazioa dela (Ferreira *et al.*, 2007). Bestalde, BBDren beste ezaugarri garrantzitsua da diseinuan ez dagoela faktore guztiak balio maximo edo minimoetan dituen esperimenturik, beraz, muturreko baldintzak saihesten dira.

Literatura zientifikoan (Li eta Fritz, 1999; Geiser eta Veuthey, 2009; Silva, 2011) eta aurrez egindako zenbait saiakuntzatan oinarrituta, honako aldagai hauek aztertu ziren diseinu esperimentalean: 1) SDS kontzentrazioa, 2) sodio dihidrogenofosfato elektrolitoaren kontzentrazioa eta 3) aplikatutako potentzial-diferentzia. Formamida disolbatzaile organikoa aukeratzea hainbat esperimenturen ondorioa izan zen, azetonitriloa, metanola eta FA eta haien konbinazioak aztertu ondoren. BBD diseinuan aipatutako aldagaien zatitzaileak aukeratutako tarteak 5.2. taulan jasota daude.

5.2. Taula. Optimizatutako aldagaiak eta mailak.

Faktoreak	Maila		
	Baxua (-)	Zentrala (0)	Altua (+)
[SDS] mM	165	180	195
[NaH ₂ PO ₄] mM	10	25	40
Potentzial-diferentzia, kV	20	25	30

Bestalde, 4 puntu zentral aztertzea erabaki zen eta, hortaz, diseinuaren 12 esperimentuekin batera, guztira 16 esperimentu egin behar izan ziren (5.3. Taula). Esperimentu guztiak zorizko ordenan egin ziren eta diseinuko esperimentu bakoitzaren elektroferograma erregistratu zen. 5.6. Irudian diseinuan lortutako bi elektroferograma daude ikusgai, hain zuzen ere, seinaleen arteko bereizmen txikieneko eta handieneko elektroferogramak. Irudian, 260 nm-ko uhin luzera dago ikusgai, nahiz eta Galaxolideren kasuan kuantifikazioa 280 nm-tan egin zen. Bestalde, aipatu behar da diseinuko esperimentuetan barne-patroia ez zela kuantitatiboki gehitu eta horregatik dira barne-patroiaren seinalean intentsitateak desberdinak bi esperimentuetan.

5.3. Taula. BBD diseinuaren esperimentuak.

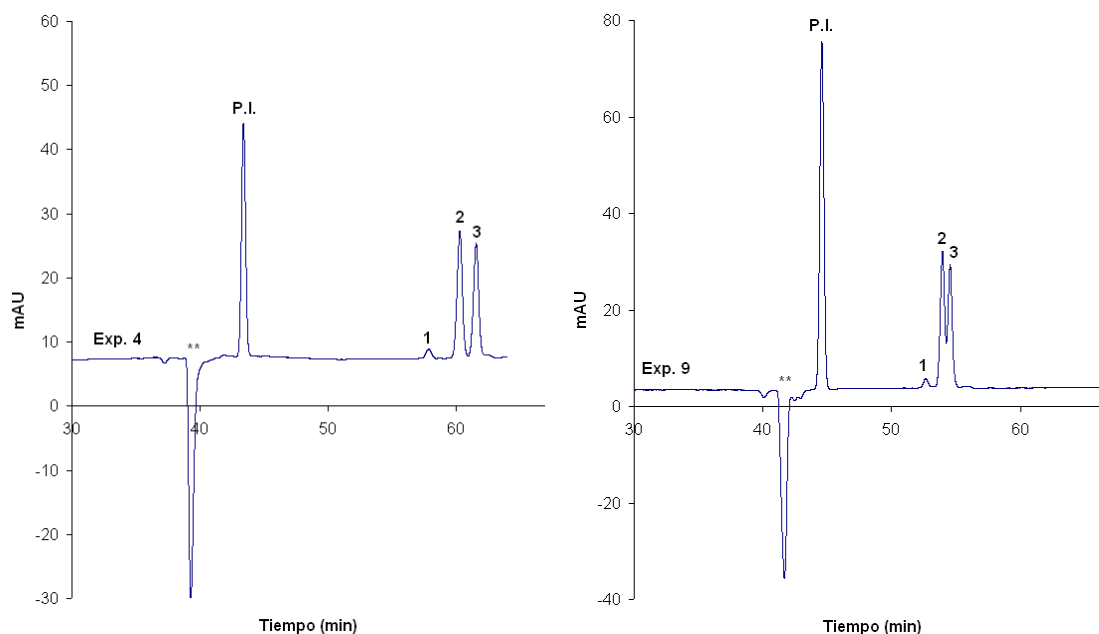
Esperimentua	[NaH ₂ PO ₄], mM	[SDS], mM	Potentzial-diferentzia, kV
1	10	165	25
2	40	165	25
3	10	195	25
4	40	195	25
5	10	180	20
6	40	180	20
7	10	180	30
8	40	180	30
9	25	165	20
10	25	195	20
11	25	165	30
12	25	195	30
13(C)	25	180	25
14(C)	25	180	25
15(C)	25	180	25
16(C)	25	180	25

(C): Puntu zentralak.

BBD diseinu esperimentalean lortutako elektroferogramak jaso ondoren, hurrengo pausoa RSM metodologia aplikatzea zen, alegia, datu esperimentalei ahalik eta hobekien egokituko zen eredu matematikoa bilatzea (Box *et al.*, 1987). Erantzun-gainazalak lortzeko, elektroferograma guztien MCRF balioak kalkulatu ziren eta konparaketak egiteko, CRFak ere bai. MCRF zein CRF balioak kalkulatu aurretik, ordea, beste parametro batzuk finkatu behar ziren.

Ikerketa honen kasuan, lehenago aipatu diren irizpideak erabili ziren bereizmenari dagozkion muga-baldintzak ezartzeko (5.3) ekuazioan (Schlabach eta Excoffier, 1988) eta, hortaz, $S^{k,k+1} = 0,9$ desiragarritasuna eman zitzaion $R^{k,k+1} = 2,0$ bereizmenari eta $S^{k,k+1} = 0,1$ desiragarritasuna $R^{k,k+1} = 0,5$ bereizmenari. Muga-baldintza horiek finkatuta, b_0 eta b_1 parametroen balioak 2,93 eta 3,66 ziren, hurrenez hurren. Balio horiek lortzeko bi muga-baldintzak (5.3) ekuazioan ordezkatu eta ekuazio sistema askatu zen.

Denbora desiragarritasunari dagokionez, ikerketa honetan $g = 0,8$ desiragarritasuna eman zitzaion $T = 35$ min denborari —diseinuko esperimentu motzena— eta $g = 0,1$ desiragarritasuna $T = 73$ min denborari —esperimentu luzeena—. Muga-baldintza horiek finkatuta, b_2 eta b_3 parametroen balioak 0,094 eta -4,69 ziren, hurrenez hurren. Balio horiek lortzeko bi muga-baldintzak (5.5) ekuazioan ordezkatu eta ekuazio sistema askatu zen.



5.6. Irudia. Musketa poliziklikoen analisia NAMEKC bidez. Irudian diseinuko 4 esperimentua (ezkerrean) eta 9 esperimentua (eskuinean) daude ikusgai, diseinu guztiko bereizmen handienekoa eta txikienekoa, hurrenez hurren. Pikoek identifikazioa: 1) Galaxolide, 2) Tonalide, 3) Traseolide eta P.I.) barne-patroia. Detekzioa: 260 nm. Absorbantzia negatiboa duen pikoak (**) EOFaren iritsiera adierazten du.

b_0 , b_1 , b_2 eta b_3 parametroak kalkulatu ondoren, (5.7) ekuazioko gainerako balioak aukeratu behar ziren. Ikerketa honetan, $S_{opt} = 0,9$, $g_{opt} = 0,9$ eta $\alpha = 2$ balioak finkatu ziren. Garrantzitsua da kontuan hartzea proposatutako MCRF funtzioan balio minimoak direla optimoak, alegia, MCRF zenbat eta txikiagoa izan banaketa kromatografikoa orduan eta eraginkorragoa da —CRFren kasuan, aldiz, alderantzizkoa gertatzen da—. 5.4. Taulan diseinuko esperimentu guztien datuak jaso dira, alegia, f , g , CRF eta MCRF balioak. Horietaz gainera 1,2 eta 2,3 seinaleen arteko bereizmena eta elektroferogramaren analisi denbora totala ere jaso dira.

5.4. Taula. BBD diseinu esperimentalaren mailak eta erantzunak, musketa poliziklikoen patroiekin lortutakoak.

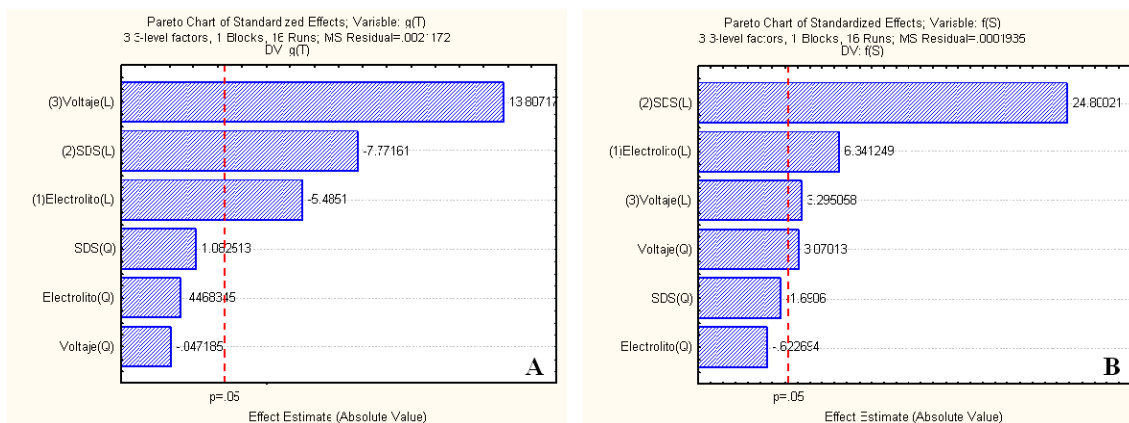
Esp.	[NaH ₂ PO ₄]	[SDS]	P-da	R ^{1,2}	R ^{2,3}	T(min)	f	g	CRF	MCRF
1	10	165	25	1,86	0,98	40,0	0,52	0,75	0,39	6,67
2	40	165	25	2,23	1,10	53,0	0,61	0,48	0,29	7,10
3	10	195	25	2,81	1,52	54,0	0,83	0,45	0,37	5,22
4	40	195	25	3,05	1,62	63,0	0,86	0,27	0,24	5,50
5	10	180	20	2,20	1,18	57,5	0,65	0,38	0,25	7,09
6	40	180	20	2,38	1,31	68,5	0,72	0,19	0,13	7,10
7	10	180	30	2,26	1,21	38,0	0,67	0,78	0,52	5,19
8	40	180	30	2,45	1,35	42,5	0,75	0,70	0,53	4,91
9	25	165	20	1,87	0,91	55,5	0,48	0,42	0,20	8,83
10	25	195	20	2,67	1,49	73,0	0,81	0,13	0,11	6,41
11	25	165	30	2,19	1,03	35,0	0,57	0,82	0,47	5,83
12	25	195	30	2,81	1,54	47,0	0,83	0,61	0,51	4,61
13(C)	25	180	25	2,41	1,29	49,5	0,72	0,56	0,40	5,72
14(C)	25	180	25	2,36	1,25	50,5	0,69	0,54	0,37	6,01
15(C)	25	180	25	2,49	1,24	50,0	0,69	0,55	0,38	5,98
16(C)	25	180	25	2,55	1,31	54,5	0,73	0,45	0,33	6,05

^aPotenzial-diferentzia

Metodoaren optimizazioan, adierazi den bezala, MCRF balioa bakarrik kontuan hartu zen erantzun bezala. CRFren ordez MCRF erabiltzea hobekuntza garrantzitsua izan zen ikerkuntza honetan garatutako metodoa optimizatzerakoan, izan ere, bereizmenaren eta denboraren pisu erlatiboa ezartzeko aukera eman zuen. Elektroferograma guztien MCRFak hartuta, optimizazioaren hurrengo pausoa aplikatu zen, alegia, RSM metodologia erabiliz BBD diseinuko datuei egokituko zen eredu matematikoa lortzea —hasieran azaldu den bezala, horretarako Statistica programa erabili zen—.

Eredu matematikoa doitu ondoren, ereduaren kalitatea bariantzaren analisia (ANOVA, *ANalysis Of VAriance*) erabilita ebaluatu zen. Oro har, ANOVAREN bidez tratamendu estatistikoari dagokion bariantza eta zorizko errorearen kausa den bariantza alderatzen dira (Vieira eta Hoffman, 1989). Konparaketa horri esker erregresioaren doiketa adierazgarria den azter daiteke doiketagabeziaren testa (*lack of fit test*), Fischer testa edo antzekoak erabilia. Ikerketa honen kasuan, datu esperimentalak (5.4. Taula) ANOVAREN bidez aztertu ziren, efektu guztiak eta bigarren mailako elkarrekintza guztiak kontuan hartuta. Datuak PARETO grafiko batean irudikatu ziren eta bertan ikusi zen hiru faktorek zutela kontribuzio adierazgarria MCRFn —%95eko konfiantza mailarekin—: 1) SDS kontzentrazioak, 2) potentzial-diferentziak eta 3) bi efektu horien arteko elkarrekintzak. Elektrolito kontzentrazioaren eragina ez zen adierazgarria, baina, kontzentrazio altuak zertxobait hobetzen zuen MCRF balioa. Bestalde, aipatu behar da eredu matematikoaren egokitasuna bermatuta zegoela lortutako doiketagabezia (*lack of fit*) ez zelako adierazgarria %95eko konfidantzarekin eta ereduaren erregresioa ere onargarria zelako ($R^2 > 0,95$).

Bereizmen desiragarritasuna (f) eta denbora desiragarritasuna (g) bereizita aztertu ziren. Analisi horretan ikusi ahal izan zen bereizmenean SDS kontzentrazioak zuela eraginik handiena —kontzentrazio altuan bereizmen hobeak lortzen ziren—. Potentzial-diferentziak eta elektrolito kontzentrazioak eragin txikiagoa zuten, baina, adierazgarria. Bi kasuetan balio altuetan lortzen ziren bereizmen hobeak. Denborari dagokionez, potentzial-diferentzia altuekin, eta SDS zein elektrolito kontzentrazio txikiekin g balio hobeak lortzen ziren (5.7. Irudia). Grafikoan, barren luzerak efektuaren garrantzia adierazten du —%95eko konfiantza mailarekin— eta zeinuak, aldiz, efektua positiboa edo negatiboa den.

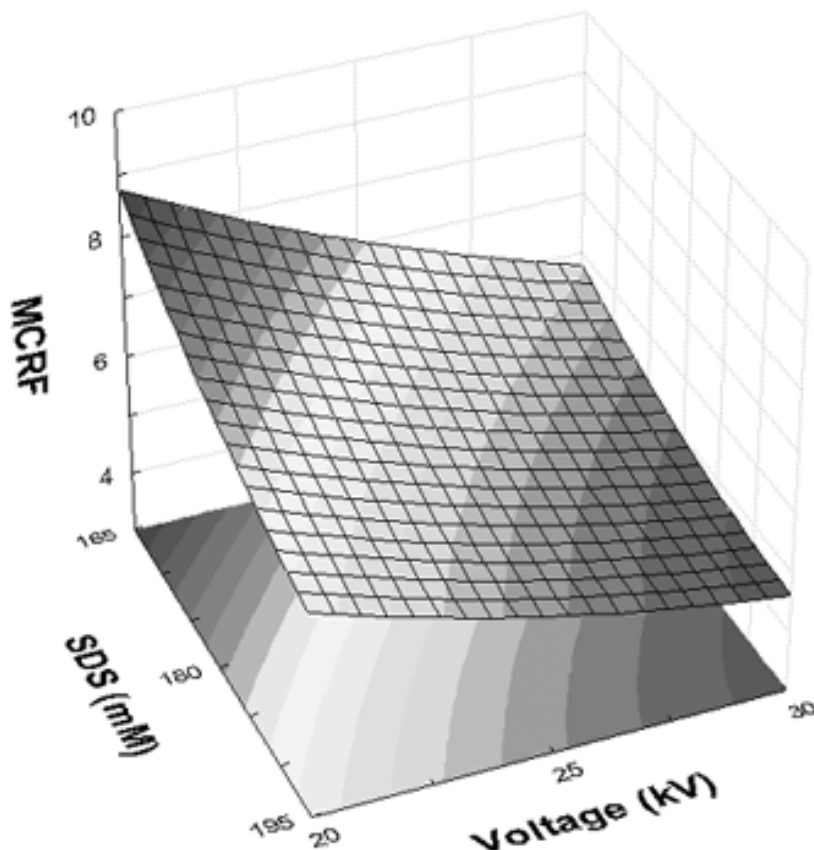


5.7. Irudia. (A) Denbora desiragarritasuna (g) eta (B) bereizmen desiragarritasuna (f) bereizita aztertzeko lortutako PARETO grafikoak.

MCRF globalaren erantzun-gainazala ere irudikatu zen baldintza optimoak lortzeko (5.8. Irudia). Ohartu balio minimoa lortu behar dela baldintza experimental optimoetan. Bestalde, $\alpha = 2$ balioari esker era egokian doitu ahal izan zen bereizmenaren eta analisi denbora totalaren garrantzi erlatiboa. Gainera, RSM metodologiari esker experimentalki egin ez ziren saiakuntzen MCRF balioak aurreikusi ahal izan ziren, eta aldagaien analisi sakonagoa egin ahal izan zen. Diseinuan lortutako MCRF balioen artean minimoa 12 puntuan lortu bazen ere, alegia, 25 mM NaH_2PO_4 , 195 mM SDS eta 30 kV, ereduak MCRF balio optimoak 40 mM NaH_2PO_4 kontzentrazioarentzat zenbatetsi zuen. Hortaz, eredu matematikoa kontuan hartuta, honako baldintza experimental optimo hauek finkatu ziren: 40 mM NaH_2PO_4 , 195 mM SDS eta 30 kV.

5.3.2. Ezaugarri analitikoak

NAMEKC baldintza optimoak finkatu ondoren, metodoaren ezaugarri analitikoak ebaluatu ziren, hala nola linealtasuna eta kalibraketa zuzenekin lotura duten beste parametroak, detekzio eta kuantifikazio mugak, errepikakortasuna, erreproduzigarritasuna, zehaztasuna eta espezifikotasuna.



5.8. Irudia. Eredu matematikoaren arabera MCRFri dagokion erantzun-gainazala. Hirugarren aldagaia, alegia, elektrolito kontzentrazioa, balio optimoan finkatu zen.

5.3.2.1. Kalibraketa zuzenak eta linealtasuna

Kalibraketa zuzenak lortzeko analitoen pikoen azaleraren eta barne-patroiaren azaleraren arteko erlazioa (A_i/A_{bp}) analito kontzentrazioarekiko (C_i) irudikatu zen. Horretarako, bost patroi disoluzio prestatu ziren, 50 – 400 mg/L kontzentrazio tartean —zehazki esanez, 50, 100, 200, 300 eta 400 mg/L-koak—, PCM bakoitzarentzat, hau da, HHCb, AHTN eta ATII. Guztietan 257 mg/L

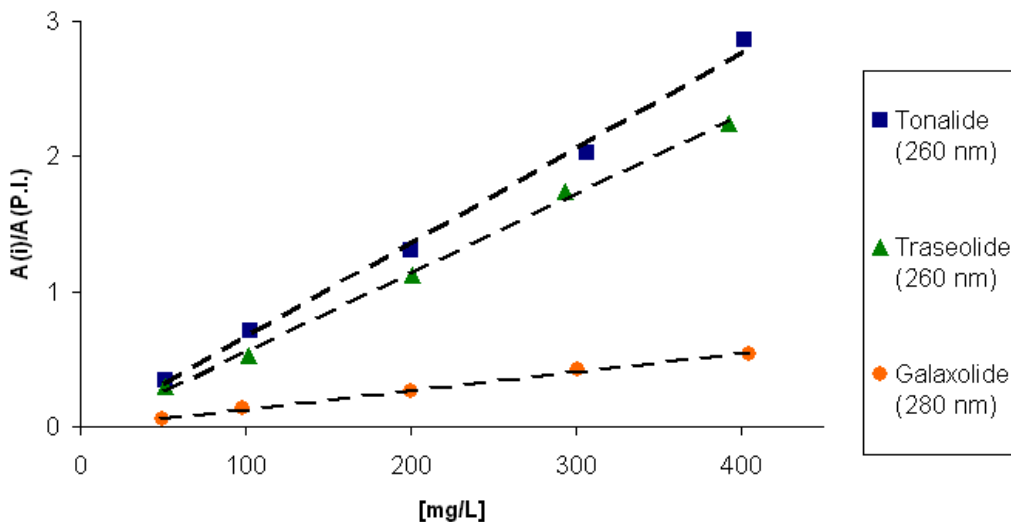
kontzentrazioko barne-patroia (4-metil-3-penten-2-ona) gehitu zitzairen. Patroi guztiak bi aldiz analizatu ziren, zorizko ordenan. 5.5. Taulan kalibraketa zuzenen parametro analitiko garrantzitsuenak jaso dira. Bertan ikus daitekeen bezala, parametro analitikoak onargarriak dira eta lortutako erregresio koefizienteak (r) kasu guztietan 0,997 baino handiagoak dira.

5.5. Taula. Kalibraketa zuzenen parametro analitikoak.

	Galaxolide	Tonalide	Traseolide
Tarte lineala	50-400 mg/L	50-400 mg/L	50-400 mg/L
Malda ^a	$(137 \pm 6) \times 10^{-5}$	$(70 \pm 3) \times 10^{-4}$	$(59 \pm 2) \times 10^{-4}$
Ordenatua jatorrian ^a	$-0,0048 \pm 0,016$	$-0,044 \pm 0,086$	$-0,034 \pm 0,052$
r	0,9978	0,9976	0,9987

^aErrorea %95eko konfiantza tarteari dagokio.

Kalibraketari amaiera emateko, 5.9. Irudian kalibraketa zuzenak daude ikusgai. Bestalde kontuan hartu 1) Galaxolideren kasuan detekzioko uhin-luzera 280 nm izan zela, 260 nm-tan sentikortasuna urriagoa zelako eta 2) elektromigrazio-tekniketan azalera normalizatuak erabiltzea oso ohikoa den arren (Altria, 1993), kasu honetan ez zen hobekuntzarik aurkitu eta azalera bakarrak kontuan hartu ziren. Azalera normalizatuak $A_n = A_i/t_{m,i}$ formularen bidez kalkulatzen dira eta haien erabilpenari buruzko argibideak hurrengo kapituluaz azalduko dira xehetasun gehiagorekin, 6.2.1.1. azpiatalean.



5.9. Irudia. Kalibraketa zuzenen irudikapen grafikoa.

5.3.2.2. Detekzio eta kuantifikazio mugak

Detekzio muga (LOD, *Limit Of Detection*) ziurtasun estatistiko adierazgarriarekin detekta daitekeen analito kontzentrazio txikiena da (JCGM, 2008). LODa kalkulatzeko, $3 \times SD$ adierazpena erabil daiteke, non SD hainbat lagin zurien kontzentrazioaren desbideratze estandarra den. Ikerketa honetan, lagin zurien ordez bibliografian deskribatzen den metodo alternatiboa erabili zen LODa kalkulatzeko (Konieczka eta Namieśnik, 2009). Metodo horren arabera, 10 lagin independente prestatu ziren PCM patrioiak erabiliz, ustezko LODaren inguruko kontzentraziokoak, eta horien desbideratze estandarra hartu zen SD balio moduan. Ustezko LODak zenbatetsi ahal izateko, kalibraketa kurbatik lortutako LODa erabili zen, bai $SD = SD_a$ erabiliz —ordenatu jatorriaren desbiderapena— eta baita $SD = SD_{xy}$ erabiliz —alegia, hondarren desbiderapena (*residual*)—.

Kuantifikazio mugari (LOQ, *Limit Of Quantification*) dagokionez, doitasun, zehaztasun, eta ziurgabetasun jakin batekin kuantifika daitekeen analito kontzentrazio txikiena da (JCGM, 2008) eta, bestek beste, $LOQ = 3 \times LOD$ aplikatuz kalkulatu ohi da. Azaldutakoa kontuan hartuz, HHCbren, AHTNren eta ATIIren LODa eta LOQa kalkulatu ziren (5.6. Taula). Ohartu baliozko LODa eta LOQa lagin independenteekin kalkulaturikoa dela eta beste biak erreferentzia moduan erabili zirela bakarrik.

5.6. Taula. LOD eta LOQ parametroak, mg/L-tan.

	Galaxolide	Tonalide	Traseolide
LOD ^a	31	33	24
LOD ^b	36	38	27
LOD ^c	6,5	3,7	3,3
LOQ ^d	19,4	11,1	9,9

^a $SD = SD_a$

^b $SD = SD_{xy}$

^c $SD = 10$ lagin independenteren desbiderapen estandarra (Konieczka eta Namieśnik, 2009)

^d $LOQ = 3 \times LOD^c$

5.3.2.3. Doitasuna

Doitasuna (*precision*) balio jakin batzuen arteko sakabanaketaren neurria ematen duen parametroa da (JCGM, 2008). Doitasuna zorizko erroreekin lotzen da eta kalkulatzeko era desberdinak badaude ere, guztiak neurketa multzo baten desbiderapen estandarren ebaluazioan oinarritzen dira. Normalean bi parametro

edo ezaugarri analitiko aztertzen dira. Alde batetik, errepikakortasuna neurtzeko baldintza berberetan egiten dira analisiak —erreaktibo bera, analista bera, instrumentazio bera, denbora tarte laburrean eta abar—. Erreproduzigarritasunak, ordea, baldintza *desberdinagoetan* egindako neurketen doitasuna ematen du. Gehienetan zaila izaten denez baldintza guztiak aldatzea, ohikoa da errepikakortasunaren antzeko neurketa egitea, baina, denbora-tarte luzeagoan —adibidez, asteak— eta era horretan, baldintzak aldatzea lortzen da. Kasu horretan, zuzenagoa da erreproduzigarritasunaren orde bitarteko doitasuna dela adieraztea (*intermediate precision*) (Konieczka eta Namieśnik, 2009).

Ikerketa honetan, EURACHEMek proposatutako aholkuei jarraituz (EURACHEM, 1998), 10 neurketa independente baino gehiago egin ziren —12, zehazki esanez— maila desberdinetan —maila altuan eta maila baxuan egin zen—. Errepikakortasuna lortzeko, beraz, 12 lagin independente analizatu ziren NAMEKC metodoa erabiliz eta elkarren segidako bi egunetan. Alde batetik, kontzentrazioaren doitasuna ebaluatu zen eta, bestetik, barne-patroiarekiko analitoek zuten mugikortasun erlatiboaren doitasuna, bi kasuetan %RSD balioak aztertuta. Bitarteko doitasuna (erreproduzigarritasuna) lortzeko, aldiz, 12 analisiak 2 asteko epean egin ziren. Kasu guztietan laginak bi aldiz kuantifikatu ziren. Maila baxuko kontzentrazioa 50 mg/L zen eta maila altukoa, aldiz, 400 mg/L. Emaitzak 5.7. taulan daude ikusgai eta, aipatzekoa da kontzentrazioari dagokion errepikakortasuna kasu guztietan %4,1 azpitik dagoela eta erreproduzigarritasuna %6,4 azpitik, beraz, metodoaren doitasuna onargarria da. Mugikortasun erlatiboaren balio oso onak lortu ziren, izan ere errepikakortasuna %0,8 azpitik dago eta erreproduzigarritasuna %0,9 azpitik.

5.7. Taula. Metodoaren doitasunaren emaitzak (%RSD)

		Galaxolide	Tonalide	Traseolide
Kontzentrazioaren doitasuna				
Errepikakortasuna	C ₁ = 50 mg/L	4,1	1,2	1,1
	C ₂ = 400 mg/L	0,9	1,0	1,0
Erreproduzigarritasuna	C ₁ = 50 mg/L	6,4	4,3	4,5
	C ₂ = 400 mg/L	1,8	1,0	2,3
Mugikortasunaren doitasuna				
Errepikakortasuna	C ₁ = 50 mg/L	0,8	0,5	0,5
	C ₂ = 400 mg/L	0,5	0,5	0,5
Erreproduzigarritasuna	C ₁ = 50 mg/L	0,8	0,8	0,9
	C ₂ = 400 mg/L	0,9	0,8	0,9

5.3.2.4. Zehaztasuna

Zehaztasuna (*accuracy*), definizioz, neurketa baten emaitzaren eta egiazko balioaren arteko hurbiltasuna da. Egiazko balioa, aldiz, neurketa kopuru infinituaren batez bestekoaren eta erreferentziako balioaren arteko hurbiltasuna da (JCGM, 2008). Beraz, esan daiteke zehaztasuna egiatasunaren eta doitasunaren konbinaketa dela. Zehaztasuna hainbat erataria neur daiteke, hala nola 1) zertifikatutako erreferentziako laginak analizatuta, 2) metodo berriaren eta erreferentziako metodo baten bidez lortutako balioak konparatuz eta 3) patrio-gehikuntza metodoaren bidez —alegia, berreskuratze test (*recovery test*) delako metodoa erabiliz—. Ikerketa honetan azken metodo hori erabili zen zehaztasuna ebaluatzeko.

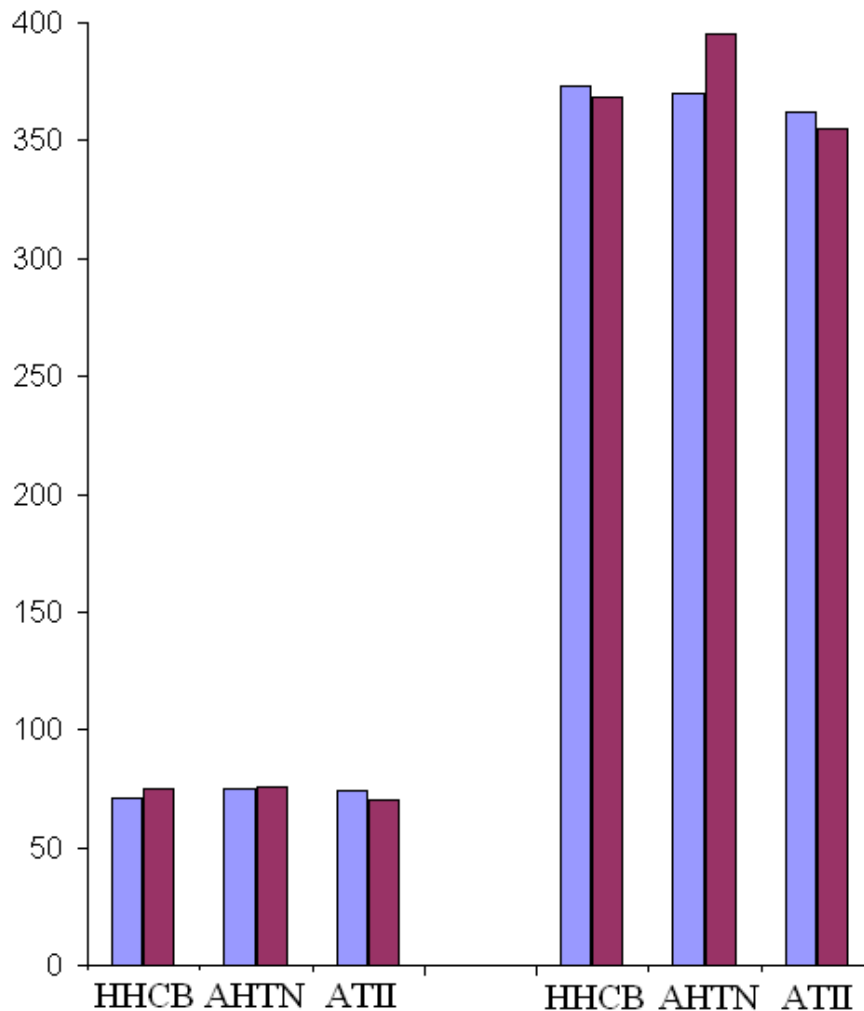
5.8.Taula. Berreskuratze testaren emaitzak perfume laginetan. Kontzentrazioak mg/L-tan daude eta datuak hiru neurketen batez bestekoak dira.

		Galaxolide	Tonalide	Traseolide
Maila baxua	Jarritako kontz.	71,1	74,8	73,8
	Neurtutako kontz.	74,6	75,5	70,6
Berreskuratzea		%104,9	%100,9	%95,7
Maila altua	Jarritako kontz.	372,9	370,3	361,9
	Neurtutako kontz.	368,4	395,1	354,7
Berreskuratzea		%98,8	%106,7	%98,0

Berreskuratze testa egiteko, kontzentrazio ezaguneko PCM kantitateak gehitu ziren analitorik ez zuten perfumeetan eta NAMEKC metodoa erabiliz PCMen kontzentrazioak kalkulatu ziren. Bi kontzentrazio aztertu ziren analito bakoitzaren kasuan, altua eta baxua —70 mg/L eta 370 mg/L—. Lagin bakoitza hiru aldiz analizatu zen eta 5.8. taulako datuak aztertuta ikus daitekeen bezala, testaren emaitzak egokiak izan ziren, berreskuratze balioak %90,0 - %110,0 tartean zeudelako. 5.10. Irudian taulako datuen adierazpen grafikoa dago ikusgai.

Metodoaren ezaugarri analitikoekin amaitzeko aipatu behar da pikoen identifikazioa egiteko UV espektroak eta mugikortasun elektroforetikoak aztertu zirela. Horretaz gainera, beharrezkoa izan zen kasuetan patrioak gehitu ziren perfumeetan analitoen presentzia baieztatzeko, metodoaren espezifikotasuna bermatuz.

Metodoaren balioztapenean lortutako datu guztiek erakusten dute garatutako NAMEKC metodoa egokia eta eraginkorra dela hautatutako PCMak perfumetan kuantifikatzeko.



5.10. Irudia. Berreskuratze analisiaren emaitzak, jarritako eta neurtutako kontzentrazioekin, analito guztien kasurako. Ezkerreko barrek jarritako kontzentrazioak adierazten dituzte eta eskuinekoek, aldiz, laginetan egindako kuantifikazioak.

5.3.3. Aplikazioa

NAMEKC metodoa optimizatu eta balioztatu ondoren, perfumeen analisisian aplikatu zen. Gogoratu optimizatutako metodoak 40 mM NaH_2PO_4 , 195 mM SDS zuela elektrolito-disoluzioan eta formamida dela disolbatzaile organikoa. Injekzioa

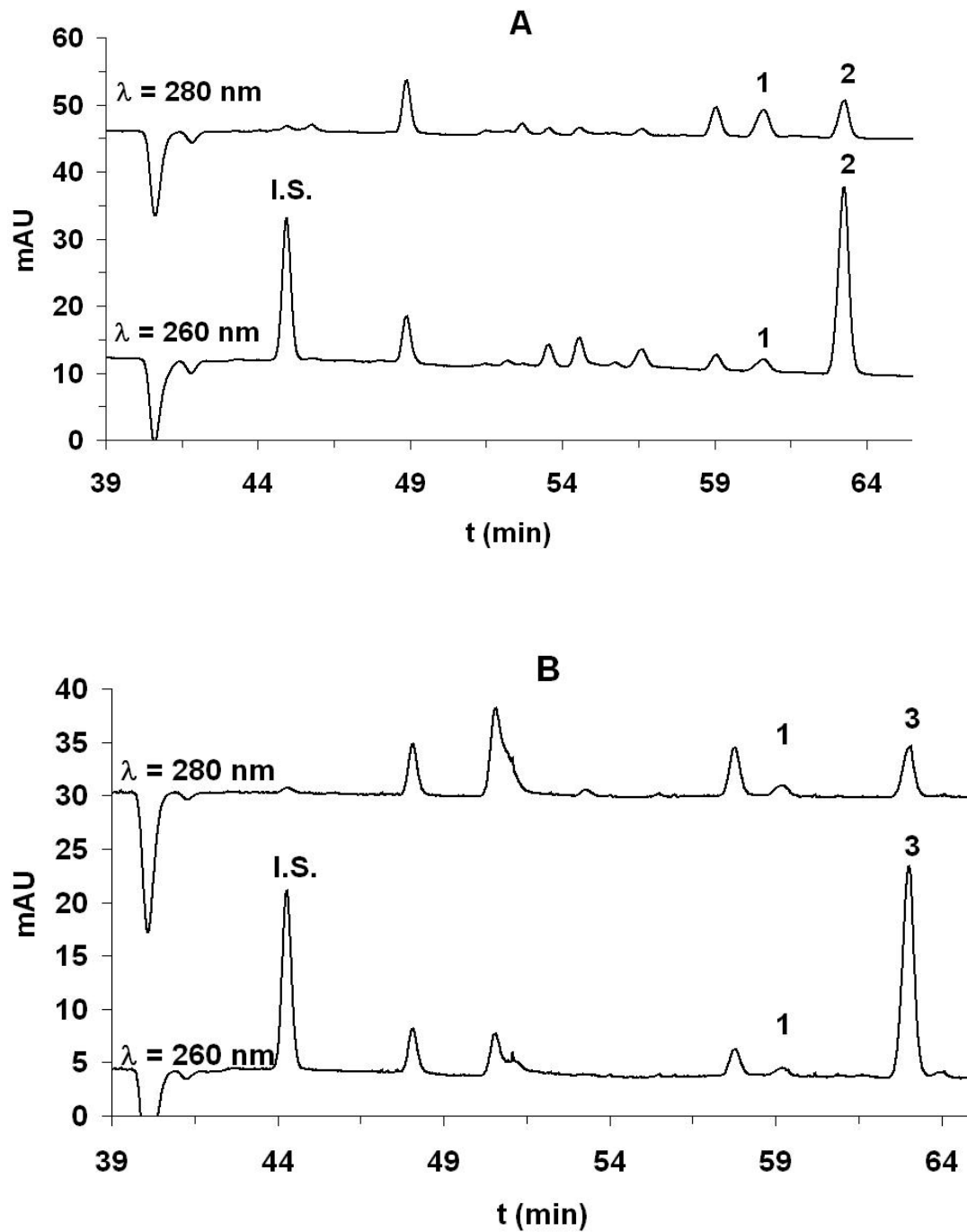
hidrodinamikoa zen eta 45 mbar-eko presioa aplikatu zen 8 segundoz. Potentzial-diferentzia 30 kV-koa izan zen eta detektagailuaren uhin-luzerak 260 nm —barne-patroia, AHTN eta ATII detektatzeko— eta 280 nm —HHCBren kasuan—. 27 perfume analizatu ziren eta lagin bakoitza bi aldiz kuantifikatu zen, batez bestekoa eta desbiderapen estandarra kalkulatu ahal izateko. Laginak 5.2.3. azpiatalean deskribatu den bezala prestatu ziren eta 5.9. taulan jasota daude perfume guztien kasuan lortutako emaitzak.

5.9. Taula. HHCB, AHTN eta ATII kontzentrazioak laginetan (emaitzak: batez bestekoa \pm desbiderapen estandarra).

Perfumea	HHCB		AHTN		ATII	
	g/L	g/kg	g/L	g/kg	g/L	g/kg
2	3,78 \pm 0,04	4,84 \pm 0,05	4,4 \pm 0,1	5,6 \pm 0,2	-	-
3	2,0 \pm 0,1	2,6 \pm 0,1	-	-	-	-
4	4,4 \pm 0,1	5,3 \pm 0,1	3,87 \pm 0,03	4,71 \pm 0,04	-	-
5	2,4 \pm 0,1	3,4 \pm 0,2	-	-	12,2 \pm 0,2	15,6 \pm 0,2
6	2,39 \pm 0,06	2,93 \pm 0,08	3,5 \pm 0,2	4,2 \pm 0,2	-	-
9	7,5 \pm 0,2	9,4 \pm 0,2	-	-	-	-
10	14,9 \pm 0,3	19,3 \pm 0,4	1,13 \pm 0,01	1,47 \pm 0,02	-	-
13	2,84 \pm 0,04	3,49 \pm 0,05	-	-	-	-
14	7,29 \pm 0,01	9,04 \pm 0,01	4,06 \pm 0,05	5,04 \pm 0,06	-	-
17	3,27 \pm 0,02	4,30 \pm 0,03	-	-	-	-
20	3,28 \pm 0,04	4,25 \pm 0,05	-	-	-	-
21	8,78 \pm 0,03	10,68 \pm 0,03	19,6 \pm 0,7	23,8 \pm 0,8	-	-
22	10,2 \pm 0,2	12,2 \pm 0,2	-	-	-	-
23	6,6 \pm 0,3	8,3 \pm 0,4	-	-	-	-
25	3,78 \pm 0,01	4,59 \pm 0,01	0,82 \pm 0,01	1,08 \pm 0,01	-	-
27	2,92 \pm 0,02	3,78 \pm 0,03	1,87 \pm 0,02	2,42 \pm 0,02	-	-

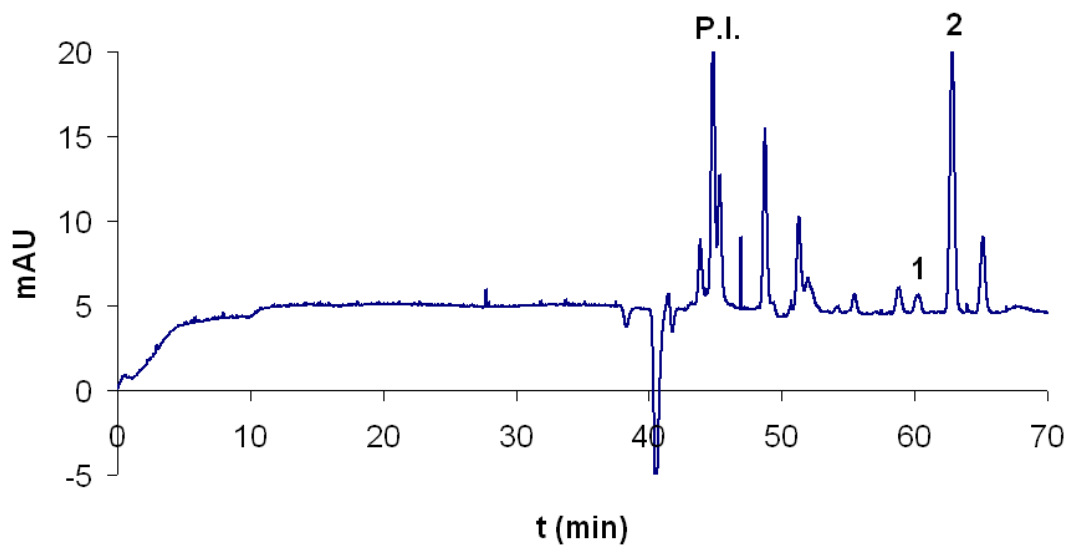
Jarraian ikus daitezkeen 5.11., 5.12., 5.13. eta 5.14. irudietan analisietan lortutako elektroferograma batzuk daude ikusgai.

HHCB 16 perfumetan aurkitu zen (%59,3), AHTN 8 perfumetan (%29,6) eta ATII perfume bakarrean (%3,7). 11 laginetan (%40,7) ez zen PCMRik aurkitu (5.15. Irudia).

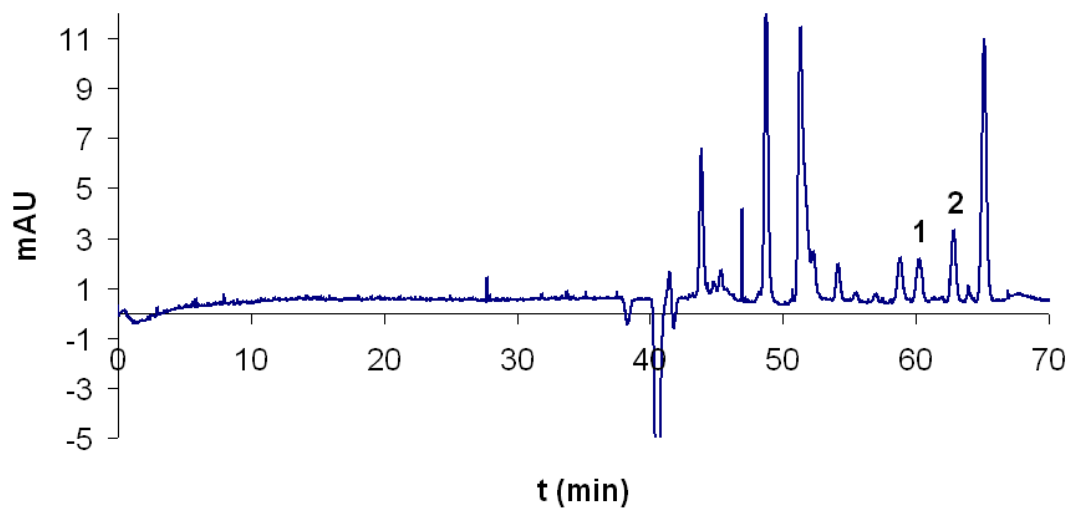


5.11. Irudia. Perfumeen elektroferogramak (A: 2 perfumea eta B: 5 perfumea, ikus. 5.9. taula). Baldintza esperimentalak: 5.2.3. azpiatalean deskribatu direnak. Seinaleen identifikazioa: 1 = HHCB, 2 = AHTN, 3 = ATII, I.S. = Barne-patroia.

Perfume N° 6 - 260 nm

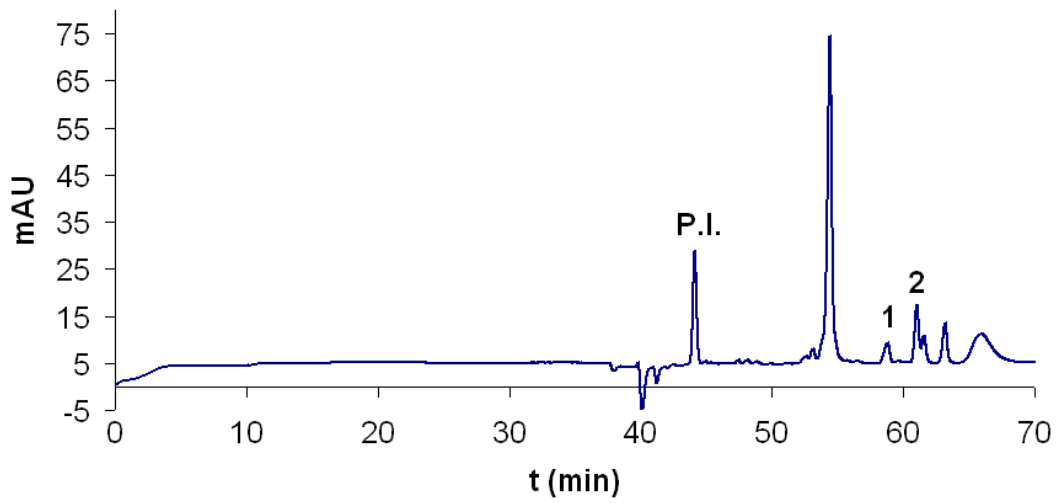


Perfume N° 6 - 280 nm

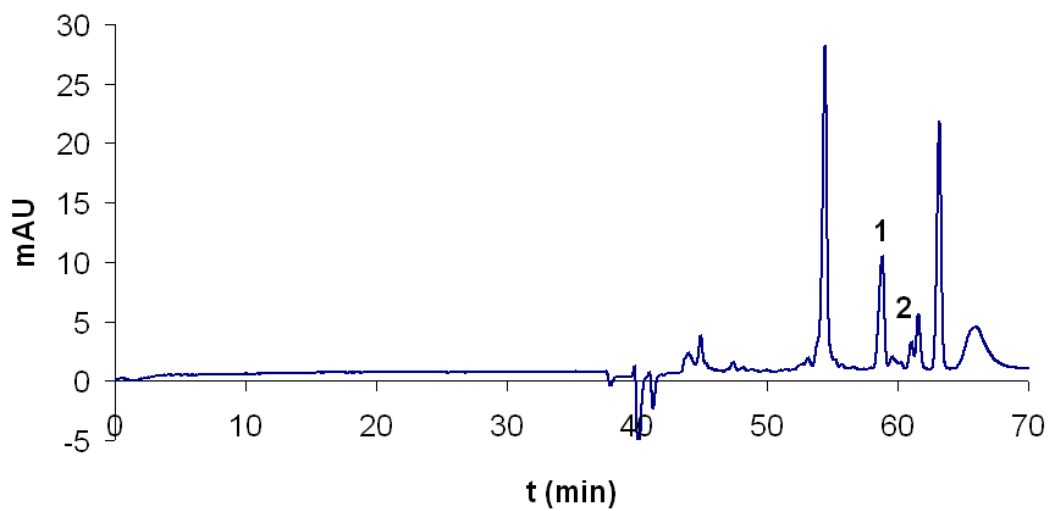


5.12. Irudia. 6 perfumearen elektroferogramak. Baldintza esperimentalak: 5.2.3. azpiatalean deskribatu direnak. Seinaleen identifikazioa: 1 = HHCB, 2 = AHTN, P.I. = Barne-patroia.

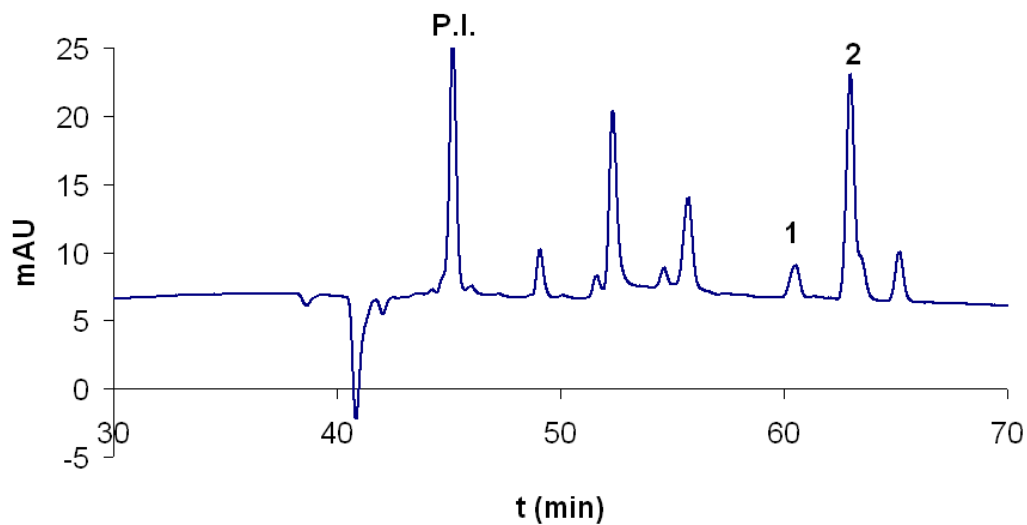
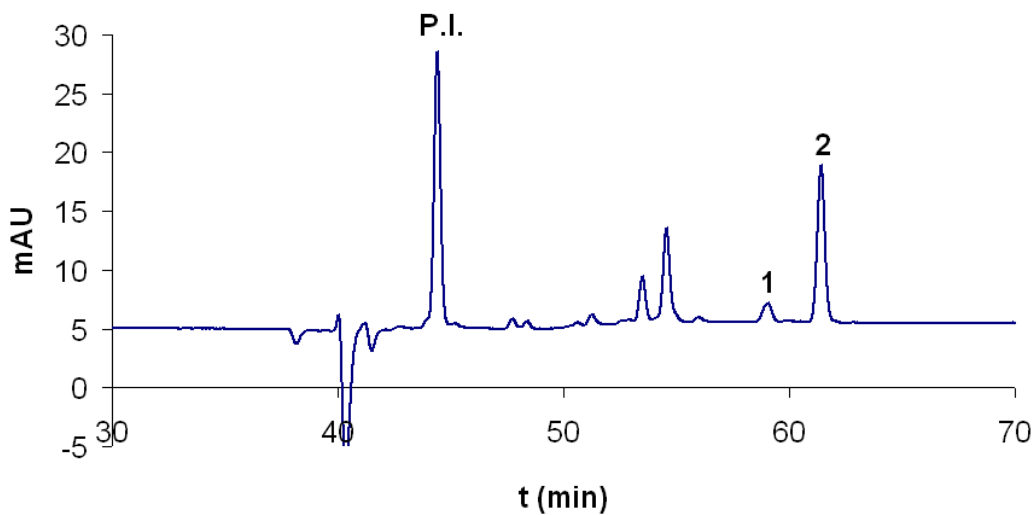
Perfume N° 25 - 260 nm



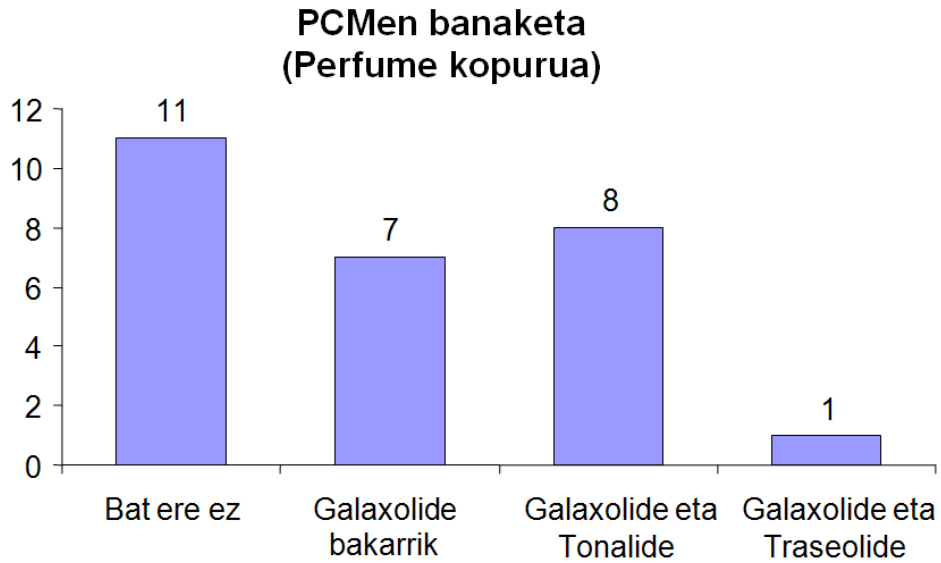
Perfume N° 25 - 280 nm



5.13. Irudia. 25 perfumearen elektroferogramak. Baldintza esperimentalak: 5.2.3. azpiatalean deskribatu direnak. Seinaleen identifikazioa: 1 = HHCB, 2 = AHTN, P.I. = Barne-patroia.

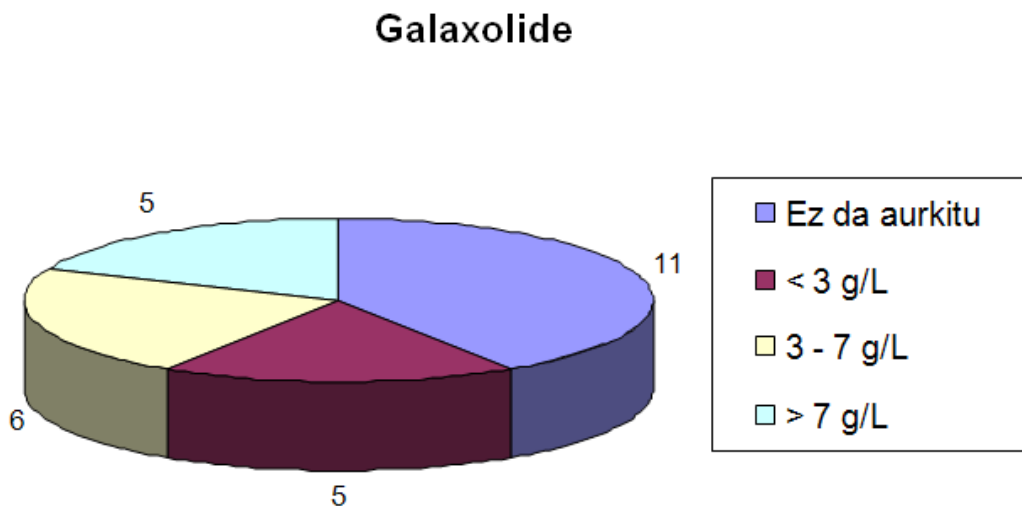
Perfume N° 14 - 260 nm**Perfume N° 27 - 260 nm**

5.14. Irudia. 14 eta 27 perfumeen elektroferogramak. Baldintza esperimentalak: 5.2.3. azpiatalean deskribatu direnak. Seinaleen identifikazioa: 1 = HHCB, 2 = AHTN, P.I. = Barne-patroia.



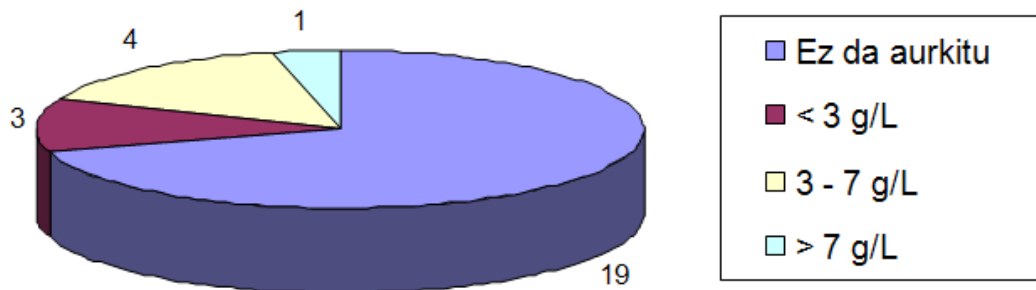
5.15. Irudia. PCMen banaketa aztertutako laginetan.

Kontzentrazioei dagokienez, HHCB 2,6-19,3 g/kg tartean kuantifikatu zen (5.16. Irudia) eta AHTN, aldiz, 1,1-23,8 g/kg kontzentrazio tartean (5.17. Irudia). ATII perfume bakarrak zuen eta bere kontzentrazioa 15,6 g/kg zen. Araudian jasota dagoen PCM bakarra AHTN da eta %2,5eko kontzentrazio maximoa izan dezake (25 g/kg) beraz, aztertu ziren perfume guztiek 1223/2009 araudia betetzen zuten.



5.16. Irudia. Galaxolideren (HHCB) banaketa eta laginetan aurkitutako kontzentrazio tartearak.

Tonalide



5.17. Irudia. Tonalideren (AHTN) banaketa eta laginetan aurkitutako kontzentrazio tartekak.

5.4. Ondorioak

Ikerketa honetan HHCB, AHTN eta ATII musketa poliziklikoak perfumeetan aldeberean determinatzeko NAMEKC metodo sinplea, fidagarria eta merkea garatu da. Lehen ikerketa da ingurune ez-akuosoko elektroforesiari esker PCMak kuantifikatzea ahalbidetzen duena eta laginaren prestakuntza sinplea proposatzen da, ez delako aurretratamendurik behar. Bestalde, elektroforesi kapilarraren aplikazioak zabaldu dira, izan ere, konposatu oso hidrofoboak CE bidez analizatzeko bidea aurkeztu da.

Metodoaren optimizazioari dagokionez, BBD diseinu esperimentalala eta RSM metodologia erabili dira. Proposatutako MCRF erantzun-funtzio berriari esker prozedura elektroforetikoak eta kromatografikoak optimizatzeko era erraza deskribatu da. Seinale guztien arteko bereizmenari eta analisi denbora totalari garrantzi desberdinak emateko aukera ematen du MCRFk eta hori, beste funtzio batzuekin alderatuta, hobekuntza interesgarria da, bereziki analito asko dauden kasuetan.

Metodoak ezaugarri analitiko onargarriak ditu, balioztapen prozesuan ebaluatu den bezala. Guztira 27 perfume analizatu ziren eta, horietako 16tan HHCB aurkitu zen, 8tan AHTN eta bakarrean ATII. AHTNren kasuan, guztiek betetzen

zuten Europako araudiak ezarritako kontzentrazio maximoari dagokion muga (%2,5). Garatutako NAMEKC metodoan, laginaren prestakuntza sinplea da eta, horretaz gainera, metodoa merkea da. Ondorioz, elektroforesian oinarritutako metodo hau GCn edo LCn oinarritutakoen alternatiba interesgarria da, bai aplikazio kualitatiboetan eta baita kuantitatiboetan ere.

5.5. Erreferentziak

Altria, K.D.: *Essential Peak Area Normalisation in Capillary Electrophoresis*, Chromatographia, 35, 177-182, 1993.

Barbetta, L.; Trowbridge, T.; Eldib, I.A.: *Musk Aroma Chemical Industry*, Perfumer Flavorist, 13, 60-61, 1988.

Bezerra, M.A.; Santelli, R.E.; Oliveira, E.P.; Villar, L.S.; Escalera, L.A.: *Response Surface Methodology (RSM) as a Tool for Optimization in Analytical Chemistry*, Talanta, 76, 965-977.

Box, G.E.P.; Behnken, D.W.: *Some New Three Level Designs for the Study of Quantitative Variables*, Thermometrics, 2, 455-475, 1960.

Box, G.E.P.; Hunter, W.G.; Hunter, J.S.: *Statistics for Experimenters: An Introduction to Design, Data Analysis and Model Building*, Wiley, New York, 1987.

Bruns, R.E.; Scarminio, I.S.; Neto, B.B.: *Statistical Design – Chemometrics*, Elsevier, Amsterdam, 2006.

Bu, Q.; Wang, B.; Huang, J.; Deng, S.; Yu, G.: *Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Aquatic Environment in China: A Review*, Journal of Hazardous Materials, 262, 189-211, 2013.

Daughton, C.G.; Ternes, T.A.: *Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Agents of Subtle Change?*, Environmental Health Perspectives, 107, 907-938, 1999.

Divjak, B.; Moder, M.; Zupan, J.: *Chemometrics Approach to the Optimization of Ion Chromatographic Analysis of Transition Metal Cations for Routine Work*, Analytica Chimica Acta, 358, 305-315, 1998.

EURACHEM: *EURACHEM Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods*, EURACHEM Working Group, LGC, 1998.

European Parliament; European Council: *Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on Cosmetic Products (recast)*, Official Journal of the European Union, L342, 59-209, 2009.

Felhofer, J.; Hanrahan, G.; García, C.D.: *Univariate and Multivariate Optimization of the Separation Conditions for the Analysis of Five Bisphenols by Micellar Electrokinetic Chromatography*, *Talanta*, 77, 1172-1178, 2009.

Ferreira, S.L.C.; Bruns, R.E.; Ferreira, H.S.; Matos, G.D.; David, J.M.; Brandao, G.C.; da Silva, E.G.P.; Portugal, L.A.; dos Reis, P.S.; Souza, A.S.; dos Santos, W.N.L.: *Box-Behnken Design: An Alternative for the Optimization of Analytical Methods*, *Analytica Chimica Acta*, 597, 179-186, 2007.

Flores, J.R.; Salcedo, A.M.; Llerena, M.J.V.; Fernández, L.M.: *Micellar Electrokinetic Chromatographic Method for the Determination of Letrozole, Citalopram and Their Metabolites in Human Urine*, *Journal of Chromatography A*, 1185, 281-290, 2008.

Geiser, L.; Veuthey, J.L.: *Non-Aqueous Capillary Electrophoresis 2005-2009*, *Electrophoresis*, 30, 36-49, 2009.

Hanrahan, G.; Montes, R.E.; Pao, A.; Johnson, A.; Gomez, F.A.: *Implementation of Chemometric Methodology in CE: Predictive Investigation of Protein-Ligand Binding*, *Electrophoresis*, 28, 2853-2860, 2007.

Homem, V.; Silva, J.A.; Cunha, C.; Alves, A.; Santos, L.: *New Analytical Method for the Determination of Musks in Personal Care Products by Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe Extraction Followed by GC-MS*, *Journal of Separation Science*, 36, 2176-2184, 2013.

IUPAC Recommendations: *Nomenclature for Chromatography*, *PAC*, 65, 847, 1993.

Jimenez-Diaz, I.; Zafra-Gomez, A.; Ballesteros, O.; Navalo, A.: *Analytical Methods for the Determination of Personal Care Products in Human Samples: An Overview*, *Talanta*, 129, 448-458, 2014.

Joint Committee for Guides in Metrology (JCGM): *International Vocabulary for Metrology – Basic and General Concepts and Associated Terms*, *VIM*, 200, 2008.

Kang, C.S.; Lee, J.-H.; Kim, S.-K.; Lee, K.-T.; Lee, J.S.; Park, P.S.; Yun, S.H.; Kannan, K.; Yoo, Y.W.; Ha, J.Y.; Lee, S.W.: *Polybromated Diphenyl Ethers and Synthetic Musks in Umbilical Cord Serum, Maternal Serum, and Breast Milk from Seoul, South Korea*, *Chemosphere*, 80, 116-122, 2010.

Klaschka, U.; Kolossa-Gehring, M.: *Fragrances in the Environment: Pleasant Odours for Nature?*, Environmental Science and Pollution Research, 14, 44-52, 2007.

Konieczka, P.; Namieśnik, J.: *Quality Assurance and Quality Control in the Analytical Chemical Laboratory, A Practical Approach*, CRC Press, Boca Raton, 2009.

Li, J.; Fritz, J.S.: *Nonaqueous Media for Separation of Nonionic Organic Compounds by Capillary Electrophoresis*, 20, 84-91, 1999.

Liebl, B.; Ehrenstorfer, S.: *Nitro Musks in Human Milk*, Chemosphere, 27, 2253-2260, 1993.

Lin, J.-M.; Nakagawa, M.; Uchiyama, K; Hobo, T.: *Determination of Critical Micelle Concentration of SDS in Formamide by Capillary Electrophoresis*, Chromatographia, 50, 739-744, 1999.

Lin, J.-M.; Nakagawa, M.; Uchiyama, K; Hobo, T.: *Comparison of Three Different Anionic Surfactants for the Separation of Hydrophobic Compounds by Non-Aqueous Capillary Electrophoresis*, Electrophoresis, 23, 421-425, 2002.

Martinez-Girón, A.B.; Crego, A.L.; Gonzalez, J.M.; Marina M.L.: *Enantiomeric Separation of Chiral Polycyclic Musks by Capillary Electrophoresis: Application to the Analysis of Cosmetic Samples*, Journal of Chromatography A, 1217, 1157-1165, 2010.

Mikaeli, S.; Thórsem, G.; Karlberg, B.: *Optimisation of Resolution in Micellar Electrokinetic Chromatography by Multivariate Evaluation of Electrolytes*, Journal of Chromatography A, 907, 267-277, 2001.

Morris, V.M.; Hughes, J.G.; Marriott, P.J.: *Examination of a New Chromatographic Function, Based on an Exponential Resolution Term, for Use in Optimization Strategies: Application to Capillary Gas Chromatography Separation of Phenols*, Analytica Chimica Acta, 755, 235-243, 1996.

Rimkus, G.G.: *Polycyclic Musk Fragrances in the Aquatic Environment*, Toxicology Letters, 111, 37-56, 1999.

Rimkus, G.G.; Wolf, M.: *Nitro Musk Fragrances in Biota from Freshwater and Marine Environment*, Chemosphere, 27, 2253-2260, 1995.

Schlabach, T.D.; Excoffier, J.L.: *Multi-Variate Ranking Function for Optimizing Separations*, Journal of Chromatography A, 439, 173-184, 1988.

Schiavone, A.; Kannan, K.; Horii, Y.; Focardi, S.; Corsolini, S.: *Polybromated Diphenyl Ethers, Polychlorinated Naphthalenes and Polycyclic Musks in Human Fat from Italy: Comparison to Polychlorinated Biphenyls and Organochlorine Pesticides*, Environmental Pollution, 158, 599-606, 2010.

Silva, M.: *Micellar Electrokinetic Chromatography: Methodological and Instrumental Advances Focused on Practical Aspects*, Electrophoresis, 32, 149-165, 2011.

Smital, T.; Luckenbach, T.; Sauerborn, R.; Hamdounb, A.M.; Vega, R.L.; Epel, D.: *Emerging Contaminants-Pesticides, PPCPs, Microbial Degradation Products and Natural Substances as Inhibitors of Multixenobiotic Defense in Aquatic Organisms*, Mutation Research, 552, 101-117, 2004.

Vieira, S.; Hoffman, R.: *Estadística Experimental*, Atlas, Sao Paulo, 1989.

Wang, L.; Khan, S.J.: *Enantioselective Analysis and Fate of Polycyclic Musks in a Water Recycling Plant in Sydney (Australia)*, Water Science and Technology, 69, 1996-2003, 2014.

Xie, Z.; Ebinghaus, R.; Temme, C.; Heemken, O.; Ruck, W.: *Air-Sea Exchange Fluxes of Synthetic Polycyclic Musks in the North Sea and the Artic*, Environmental Science & Technology, 41, 5654-5659, 2007.

Yamagishi, T.; Miyazaki, T.; Horii, S.; Kaneko, S.: *Identification of Musk Xylene and Musk Ketone in Freshwater Fish Collected from the Tama River, Tokyo*, Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 26, 656-662, 1981.

Yu, K.; Lin, Z.; Cheng, Y.: *Optimization of the Buffer System of Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography for the Separation of the Active Components in Chinese Medicine "Shuangdan" Granule by Genetic Algorithm*, Analytica Chimica Acta, 562, 66-72, 2006.

5.6. Published paper: Optimization and validation of a nonaqueous micellar electrokinetic chromatography method for determination of polycyclic musks in perfumes

Josu Lopez-Gazpio
Rosa Garcia-Arrona
Miren Ostra
Esmeralda Millán

Department of Applied
Chemistry, Faculty of Chemistry,
University of the Basque Country
(UPV/EHU), Donostia-San
Sebastián, Spain

Received January 2, 2012
Revised February 9, 2012
Accepted February 10, 2012

Research Article

Optimization and validation of a nonaqueous micellar electrokinetic chromatography method for determination of polycyclic musks in perfumes

A nonaqueous micellar electrokinetic chromatography method was developed for determination of Tonalide[®], Galaxolide[®], and Traseolide[®] polycyclic musks (PCMs). These compounds are widely used as fragrance ingredients in cosmetics. The method was optimized by using a three variable Box-Behnken experimental design and response surface methodology. A modified chromatographic response function was defined in order to adequately weigh the terms in the response function. After optimization of experimental conditions, an electrolyte solution of 195 mM SDS and 40 mM NaH₂PO₄ in formamide was selected for the separation of the three PCMs, and the applied voltage was fixed at 30 kV. The nonaqueous MEKC method was then checked in terms of linearity, limits of detection and quantification, repeatability, intermediate precision and accuracy, providing appropriate values (i.e. RSD values for precision never exceeding 7%, and accuracy 96–107%). Nonaqueous MEKC for determination of the selected compounds was successfully applied to the analysis of commercial perfume samples.

Keywords: Nonaqueous MEKC / Perfume / Polycyclic musk / Response function
DOI 10.1002/jssc.201101113

1 Introduction

Pharmaceutical and personal care products (PPCPs) have received increasing attention as emerging environmental pollutants. Among these PPCPs, musk compounds is one of the most widely studied fragrance group, since they are ubiquitous contaminants in the environment [1, 2].

The first synthetic musks used as an alternative for the natural musk were the so-called nitro musks (musk xylene, musk ketone, and musk moskene) and were discovered in the late 1800s. These compounds, along with other nitro musks (musk tibetene and musk ambrette) dominated the market until the 1990s, when the production rate decreased [3]. This was mainly due to reports on photoallergic reactions [4] and

their high potential for bioaccumulation in human and animals, especially in aquatic biota [5–7].

The decline in nitro musk production was paralleled by an increase of polycyclic musks (PCMs). This second group of synthetic musks comprises several high volume use products, such as Tonalide[®] (AHTN) and Galaxolide[®] (HHCB), and less often used ones, including Traseolide[®] (ATII), Celestolide[®] (ADBI), and Phantolide[®] (AHDI). In 2004, musk xylene, musk ketone, AHTN, and HHCB represented about 95% of the market in Europe for all nitro musks and PCMs [8]. The presence of PCMs in fish and water was firstly reported in 1994 [9] and since then these compounds have been found in a wide range of aquatic environments [10–12], even the Arctic Ocean [13], air [14], and biota [15]. In general, data on the toxicological properties of PCMs are scarce [15, 16] but it has been demonstrated that synthetic musks, such as AHTN, HHCB, and ATII show extremely high multixenobiotic resistance inhibitory potential in aquatic organisms [17].

Several studies have reported the occurrence of HHCB and AHTN in human fat, serum, and breast milk [18, 19]. It has been assessed that the major route of exposure is through percutaneous absorption after dermal application of cosmetics [20]. The relationship between PCM concentrations in plasma and breast milk and the use of cosmetics has been reported [21, 22]. Nowadays, PCMs are commonly used as fragrance ingredients in a huge spectrum of consumer products including perfumes, skin creams, deodorants, soaps, shampoos, laundry detergents, fabric softeners, household

Correspondence: Dr. Esmeralda Millán, Department of Applied Chemistry, Faculty of Chemistry, University of the Basque Country (UPV/EHU), Apt. 1072, 20080 Donostia-San Sebastián, Spain
E-mail: esmeralda.millan@ehu.es
Fax: +34 943015270

Abbreviations: AHTN, 7-acetyl-1,1,3,4,4,6-hexamethyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene; ATII, 1-[2,3-dihydro-1,1,2,6-tetramethyl-3-(1-methylethyl)-1H-inden-5-yl]-ethanone; BBD, Box-Behnken design; CRF, chromatographic response function; FA, formamide; HHCB, 1,3,4,6,7,8-hexahydro-4,6,6,7,8,8-hexamethylcyclopenta[*g*]-2-benzopyrane; MCRF, modified chromatographic response function; NAMEKC, nonaqueous micellar electrokinetic chromatography; PCM, polycyclic musk

— 6 —

Zainketa pertsonalerako produktuetan lurrin alergenok eta kontserbagarriak aldeberean determinatzeko kromatografia elektrozinetiko mizelarrean oinarritutako metodoaren garapena eta optimizazioa

6.1. Sarrera

Zainketa pertsonalerako produktuen (PCP) analisiak interes handia sortu du azken hamarkadetan. PCPak edonon erabiltzen direnez, gizartean kezka dago kosmetikoen osagaien segurtasunari buruz eta baita kontsumitzaileengan izan ditzaketen albo-ondorioei buruz ere. PCPtan gehien erabiltzen diren konposatu garrantzitsuenak aipatu dira dagoeneko, alegia, lurrin alergenok, kontserbagarriak eta UV-iragazkiak. Horietaz gainera, badira beste zenbait ere, esaterako, desinfektatzaileak, ftalatoak, intsektuak uxatzeko produktuak, finkatzaileak eta abar (Brausch eta Rand, 2011). Osagai horiek produktu kosmetiko askotan daude, adibidez, gelak, xanpuak xaboiak, kremak, lozioak, perfumeak, eta baita kosmetikoak ez diren ere, besteak beste elikagaietan, etxerako beste produktuetan eta farmakoetan (Yusa *et al.*, 2012). Dena den, alergia sortzeari dagokionez, aipatutako osagaietatik garrantzi kliniko handiena dutenak lurrinak eta kontserbagarriak dira (Ortiz eta Yiannias, 2004).

3. kapituluaren sakon azaldu da lurrinak edonon aurki daitezkeela eta 3.000 lurrin baino gehiago daudela eskuragarri kosmetikan. Horiek guztietatik, SCCS erakundeak 26 lurrin alergenok (PAS) identifikatu zituen (SCCNFP, 1999; SCCS, 2012), hain zuzen ere 3.1. taulan jasota daudenak. Gogoratu behar da, substantzia alergenok etiketan identifikatuta egon behar direla kontzentrazioa %0,001 baino handiagoa bada kosmetiko iraunkorren kasuan (*leave-on products*) eta %0,01 baino handiagoa bada eliminatzeak diren produktu kosmetikoen kasuan (*rinse-off products*) (European Parliament and European Council, 2009).

Kontserbagarriei buruz ere luze eta zabal hitz egin da 3. kapitulan, eta kosmetikoak mikroorganismoetatik nahiz oxidaziotik babesteko erabiltzen diren osagaiak direla azaldu da. Ohikoenak diren kontserbagarriak parabenoak dira, zalantzarik gabe, eta haien albo-ondorioak xehetasun guztiekin aztertu dira 3.2.1. azpiatalean. Araudiari dagokionez, parabenoak 1223/2009 araudiaren V eranskinen 12. sarreraren daude; araudiak %0,4ko kontzentrazio maximoa ezartzen du banako parabenoentzat eta %0,8koa, aldiz, parabeno nahasteen kasuan. Beste kontserbagarrien artean, erabilpen maila kontuan hartuta, ikerketa honetan kontuan hartu dira azido salizilikoak, azido bentzoikoak eta azido sorbikoak. Bibliografian jasota dago kontserbagarri horiek ere albo-ondorio kaltegarriak eragiteko gai direla (SCCNFP, 2002; SCCP, 2005; Wang, 2013; Yu eta Wu, 2013) eta ondorioz, araudiak ere mugak ezarri dizkie. Hain zuzen ere, azido salizilikoak %0,6-3 tarteko kontzentrazioan erabil daitezke —produktu motaren arabera—, azido bentzoikoak eta azido sorbikoak, aldiz, %2,5 eta %0,6 kontzentrazio maximoetaraino erabil daitezke produktu kosmetikoetan, hurrenez hurren.

Europako araudiaren ondorioz, eta osasunarekiko nahiz ingurugiroarekiko ardurak kontuan hartuta, ezinbestekoa da PCPak analizatzeko metodoak garatzea. Ikerketa honetan 15 konposatu determinatzea erabaki zen eta aukeraketa hori egiteko kontuan hartu ziren, alde batetik, konposatu ohikoenak hautatzea eta, bestetik, talde kimiko desberdinetako analitoak izatea —lurrinen kasuan, 3.2. taulan laburtu dira talde kimikoak—, horrela metodoa konposatu mota desberdinak analizatzeko baliagarria dela frogatzeko. Aukeratutako konposatuak beraz, talde kimiko esanguratsuenetakoak dira —egitura kimikoak 3.1. eta 3.2. azpiataletan daude ikusgai—, eta honela sailkatu ziren:

- a) alkoholak: bentzil alkohola, anisil alkohola, linaloola eta geraniola,
- b) laktonak: kumarina,
- c) konposatu karbonilikoak: zitrala,
- d) fenolak: eugenola eta isoeugenola,
- e) kontserbagarri hidrofiloak: azido bentzoikoak, azido salizilikoak eta azido sorbikoak eta,
- f) kontserbagarri hidrofoboak: metilparabenoa, etilparabenoa, propilparabenoa eta butilparabenoa.

Testu honen 3. kapitulan azpimarratu da kosmetikoen osagaiak aldiberean identifikatzeko eta kuantifikatzeko metodoek duten interesa. Literatura

zientifikoan aurki daitezkeen ikerketak ere jaso dira; kontserbagarrien kasuan nagusiki GC-MS edo HPLC-UV tekniketara oinarritzen direnak (Yang *et al.*, 2010; Sanchez-Prado *et al.*, 2013) (3.5. Taula) eta, lurrin alergenoen kasuan ere GC eta LC dira ohikoenak (Sgorbini *et al.*, 2010; Devos *et al.*, 2012) (3.3. Taula). Aipatutako horiek ere arruntenak dira bi osagai motak aldiberean kuantifikatzeko metodoei dagokienez (Sanchez-Prado *et al.*, 2011; Asimakopoulos *et al.*, 2014).

Elektroforesi kapilarrean oinarritutako teknikak, aldiz, geroz eta garrantzi handiagoa dute eta, gainera, teknika “berdea” da, disolbatzaile eta errektibo kontsumoa murrizten duelako aurrez aipatutako teknikekin alderatuta (Buszewski *et al.*, 2013). 4. kapituluaz azaldu diren elektromigrazio-teknika moten artean, CZE (Dolzan *et al.*, 2013) eta MEKC (Cheng *et al.*, 2012) erabili dira kontserbagarriak kuantifikatzeko eta MEEKC, aldiz, lurrin alergenok analizatzeko (Furlanetto *et al.*, 2010), baina, orain arte ez da lortu aztertutako analitoen aldibereko MEKC banaketa.

Metodo elektroforetikoen optimizazio prozedurak ere geroz eta interes handiagokoak dira eta, era arrakastatsuan aplikatu dira metodoen garapenean. Berriki, Orlandini eta bere lankideek CE metodoen optimizazioari buruzko berrikuspen sakona argitaratu dute gaia jorratuz (Orlandini *et al.*, 2014). Aurreko kapituluaz azaldu den moduan, optimizazio estrategiak aplikatzerakoan erronka handienetako bat kromatograma edo elektroferograma osoa kuantitatiboki ebaluatzeko bidea bilatzea da. Horretarako badira zenbait erantzun- eta helburu-funtzio (*response function*, *objective function*). Duela gutxi argitaratutako berrikuspenean hainbat erantzun-funtzio aztertu dira (Rakic *et al.*, 2013), alegia, Berridge-ren CRFa, Glajch-en helburu-funtzio kromatografikoa, Dose-ren CRFa, Schallbach-en bereizmen kromatografiko estatistikoa, Morris-en funtzio kromatografiko esponentziala, Duarte-ren CRFa eta Stojanovic-en CRFa. Hainbat muga eta baldintza kontuan hartu behar dira erantzun-funtzio motaren arabera. Ikerketa honetan, MCRF proposatu eta erabili zen, zeinaren oinarriak eta deskribapena 5.3.1.2. azpiatalean aurki daitezkeen.

Kapitulu honetan deskribatzen den ikerketaren helburua MEKC teknikaren aplikagarritasuna zabaltzea izan zen, eta horretarako lurrin alergenok eta kontserbagarriak aldiberean banatzeko eta kuantifikatzeko metodoa garatu zen. Bereziki aztertu zen metodoaren optimizazio prozedura. Optimizazioan CCD diseinu esperimentalak erabili zen eta RSM metodologiari esker aztertu zen diseinua. Elektroferogramak era egokian ebaluatzeko MCRF funtzioa erabili zen eta, amaitzeko, optimizatutako eta balioztatutako metodoa zainketa pertsonalerako hainbat produktu analizatzeko erabili zen.

6.2. Materialak eta metodoa

6.2.1. Erreaktiboak

Alkohol bentzilikoa, anisil alkohola, kumarina, eugenola, isoeugenola, zitrala, linaloola, geraniola, metilparabenoa, etilparabenoa, propilparabenoa, butilparabenoa, azido sorbikoa eta sodio tetraborato dekahidratoa (STB) Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania) enpresari erosi zitzaizkion. Azido salizilikoa, azido bentzoikoa, sodio dodezilsulfatoa (SDS) eta metanola (MeOH) Panreac Química S.A. (Bartzelona, Espainia) enpresari erosi zitzaizkion. Zitrala eta isoeugenola nahaste isomerikoak ziren eta, hortaz, bi seinale lortu ziren analito bakoitzarentzat —*cis* eta *trans* isomeroak (3.1. Taula)—. Determinazioari dagokionez, bi seinaleen batura kontuan hartu zen analitoak kuantifikatzerakoan. Erreaktibo guztiek erreaktibo analitiko gradua zuten, testuan besterik aipatzen ez bada. Ikerketan erabilitako ur bidistilatua Aquatron A4D (J. Bibby Sterilin Ltd., Stone, Erresuma Batua) sistemari esker lortu zen.

Stock disoluzioak lurrin alergenoen eta kontserbagarrien 5 g/L disoluzioak ziren, zitralaren eta isoeugenolaren kasuan izan ezik —horienak 10 g/L ziren—. Disoluzioak prestatzeko analitoak MeOH-tan disolbatu ziren, era independentean. Kalibraketan erabilitako disoluzio estandarrek prestatzeko *stock* disoluzioen diluzio egokiak egin ziren %25 (v/v) MeOH zuen ur-disoluzioarekin.

Disoluzio elektrolitiko, estandar eta lagin guztiak iragazi egin ziren injektatu aurretik, 0,45 µm-ko nylon iragazkiak erabiliz (Teknokroma, Bartzelona, Espainia). Era berean, disoluzio guztiak hozkailuan gorde ziren (4°C-tan) eta giro tenperaturara egokitu arte itxaron zen erabili aurretik.

Ikerketaren atal honetan bentzalazetona izan zen hautatutako barne-patroia (IS, *Internal Standard*) eta Fluka (Alemania) enpresari erosi zitzaion. ISaren kontzentrazioa elektroforesiko bialeetan 30 µg/mL zen. Barne-patroia aukeratzeko hainbat saiakuntza egin ziren, izan ere, elektroferogramako lehen eta azken seinaleen tarteko migrazio denborako konposatu bat aurkitu nahi zen, era horretan IS bakarrarekin piko guztiak kuantifikatu ahal izateko. Kuantifikazio prozedura hurrengo azpiatalean azalduko da xehetasun gehiagorekin.

6.2.1.1. Barne-patroia eta azalera normalizatua

Azpiatal honetan barne-patroiaren eta azalera normalizatuen erabilerari buruzko zenbait ohar azalduko dira, ikerketaren hiru kapitulu esperimentaletan interesa dutenak.

Elektroforesi kapilarrean oinarritzen diren tekniketan barne-patroia (IS) erabiltzea ezinbestekoa da zehaztasuna hobetzeko (Altria, 2002; Hasemann *et al.*, 2007). ISari esker, kontrola ezin daitezkeen parametroetan gertatzen diren aldakuntzak zuzen daitezke, esaterako, injekzio bolumena, tenperatura, biskositatea, bialen likido-maila desberdinak, disolbatzailearen lurrunketa, eta abar (Altria, 1996a; Mayer, 2001; Lopez-Gazpio eta Millán, 2013). Bestalde, aipatu den bezala, ISak analitoen antzeko migrazio denbora izan behar du, fluxu elektroosmotikoan gertatzen diren aldakuntzak era egokiagoan orekatzeko. Bibliografian frogatuta dago barne-patroiak zehaztasun hobekuntza adierazgarriak ekartzen dituela, adibidez, zehaztasuna %10 RSDtik %1 RSDra hobetzea lortu zen (Schaeper eta Sepaniak, 2000) eta injekzioaren errepikakortasuna %1,88-2,38 RSDra murriztea lortu zen (Boonkerd *et al.*, 1994).

Azalera normalizatuen erabilerari dagokionez, kontuan hartu behar da, gainerako kromatografia teknikekin gertatzen ez den bezala, elektroforesi kapilarrean analito bakoitzak abiadura desberdina duela detektagailutik igarotzerakoan. Horren arrazoia detektagailua kapilarrean bertan dagoela da, aldiz, beste tekniketan zutabearen amaieran dago detektagailuan, alegia, banaketa gertatu ondoren. Ezaugarri horren ondorioz, elektroforesian analito berak seinale desberdinak ematen ditu, analitoaren abiadura aldatzen bada. 4. kapituluaz azaldu den moduan, abiadura aldaketa hori tenperaturaren eta fluxu elektroosmotikoaren aldakuntzen ondorioz gerta daiteke, besteak beste (Altria, 1996a; Lopez-Gazpio eta Millán, 2013). Azalera normalizatua kalkulatzeko, pikoaren azalera bere migrazio denborarekin zatitzen da, $A_{n,i} = A_i/t_{m,i}$ formularen bidez (Altria, 1993). Bibliografian azaltzen den gisara (Mayer, 2001) beti ez da beharrezkoa azalera normalizatuak erabiltzea, zenbaitetan ez dutelako hobekuntzarik ekartzen —kalterik ere ez— eta antzeko balioak lortzen dira azalera normalizatuekin edo horiek gabe (Altria eta Fabre, 1995). Beste kasu batzuetan, aldiz, derrigor erabili behar dira azalera normalizatuak, hain zuzen ere:

- 1) migrazio denboren aldakuntza handia denengan (Altria, 1993),
- 2) ezpurutasunak azalaren erlaziotik kuantifikatu nahi direnean (Altria, 1996b),
- 3) banaketa kiraletan (Altria *et al.*, 1998) eta,

4) elektroferograma berean azalaren konparaketa egin nahi denean (Pruñonosa *et al.*, 1992).

Azalera normalizatuaren eta barne-patroiaren erabilera aldiberean egiteko, analitoaren kontzentrazioa analitoaren azalera normalizatuaren eta barne-patroiaren azalera normalizatuaren erlazioarekiko irudikatzen da kalibraketan, alegia, $A_{n,i}/A_{n,bp} = (A_i/t_{m,i}) / (A_{bp}/t_{m,bp})$.

Adibide bat azaltzarren, demagun $C_i = 10$ mg/L kontzentrazioa duen estandar disoluzioaren analisiari dagokion kromatograman balio hauek lortzen direla:

- analitoaren azalera 10 unitate arbitrario,
- analitoaren migrazio denbora 5 min,
- barne-patroiaren azalera 20 unitate arbitrario eta,
- barne-patroiaren migrazio denbora 8 min.

Kasu horretan, A_n/A_{bp} erlazioa $(10/5)/(20/8) = 0,8$ izango da. Kalibraketa zuzena irudikatzeko, hortaz, $C_i = 10$ mg/L kontzentrazioari 0,8 balioa dagokio.

6.2.2. Instrumentazioa eta prozedura

Esperimentu guztiak aurrera eramateko Agilent G7100A CE ekipoa (Agilent Technologies International Sarl, Morges, Suitza) erabili zen; ekipo horrek lerrokatutako diodoen ultramore-ikusgai detektagailua (DAD) zuen. *Chemstation Software (Rev. B.04.02)* delakoa zuen ekipoa kontrolatzeko eta datuak jasotzeko. Diseinu esperimental eta erantzun-gainazalen analisia egiteko Statistica 6.0 softwarea erabili zen (StatSoft, Inc., Tulsa, AEB).

Kapilarrak 50 μm -ko barne diametroa zuen eta 64,5 cm luze zen; bestetik, 56 cm-ko luzera eraginkorra zuen —hau da, detektagailurainoko luzera—. Detekzio zelda *extended light path* motakoa zen (*bubble cell*) eta silize urtuzkoa zen (Agilent Technologies).

Kapilarra lehen aldiz erabili aurretik 1 M NaOH (15 min), 0,1 M NaOH (15 min) eta ur bidistilatua (15 min) igaroarazi ziren. Injekzio batetik bestera kapilarra garbitzeko 0,1 M NaOH (3 min), ur bidistilatua (3 min) eta BGE disoluzioa (5 min) igaroarazi ziren.

Optimizatutako MEKC metodoan erabilitako disoluzio mizelar elektrolitikoaren (BGE, *BackGround Electrolyte*) konposaketa honako hau zen: 24 mM STB eta 100 mM SDS, %10 (v/v) MeOH ur-disoluzioan eta pH = 9,0 doituta —HCl 0,5 M tantak erabiliz—. BGen MeOH gehitzea ezinbestekoa zen analito hidrofoboaren hauspeaketa saihesteko eta ahalik eta kontzentrazio txikienean gehitu zen, alegia, %10 (v/v).

Lagina eta estandarrak injektatzeko 45 mbar-eko presioa aplikatu zen 8 segundoz —injekzio hidrodinamikoa— eta banaketa lortzeko 30 kV-ko potentzial-diferentzia konstantea aplikatu zen. Bialetan jarritako elektrolito disoluzioa analisi bakoitzaren ondoren berritu egin zen, migrazio denboraren errepikakortasuna hobetzeko. Kapilarraren tenperatura 25 °C-tan finkatu zen.

Detektagailuan 210 nm-ko uhin-luzera finkatu zen analitoak kuantifikatzeko, azido sorbikoaren (260 nm) eta zitalaren (240 nm) kasuan izan ezik. Pikoaren identifikazioa egiteko 190-400 nm-ko tartean erregistratuz zen espektro osoa. Beharrezkoa zenean, pikoaren identifikaziorako ISarekiko migrazio denbora erlatiboa kalkulatu zen edota laginei patroien disoluzio estandarra gehitu zitzaion.

6.2.3. Laginak eta laginen prestaketa

Guztira 29 PCP analizatu ziren eta Gipuzkoako hainbat dendatan lortu ziren borondatezko kolaboratzaileei esker. *Leave-on* eta *rinse-off* kosmetikoak analizatu ziren, araudiak bereizita aipatzen dituelako eta, hortaz, muga desberdinak dituztelako. Xanpuak, gelak, xaboiak, perfumeak eta kremak aztertu ziren, eta baita aho-antiseptikoak eta aire-gozagarriak ere.

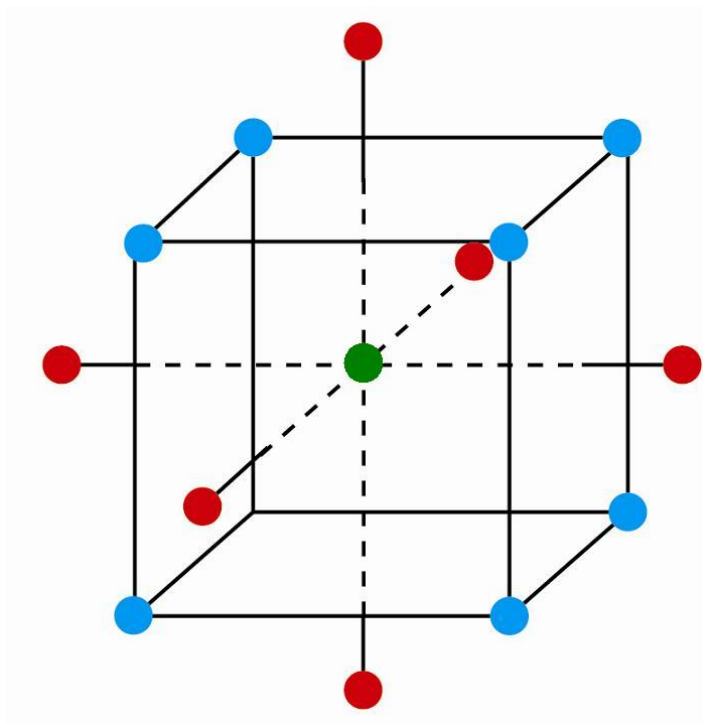
Laginen prestaketa prozedura sinplea izan zen: zehazki pisatutako lagin kantitatea %25 (v/v) MeOH zen ur-disoluziotan disolbatu zen. Ultrasonikazioa aplikatu zen 2-4 minutuz lagina disolbatzeko beharrezkoa zenean. Ondoren, ISA gehitu zen eta 0,45 µm-ko nylon iragazkiak erabiliz iragazi egin zen. Azkenik, zuzenean ipini zen disoluzioa CE bialetan analizatzeko. Laginen analisisa, hortaz, aurretratamendurik gabe egin zen; tratamendu bakarra PCPa diluitzea eta barne-patroia gehitzea izan zen. Analitoak kontzentrazio oso desberdinetan zeudenez, normalean diluzio bat baino gehiago egin behar izan zen lagin bakoitzarekin. Aipatu den bezala, kuantifikazioa barne-patroiaren metodoa erabiliz egin zen.

6.3. Emaitzak eta eztabaida

6.3.1. Metodoaren optimizazioa

6.3.1.1. Diseinu esperimentalaren deskribapena

Ikerkuntzaren atal honetan, MEKC metodoa optimizatzeko 3 aldagaiko diseinu konposatu zentrala (CCD) erabili zen. Horren bitartez, erantzun-gainazalak irudikatu eta desiragarritasun optimoari zegozkion baldintza esperimentalak aurkitu ziren. CCDa diseinu faktorial osoaz, zatikatuaz, puntu zentralaz eta izar puntuz osatuta dago (6.1. Irudia). Aurreko kapituluan aipatu den moduan, CCDren kasuan, $N = 2^k + 2k + C_0$ formularen bidez kalkulatzen da esperimentu kopurua, zeinetan k aldagai kopurua eta C_0 puntu zentral kopurua diren.



6.1. Irudia. CCD diseinu esperimentalaren adierazpen grafikoa. Kuboaren erpinak (urdinez), izar puntuak (gorriz) eta puntu zentrala (berdez) bereizten dira.

CCD diseinuaren rotatabilitatea ezartzeko, alegia, izar puntuek puntu zentraletik duten distantzia, $\alpha = \pm 1,682$ finkatu zen (6.1. Taula). Kasu honetan, CCD aukeratu zen bere eraginkortasunaren eta malgutasunaren ondorioz, izan

ere, esperimendu kopuru nahiko txikiarekin informazio asko eskaintzen du. BBDren alternatiba baztertu egin zen aldagai guztiak aldeberean muturreko balioan egoteko aukera aztertu nahi zelako (Hanrahan *et al.*, 2008).

6.1. Taula. CCD diseinuaren maila kodifikatuak, hiru aldagaien kasurako ($\alpha = \pm 1,682$).

Esperimentua	x_1	x_2	x_3
1	-1	-1	1
2	-1	-1	-1
3	-1	1	1
4	-1	1	-1
5	1	-1	1
6	1	-1	-1
7	1	1	1
8	1	1	-1
9	-1,682	0	0
10	1,682	0	0
11	0	-1,682	0
12	0	1,682	0
13	0	0	1,682
14	0	0	-1,682
C	0	0	0

6.3.1.2. Optimizazioaren garapena

Literatura zientifikoan (Wang *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2007) eta aurrez egindako saiakuntzetan oinarrituta, aldagai eta maila hauek —baxua, tarteko eta altua— aztertu ziren diseinu esperimentalean: 1) SDS kontzentrazioa —95, 100 eta 105 mM—, 2) STB kontzentrazioa —26, 30 eta 34 mM— eta 3) pHa —9,0, 9,2 eta 9,4— (6.2. Taula).

6.2. Taula. Optimizatutako aldagaiak eta mailak.

Faktoreak	Maila		
	Baxua (-)	Zentrala (0)	Altua (+)
[STB] mM	26	30	34
[SDS] mM	95	100	105
pH	9,0	9,2	9,4

Aukeraketa hori egiteko, aipatu behar da MEKC banaketetan garrantzi gehien duten aldagaiak honako hauek direla (Felhofer eta Garcia, 2010): 1) surfaktante kontzentrazioa, 2) elektrolito kontzentrazioa, 3) BGEren pHa, 4) gehigarri

organikoak eta 5) aplikatutako potentzial-diferentzia. Azaldu den moduan, BGEan MeOH gehitzea ezinbestekoa zen analito hidrofoboaren hauspeaketa saihesteko eta ahalik eta kontzentrazio txikienean gehitu zen, alegia, %10 (v/v). Potentzial-diferentzia maximoa finkatu zen (30 kV) aurreko saiakuntzetako eskarmentuan oinarrituta eta, hortaz, surfaktante kontzentrazioa, elektrolito kontzentrazioa, eta pHa ziren optimizatu beharreko aldagai garrantzitsuenak.

Aldagaien mailak ezartzeko (6.2. Taula), aldiz, MEKC metodoen garapenerako gomendio generikoak kontuan hartu ziren (Altria eta McLean, 1998), baina, batez ere Palmer-en prozedura izan zen oinarri (Palmer, 2003). Prozedura horren arabera, hasierako baldintza generikoak 40 mM SDS, 30 mM STB eta pH = 9,2 dira. Azken biak bere horretan mantendu ziren —diseinuko puntu zentralizat hartu zena—, baina, SDS kontzentrazioa 100 mM-era igo zen atxikipena txikiegia zelako 40 mM kontzentrazioan. Aldagai esperimentalak eta haien mailak ezarri ondoren, diseinu osoa prestatu zen (6.3. Taula).

6.3. Taula. CCD diseinuaren esperimentuak.

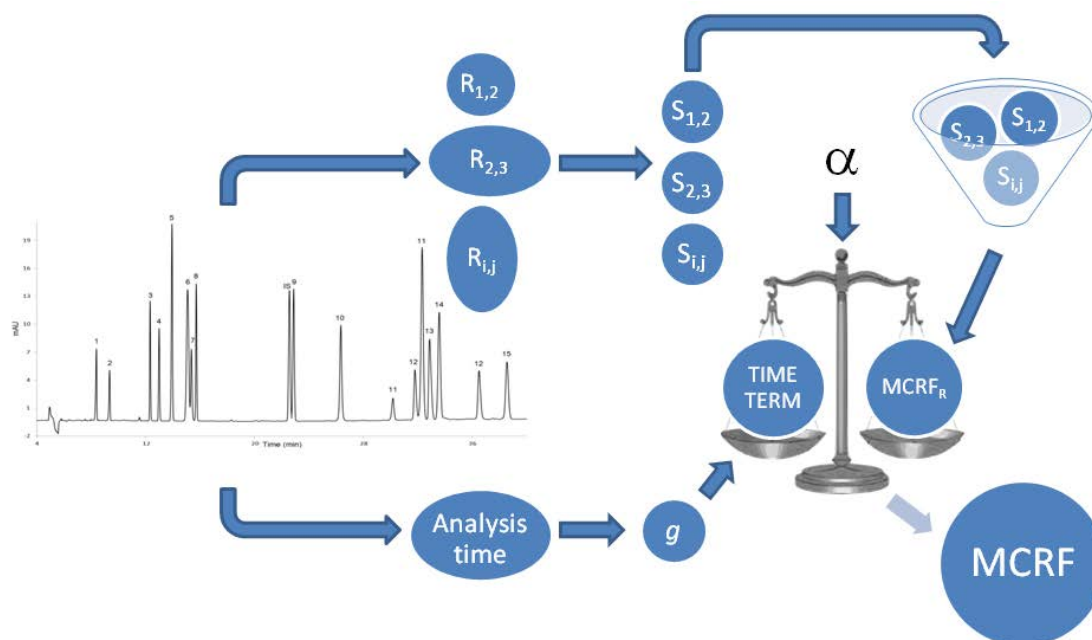
Esperimentua	[STB], mM	[SDS], mM	pH
1	26	95	9,4
2	26	95	9,0
3	26	105	9,4
4	26	105	9,0
5	34	95	9,4
6	34	95	9,0
7	34	105	9,4
8	34	105	9,0
9	23,3	100	9,2
10	36,7	100	9,2
11	30	91,6	9,2
12	30	108,4	9,2
13	30	100	9,5
14	30	100	8,9
15(C)	30	100	9,2
16(C)	30	100	9,2
17(C)	30	100	9,2

(C): Puntu zentralak.

2 puntu zentral gehitzea erabaki zenez, diseinuaren 15 esperimentuekin batera, guztira 17 esperimentu egin behar izan ziren. Esperimentu guztiak zorizko ordenan egin ziren eta diseinuko esperimentu bakoitzaren elektroferograma erregistratu zen. Diseinurako analito guztien nahaste estandarra prestatu zen, eta bertan aurrerago kalibraketan erabiliko ziren kontzentrazioen tarteko kontzentrazioa aukeratu zen, gutxi gorabehera.

CCD diseinu esperimentalean lortutako elektroferogramak erregistratu ondoren, hurrengo pausoa RSM metodologia aplikatzea izan zen, alegia, datu esperimentalei ahalik eta hobekien egokituko zen eredu matematikoa bilatzea,

5.3.1.2. azpiatalean deskribatu den moduan. Erantzun-gainazalaz lortzeko, kasu honetan ere, elektroferograma guztien MCRF balioak kalkulatu ziren (6.2. Irudia) eta konparaketak egiteko, CRFak ere bai.



6.2. Irudia. MCRF balioa lortzeko jarraitzeko prozedura eskematikoa (ikus. 5.3.1.2. azpiatala). R : Seinaleen arteko bereizmena, S : bereizmen desiragarritasun normalizatua, g : denbora desiragarritasun normalizatua, MCRF: Erantzun-funtzio kromatografiko aldatuaren balioa, $MCRF_R$: MCRFren bereizmen atala, $Time Term$ (edo $MCRF_T$) MCRFren denbora atala, α : bereizmenaren eta denboraren garrantzi erlatiboa doitzeko parametroa (Lopez-Gazpio *et al.*, 2014).

Era berean, ikerketa honetan interes berezia duenez MCRFaren bereizmenari dagokion atala ($MCRF_R$), hau da, (5.7) ekuazioaren ezkerreko atala ere berezita aztertu zen.

$$MCRF(S, g) = \left[\sum_{i=1}^{N-1} e^{\alpha(s_{opt} - s_i)} + 1 \right] \cdot \left[2 - \frac{g}{g_{opt}} \right] \quad (5.7)$$

Dena den, MCRF zein CRF balioak kalkulatu aurretik b_0 , b_1 , b_2 eta b_3 parametroak lortu behar dira —(5.3) eta (5.5) ekuazioetan daudenak—.

$$S^{k,k+1} = \frac{1}{1 + e^{-b_0 \cdot R^{k,k+1} + b_1}} \quad (5.3)$$

$$g = \frac{1}{1 + e^{b_2 \cdot T + b_3}} \quad (5.5)$$

Ikerketaren atal honetan, 5. kapituluuan aipatu diren irizpideak erabili ziren bereizmenari dagozkion muga-baldintzak ezartzeko (5.3) eta, hortaz, $S^{k,k+1} = 0,9$ desiragarritasuna eman zitzaion $R^{k,k+1} = 2,0$ bereizmenari eta $S^{k,k+1} = 0,1$ desiragarritasuna $R^{k,k+1} = 0,5$ bereizmenari. Muga-baldintza horiek finkatuta, b_0 eta b_1 parametroen balioak 2,93 eta 3,66 ziren, hurrenez hurren. Denbora desiragarritasunari dagokionez, ikerketa honetan $g = 0,8$ desiragarritasuna eman zitzaion $T = 34$ min denborari —diseinuko esperimentu motzena— eta $g = 0,1$ desiragarritasuna $T = 71$ min denborari —esperimentu luzeena—. Muga-baldintza horiek finkatuta, b_2 eta b_3 parametroen balioak 0,097 eta -4,68 ziren, hurrenez hurren.

Ondoren, (5.7) ekuazioko gainerako balioak aukeratu behar ziren. Ikerketa honetan, $S_{opt} = 0,9$, $g_{opt} = 0,9$ eta $\alpha = 3$ balioak finkatu ziren eta, azken parametro horri esker lortu zen MCRFaren denboraren eta bereizmenaren garrantzia era egokian doitzea. Garrantzitsua da gogoratzea proposatutako MCRF funtzioan balio minimoak direla optimoak, alegia, MCRF zenbat eta txikiagoa izan banaketa kromatografikoa orduan eta eraginkorragoa da —CRFren kasuan, aldiz, alderantzizkoa gertatzen da—. 6.4. Taulan jaso dira CCDaren esperimentu guztien datuak dira, alegia, f , g , CRF eta MCRF balioak. Horietaz gainera, analisi denbora totala, banatutako piko kopurua (RP, *Resolved Peaks*) eta R_{cp} (*Resolution of the Critical Pair*) ere jasota daude. R_{cp} -ri esker piko guztien artean banaketa eskasena duen analito parearen bereizmena ebalua daiteke.

Lehenago aipatu den bezala, CCD diseinu esperimentalean lortutako elektroferogramak jaso ondoren, hurrengo pausoa RSM metodologia aplikatzea zen, alegia, datu esperimentalei ahalik eta hobekien egokituko zen eredu matematikoa bilatzea. Erantzun-gainazalak lortzeko, elektroferograma guztien MCRF balioak kalkulatu ziren eta konparaketak egiteko, CRFak ere bai; nahiz eta azken optimizazioan lehena bakarrik kontuan hartu. Kasu honetan ere, CRFren ordeztu MCRF erabiltzea hobekuntza garrantzitsua izan zen ikerkuntza honetan garatutako metodoa optimizatzerakoan, izan ere, bereizmenaren eta denboraren pisu erlatiboa ezartzeko aukera eman zuen. Kapitulu honetan, gainera, hobekuntza hori aurreko kapituluaren deskribatutakoa baino askoz ere nabarmenagoa da, izan ere, zenbat eta analito gehiago egon zailagoa gertatzen da erantzun-funtzioa erabili gabe metodoa optimizatzea.

CCD diseinuko datuei egokituko zen eredu matematikoa lortu ondoren —hasieran azaldu den bezala, horretarako Statistica programa erabili zen—, ANOVaren bidez ebaluatu zen.

6.4. Taula. CCD diseinu esperimentalaren mailak eta erantzunak, lurrin alergeno eta kontserbagarriekin patroiekin lortutakoak.

Esp.	[STB]	[SDS]	pH	RP	R _{cp}	T _(min)	f	g	CRF	MCRF _R	MCRF
1	26	95	9,4	17	0	35	0,60	0,78	0,47	45,54	51,44
2	26	95	9,0	18	0	37	0,66	0,75	0,49	40,45	47,26
3	26	105	9,4	16	0	44	0,52	0,60	0,31	52,78	70,28
4	26	105	9,0	19	0,5	49	0,82	0,48	0,39	27,43	40,17
5	34	95	9,4	18	0	51	0,68	0,43	0,30	38,84	58,96
6	34	95	9,0	17	0	55	0,55	0,34	0,19	51,40	83,28
7	34	105	9,4	17	0	67	0,64	0,14	0,09	40,16	74,09
8	34	105	9,0	18	0	71	0,77	0,10	0,08	28,85	54,51
9	23,3	100	9,2	18	0	34	0,72	0,80	0,58	33,82	37,60
10	36,7	100	9,2	19	0,5	73	0,83	0,08	0,07	26,47	50,49
11	30	91,6	9,2	18	0	42	0,62	0,65	0,40	47,13	60,38
12	30	108,4	9,2	17	0	49	0,52	0,48	0,25	52,78	77,31
13	30	100	9,5	18	0	51	0,61	0,43	0,27	46,87	71,15
14	30	100	8,9	19	1,3	62	0,95	0,21	0,20	16,46	29,10
15(C)	30	100	9,2	19	0,7	54	0,84	0,36	0,31	26,39	42,10
16(C)	30	100	9,2	19	0,7	55	0,85	0,34	0,29	26,10	42,28
17(C)	30	100	9,2	19	0,7	57	0,85	0,30	0,25	25,77	42,95

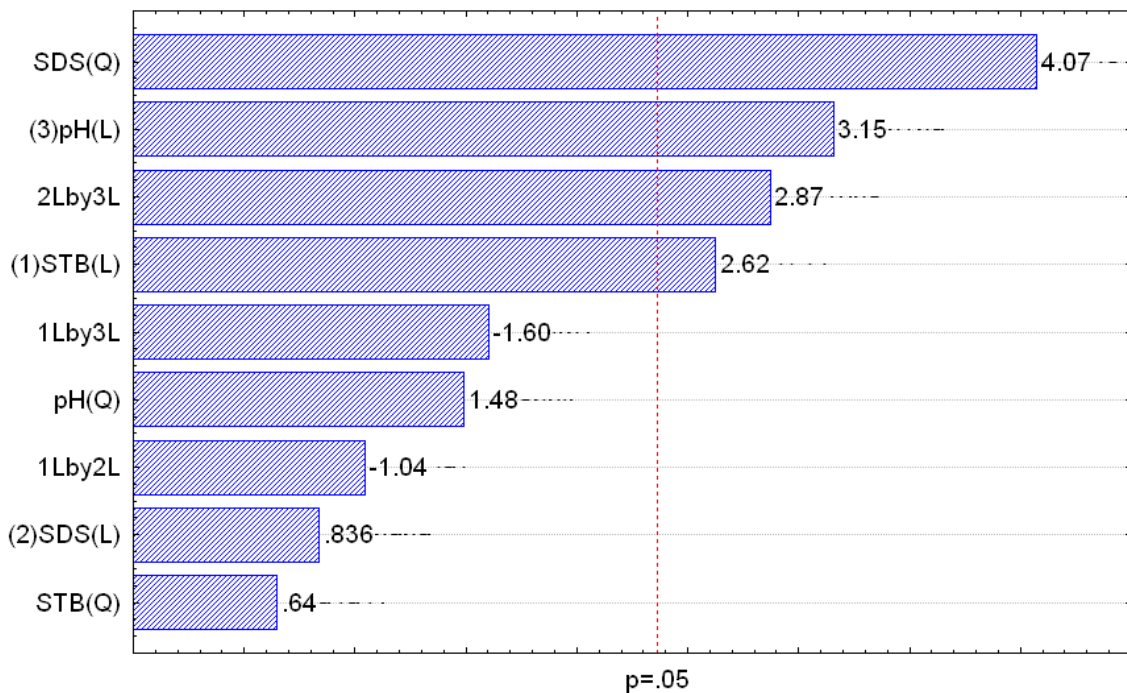
C: Puntu zentrala; RP: banatutako piko kopurua; R_{cp}: piko kritikoaren bereizmena; T: analisi denbora totala; f: bereizmenaren desiragarritasuna; g: denboaren desiragarritasuna; CRF: erantzun-funtzio kromatografikoa; MCRF: erantzun-funtzio kromatografiko aldatua; MCRF_R: MCRFaren bereizmenari dagokion atala (ikus. testua)

Datu esperimentalak ANOVaren bidez aztertu ziren, efektu nagusiak, bigarren mailako elkarrekintzak eta efektu kuadratikokoak kontuan hartuta. Datuak PARETO grafiko batean irudikatu ziren (6.3. Irudia) eta bertan ikusi zen lau faktorek zutela kontribuzio adierazgarria MCRFn —%95eko konfiantza mailarekin—:

- 1) SDS kontzentrazioaren efektu kuadratikoa,
- 2) pHaren efektu lineala,
- 3) SDS kontzentrazioaren eta pHaren arteko elkarrekintza eta,
- 4) STB kontzentrazioaren efektu lineala.

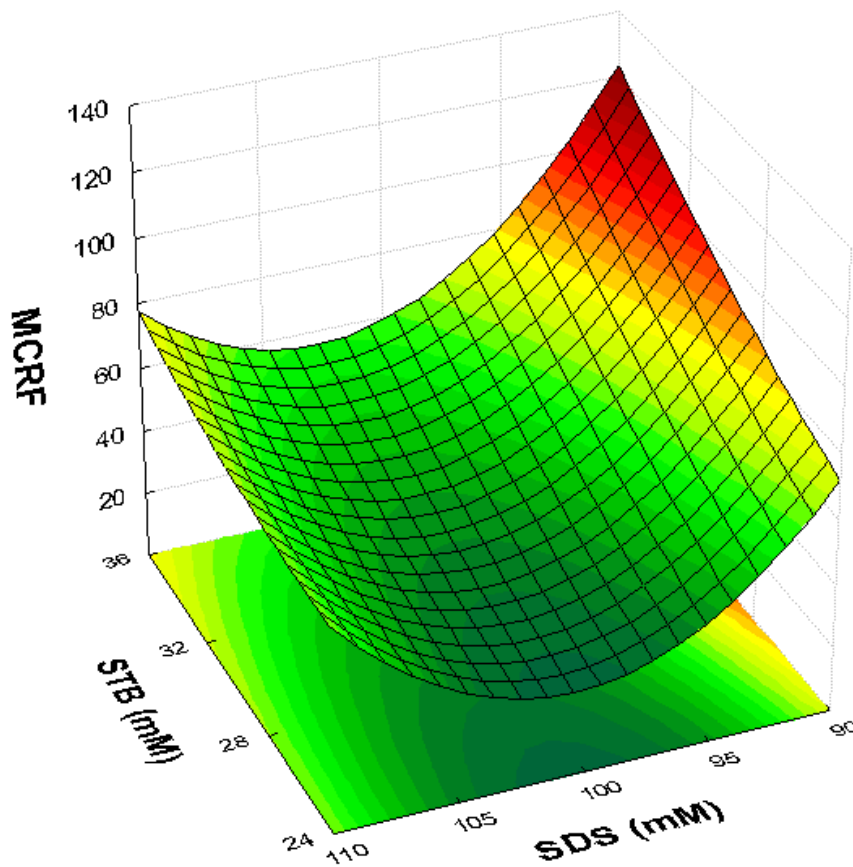
Emaitzak aztertuta, ikus daiteke MCRFren bereizmen atala STB kontzentrazioaren eta pHaren balio baxuetan hobea zela, baina, SDS kontzentrazioa 100 mM izan behar zen. Aldiz, MCRFren denbora atala STB

kontzentrazioaren eta pHaren aurkako baldintzetan zen optimoa, hortaz, oreka batera iritsi behar izan zen. Zentzu horretan, $\alpha = 3$ balioak era egokian doitzen zuten bereizmenaren eta analisi denbora totalaren garrantzi erlatiboa. Bestalde, aipatu behar da eredu matematikoaren egokitasuna bermatuta zegoela lortutako doiketa gabezia (*lack of fit*) ez zelako adierazgarria %95eko konfidantzarekin eta ereduaren erregresioa ere onargarria zelako ($R^2 > 0,87$).



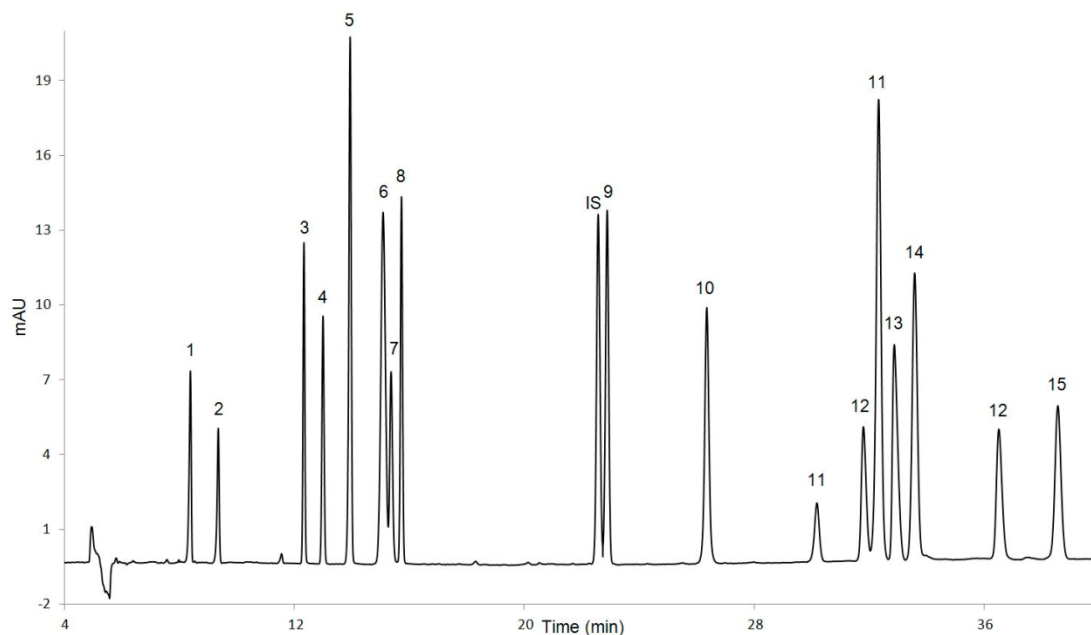
6.3. Irudia. MCRF balioari dagokion eredu aldagaiantzen PARETO grafikoa. Bertan ikus daiteke lau efektoren ondorioa adierazgarria dela MCRF balioan, hain zuzen ere testuan aipatu diren SDS kontzentrazioaren efektu kuadratikoa (Q), pHaren efektu lineala (L), SDS kontzentrazioaren eta pHaren arteko elkarrekintza (2Lby3L) eta STB kontzentrazioaren efektu lineala (L).

Optimizazio prozedura amaitzeko, MCRF globalaren erantzun-gainazala irudikatu zen baldintza optimoak aurkitzeko (6.4. Irudia). Ohartu balio minimoa lortu behar dela baldintza experimental optimoetan. RSM metodologiari esker experimentalki egin ez ziren saiakuntzen MCRF balioak aurreikusi ziren, eta aldagaien analisi sakonagoa egin ahal izan zen.



6.4. Irudia. Eredu matematikoaren arabera MCRF_i dagokion erantzun-gainazala. Hirugarren aldagaiaren balioa pH = 9,0 da, alegia, balio optimoa.

Eredu matematikoak zenbatetsitako datuak kontuan hartuta, baldintza esperimetal optimoak honako hauek izan ziren: 24 mM STB, 100 mM SDS eta pH 9,0. Baldintza horietan ebaluatu ziren metodoaren ezaugarri analikoak eta 6.5. irudian ikusgai dago baldintza esperimetal optimoetan lortutako analito guztien banaketa. Irudian, detekziorako uhin-luzera 210 nm-koa da, baina zitrala eta azido sorbikoa 240 eta 260 nm-tan detektatu ziren, hurrenez hurren. Irudiko elektroferograman, analitoen kontzentrazioa espero zeneko tarte linealaren tarteko kontzentrazioa zen, gutxi gorabehera.



6.5. Irudia. Baldintza optimoetan lortutako elektroferograma. BGEren konposaketa: 24 mM STB, 100 mM SDS, pH = 9,0 eta %10 MeOH; potentzial-diferentzia: 30 kV; laginaren injekzioa: 45 mbar, 8 segundoz. Pikoien identifikazioa: 1) bentzil alkohola, 2) anisil alkohola, 3) metilparabenoa, 4) azido sorbikoa, 5) kumarina, 6) azido salizilikoa, 7) azido bentzoikoa, 8) etilparabenoa, 9) propilparabenoa, 10) eugenola, 11) isoeugenola (isomeroak), 12) zitrala (isomeroak), 13) linaloola, 14) butilparabenoa, 15) geraniola eta IS) barne-patroia.

6.3.2. Ezaugarri analitikoak

MEKC baldintza optimoak finkatu ondoren, metodoaren ezaugarri analitikoak ebaluatu ziren, hala nola linealtasuna eta kalibraketa zuzenekin lotura duten beste parametroak, detekzio eta kuantifikazio mugak, errepikakortasuna, bitarteko doitasuna eta zehaztasuna.

6.3.2.1. Kalibraketa zuzenak eta linealtasuna

Kalibraketa zuzenak lortzeko, 6.2.1.1. azpiatalean deskribatutako prozedura jarraitu zen. Hortaz, analitoaren kontzentrazioa — X ardatzean— analitoaren azalera normalizatuaren eta barne-patroiaren azalera normalizatuaren erlazioarekiko — Y ardatzean— irudikatu zen kalibraketan, alegia, $A_{n,i}/A_{n,bp} = (A_i/t_{m,i}) / (A_{bp}/t_{m,bp})$. Kalibraketa egiteko 15 analitoen 5 estandar prestatu ziren

zorizko ordenan, analitoen amaierako kontzentrazioak bialeetan 6.5. taulan adierazitako tarte linealean egon zitezten.

6.5. Taula. Kalibraketa zuzenen parametro analitikoak.

	Konposatua	Tarte lineala ($\mu\text{g/mL}$)	Malda ^a	Ordenatua jatorrian ^a	R^2
1	Bentzil alkohola	5,54 – 35,59	$0,0395 \pm 0,0022$	$-0,035 \pm 0,048$	0,9984
2	Anisil alkohola	3,44 – 35,50	$0,0252 \pm 0,00088$	$-0,0082 \pm 0,019$	0,9994
3	Metilparabenoa	6,22 – 32,71	$0,0404 \pm 0,0026$	$-0,018 \pm 0,051$	0,9978
4	Azido sorbikoa	3,29 – 21,26	$0,0950 \pm 0,0049$	$-0,017 \pm 0,061$	0,9986
5	Kumarina	4,34 – 21,34	$0,0712 \pm 0,0049$	$-0,0094 \pm 0,060$	0,9976
6	Azido salizilikoa	3,51 – 21,38	$0,0798 \pm 0,0044$	$-0,0015 \pm 0,055$	0,9984
7	Azido bentzoikoa	5,14 – 32,58	$0,0264 \pm 0,0014$	$0,010 \pm 0,028$	0,9985
8	Etilparabenoa	4,25 – 20,90	$0,0410 \pm 0,0028$	$-0,012 \pm 0,034$	0,9976
9	Propilparabenoa	4,64 – 21,25	$0,0386 \pm 0,0028$	$-0,0043 \pm 0,035$	0,9972
10	Eugenola	8,41 – 28,12	$0,0348 \pm 0,0047$	$-0,051 \pm 0,080$	0,9947
11	Isoeugenola	8,12 – 44,91	$0,0321 \pm 0,0027$	$-0,0074 \pm 0,086$	0,9979
12	Zitrala	17,56 – 66,33	$0,0290 \pm 0,0031$	$0,099 \pm 0,14$	0,9941
13	Linaloola	33,12 – 120,10	$0,00553 \pm 0,00067$	$-0,0023 \pm 0,051$	0,9956
14	Butilparabenoa	9,65 – 32,84	$0,0305 \pm 0,0031$	$-0,016 \pm 0,060$	0,9948
15	Geraniola	6,20 – 36,20	$0,0162 \pm 0,0012$	$0,017 \pm 0,027$	0,9984

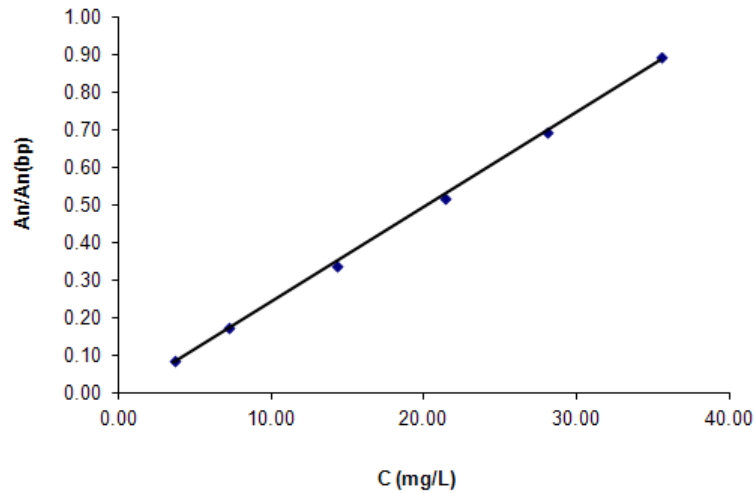
^aErrorea %95eko konfiantza tarteari dagokio.

Kalibraketa estandar bakoitza bi aldiz analizatu zen eta, 6.2.1.1. azpiatalean adierazi den gisara, barne-patroia gehitu zen $30 \mu\text{g/mL}$ kontzentrazioan —elektroforesiko bialean zegoen amaierako kontzentrazioari dagokio—. Kalibraketa zuzenei buruzko informazioa eta kalibraketarekin lotura duten parametro garrantzitsuenak 6.5. taulan jasota daude. Ikus daitekeen bezala, kalibraketa zuzenek linealtasun handia zuten, R^2 -ren balioa kasu guztietan 0,994 baino handiagoa baitzen. Hondarren analisisa ere ebaluatu zen erregresio zuzenen linealtasuna bermatzeko. Hondarrek banaketa normala zutela ikusi zen, hortaz, detektagailuaren erantzuna lineala zela baieztatu zen. Adibide gisara, lortutako bi kalibraketa zuzen —anisil alkoholarena eta metilparabenoarena— 6.6. irudian daude ikusgai. Aztertutako tarte linealaren kontzentrazioak aukeratzeko, kontuan hartu ziren:

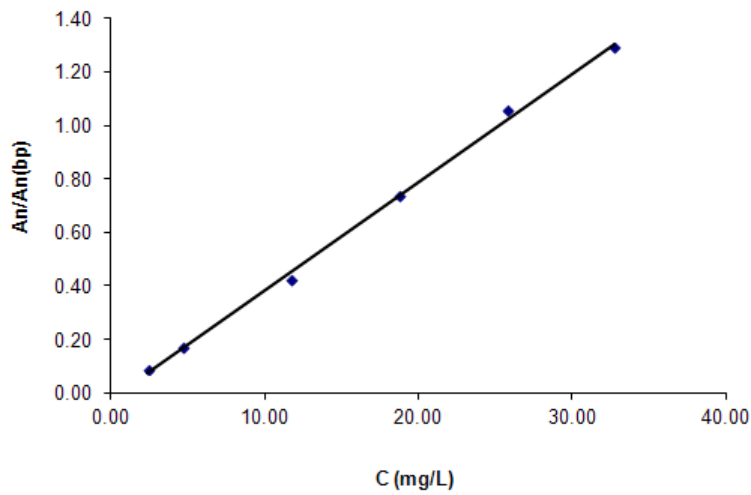
- (1) Europako araudiak ezarritako kontzentrazio mugak,
- (2) UV detektagailuaren sentikortasuna eta,
- (3) analitoen ur-disolbagarritasun eskasa.

Gogoan izan zitrala eta isoeugenola nahaste isomerikoak zirela eta bi isomeroen pikoan azalaren batura kontuan hartu zela kuantifikazioan. Bestalde, kuantifikazio uhin-luzera 210 nm zen, azido sorbikoaren (260 nm) eta zitralaren (240 nm) kasuetan izan ezik.

Anisil alkohola



Metilparabenoa



6.6. Irudia. Kalibraketa zuzenen adibide gisara, irudian anisil alkohol PASaren eta metilparabeno kontserbagarriaren kalibraketak daude ikusgai (ikus. 6.5. taula).

6.3.2.2. Detekzio eta kuantifikazio mugak

Aurreko kapituluko 5.3.2.2. azpiatalean definitu den bezala, detekzio muga (LOD, *Limit Of Detection*) ziurtasun estatistiko adierazgarriarekin detekta daitekeen analito kontzentrazio txikiena da (JCGM, 2008). LODa kalkulatzeko hainbat prozedura deskribatu dira bibliografian (Konieczka eta Namieśnik, 2009), esaterako 5.3.2.2. azpiatalean azaldu dena. Hala ere, Konieczkak eta Namieśniketik azaltzen duten moduan, prozedura hori nekeza da eta denbora asko eskatzen du analito kopurua handia denean. Erreferentzia berean LODa kalkulatzeko hainbat prozeduren abantaila eta desabantailak ere xehetasun guztiekin jaso dira (Konieczka eta Namieśnik, 2009).

Ikerketa honetan, hortaz, prozedura egokiagoa da LODa kalkulatzeko, $(3,3 \times SD/b)$ adierazpena erabiltzea, non $SD = SD_a$ den —hau da, ordenatu jatorriaren desbideraketa— eta b parametroa kalibraketa zuzenaren malda. Irizpide horrekin lortutako LODak 6.6. taulan jasota daude eta, ikus daitekeen bezala, 1,10 - 11,04 $\mu\text{g/mL}$ tartean daude guztiak. LOQa kalkulatzeko, $LOQ = 3 \times LOD$ adierazpena aplikatu zen, non LOD aurreko paragrafoan deskribatutako detekzio muga den. Irizpide horrekin lortutako kuantifikazio mugak ere 6.6. taulan daude ikusgai. Deskribatutako MEKC metodoarekin lortutako LODak bibliografian aurki daitezkeen UV detekttagailuetan oinarritzen diren metodoetan deskribatutakoen parekoak dira (Furlanetto *et al.*, 2010; Gao eta Legido-Quigley, 2011; Cheng *et al.*, 2012).

6.6. Taula. LOD eta LOQ parametroak.

	Konposatua	LOD ^a ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ^b ($\mu\text{g/mL}$)
1	Bentzil alkohola	1,85	5,54
2	Anisil alkohola	1,15	3,44
3	Metilparabenoa	2,07	6,22
4	Azido sorbikoa	1,10	3,29
5	Kumarina	1,45	4,34
6	Azido salizilikoa	1,17	3,51
7	Azido bentzoikoa	1,71	5,14
8	Etilparabenoa	1,42	4,25
9	Propilparabenoa	1,55	4,64
10	Eugenola	2,80	8,41
11	Isoeugenola	2,71	8,12
12	Zitrala	5,85	17,56
13	Linaloola	11,04	33,12
14	Butilparabenoa	3,22	9,65
15	Geraniola	2,07	6,20

^a $LOD = (3,3 \times SD)/b$ (*ikus. testua*)

^b $LOQ = 3 \times LOD$

6.3.2.3. Doitasuna eta zehaztasuna

Ikerketa honetan, metodoak balioztatzeko aholkuei jarraituz (EURACHEM, 1998; Konieczka eta Namieśnik, 2009), 10 neurketa independente baino gehiago egin ziren —12, kasu honetan—, eta maila desberdinetan —maila altuan eta maila baxuan egin zen—. Errepikakortasuna lortzeko, beraz, 12 lagin independente analizatu ziren MEKC metodoa erabiliz eta elkarren segidako bi egunetan. Doitasunaren eta zehaztasunaren laburpen osoa 6.7. taulan jasota dago.

6.7. Taula. Metodoaren doitasunaren (%RSD) eta zehaztasunaren emaitzak.

	Konposatua	Kontzentrazioa (µg/mL)	Errepikakortasuna	Bitarteko doitasuna	Berreskuratzea (%)
1	Bentzil alkohola	5,55	4,0	3,9	106,8
		33,78	5,2	4,3	109,3
2	Anisil alkohola	3,46	6,8	4,7	115,4
		33,70	7,0	4,6	112,0
3	Metilparabenoa	6,26	6,4	5,3	104,7
		31,07	5,8	4,9	112,9
4	Azido sorbikoa	3,31	3,9	4,4	113,0
		20,17	6,1	4,7	95,0
5	Kumarina	4,36	2,4	2,5	107,4
		20,25	5,9	4,6	94,4
6	Azido salizilikoa	3,52	5,2	5,7	110,4
		20,29	4,2	3,7	114,6
7	Azido bentzoikoa	5,17	10,8	8,6	100,4
		30,95	4,1	3,4	113,2
8	Etilparabenoa	4,27	2,5	2,5	113,2
		19,83	6,4	6,4	98,4
9	Propilparabenoa	4,68	4,2	4,4	109,4
		20,17	3,7	3,1	112,2
10	Eugenola	8,44	7,2	12,8	99,5
		26,67	11,2	13,3	105,2
11	Isoeugenola	8,13	11,1	19,2	91,9
		42,64	13,5	13,8	105,2
12	Zitralla	17,63	13,9	14,8	99,0
		62,92	12,6	14,6	106,2
13	Linaloola	33,19	9,8	12,7	111,6
		113,99	6,8	10,5	102,0
14	Butilparabenoa	9,66	7,4	11,6	110,9
		31,19	8,5	10,2	107,2
15	Geraniola	6,23	13,5	16,7	88,9
		34,83	4,9	12,0	111,2

Kontzentrazio maila baxua LOQaren inguruko kontzentrazioan finkatu zen eta maila altua, aldiz, tarte linealaren kontzentrazio maximoa baino zertxobait baxuagoa zen. Bi maila horietan analitoen disoluzio estandarrak prestatu ziren eta kontzentrazioaren errepikakortasuna ebaluatu zen, %RSDa kalkulatuta (6.7. Taula).

Bitarteko doitasuna (erreproduzigarritasuna) lortzeko, aldiz, 12 analisiak 3 asteko epean egin ziren —4 egunetan—. Kasu guztietan laginak bi aldiz kuantifikatu ziren. Aipatzekoa da kontzentrazioari dagokion errepikakortasuna %2,4-13,9 tartean zegoela eta bitarteko doitasunaren kasuan, berriz, %2,5-16,7 tartean. Bestalde, isoeugenolaren kasuan %RSD handiagoak lortzen badira ere, %RSD horiek bi isomeroen desbiderapen estandarrari lotuta dagoela kontuan izan behar da eta, hortaz, bi pikorekin lotutako desbiderapena dela.

Bestalde, MEKC metodoaren zehaztasuna ebaluatzeko 5.3.2.4. azpiatalean deskribatu den patroi-gehikuntza metodoa erabili zen, alegia, berreskuratze test (*recovery test*) prozedura. Horretarako, analitorik ez zuten laginetan analitoen kantitate ezagunak gehitu ziren eta berreskuratutako ehunekoak aztertu ziren (6.7. Taula). Lagin bakoitza hiru aldiz analizatu zen eta, 6.7. taulan ikus daitezkeen bezala, emaitza onargarriak lortu ziren. Berreskuratzea %88,9-115,4 tartean zegoen eta, beraz, doitasunari eta zehaztasunari dagokionez, UV detektagailuak erabiliz deskribatu diren balioen parekoak lortu ziren MEKC metodoarekin (Furlanetto *et al.*, 2010; Gao eta Legido-Quigley, 2011; Cheng *et al.*, 2012).

Metodoaren ezaugarri analitikoekin amaitzeko kasu honetan ere aipatu behar da pikoen identifikazioa egiteko UV espektroak eta mugikortasun elektroforetikoak aztertu zirela. Horretaz gainera, beharrezkoa izan zen kasuetan patrioiak gehitu ziren laginetan analitoen presentzia baieztatzeko, metodoaren espezifikotasuna bermatuz.

Metodoaren balioztapenean lortutako datu guztiek erakusten dute garatutako MEKC metodoa egokia eta eraginkorra zela lurrin alergenok eta kontserbagarriak produktu kosmetikoetan kuantifikatzeko. Deskribatu den metodoa bibliografian aurki daitezkeen ikerkuntzekin alderatuz gero, MEKC metodologia teknika konplexu eta garestiagoen alternatiba interesgarria dela adierazi behar da, esate baterako, GC-MS edo GC×GC-MS motakoak (del Nogal Sánchez *et al.*, 2010; Sanchez-Prado *et al.*, 2013; Celeiro *et al.*, 2014). Era berean, metodo honetan bereziki aztertu da optimizazio prozedura eta MCRFaren erabilpenak nabarmen sinplifikatu eta hobetu zuen pauso hori, esperimentu kopuru handia behar duten estrategiekin alderatzen denean (Blanco *et al.*, 2008; Xue *et al.*, 2013)

6.3.3. Aplikazioa

MEKC metodoa optimizatu eta balioztatu ondoren, zainketa pertsonalerako produktuen analisisian aplikatu zen. Aurreko ataletan deskribatu den bezala, optimizatutako metodoan elektrolito-disoluzioak 24 mM STB, 100 mM SDS zituen eta pHa 9,0 doitu zegoen. %10 (v/v) MeOH erabili zen gehigarri organiko moduan analitoen ur-disolbagarritasun eskasak hauspeaketa arazoak ez emateko. Injekzioa hidrodinamikoa zen eta 45 mbar-eko presioa aplikatu zen 8 segundoz eta banaketa elektroforetikoa lortzeko 30 kV-ko potentzial-diferentzia aplikatu zen.

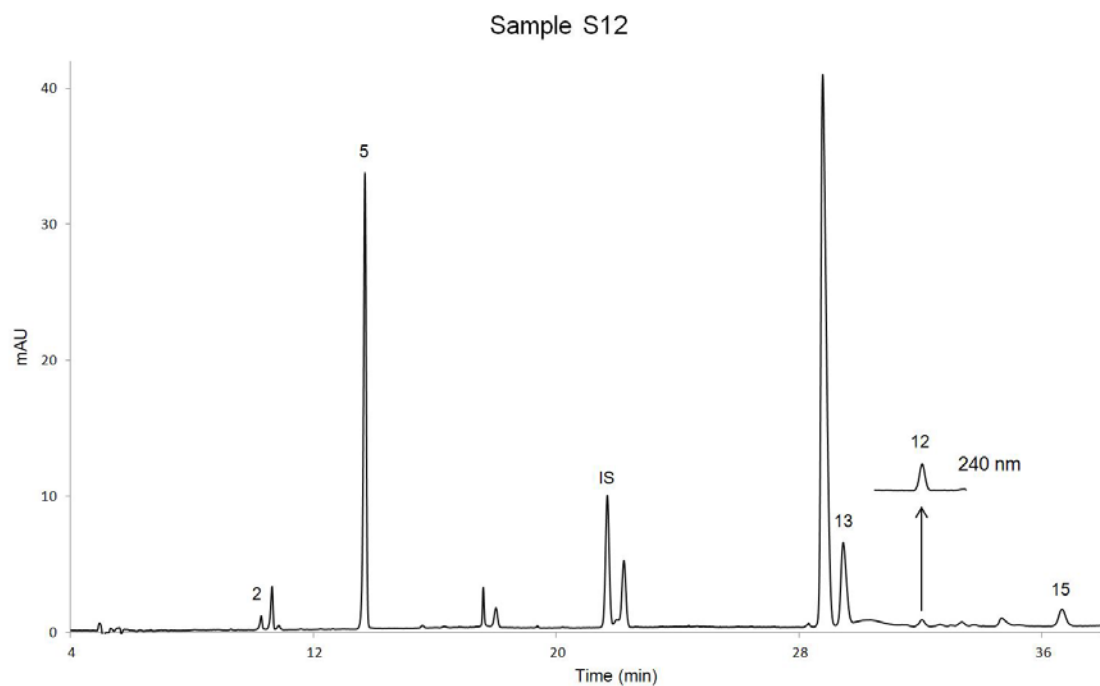
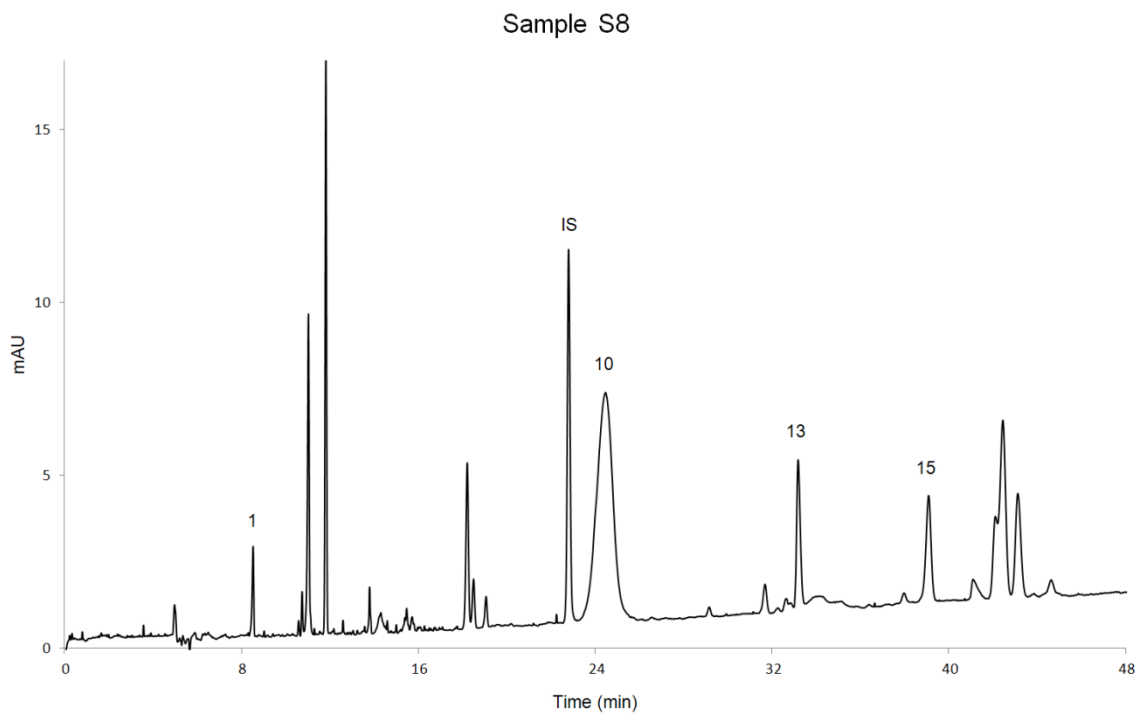
15 analitoak 29 PCP eta etxerako produktuetan kuantifikatu ziren. Lagin bakoitza bi aldiz analizatu zen, batez bestekoa eta desbiderapen estandarra kalkulatu ahal izateko. Laginak 6.2.3. azpitalean deskribatu den bezala prestatu ziren eta 6.8. taulan jasota daude lagin guztien kasuan lortutako emaitzak. Azpimarragarria da laginak prestatzeko prozeduraren sinpletasuna, izan ere, egin beharreko aurretratu bakarra diluzioa eta iragazpena zen. Kuantifikazioa egiteko, laginen $A_{n,i}/A_{n,bp}$ erlazioa lortzen zen elektroferogrametan eta, ondoren, kalibraketa zuzenak erabiliz, analitoen kontzentrazioak lortzen ziren. 6.7. Irudian laginen analisisian lortutako bi elektroferograma jaso dira; bertan 5 PASen eta 3 kontserbagarriren banaketa elektroforetikoa dago ikusgai. Jarraian, 6.8 eta 6.9 irudietan, laginen analisisian lortutako beste elektroferograma batzuk daude ikusgai.

6.8. Taula. PASen eta kontserbagarrien kontzentrazioak laginetan. Emaitzak: batez bestekoa (mg/kg) \pm desbiderapen estandarra (mg/kg). Parentesien artean %RSD balioak.

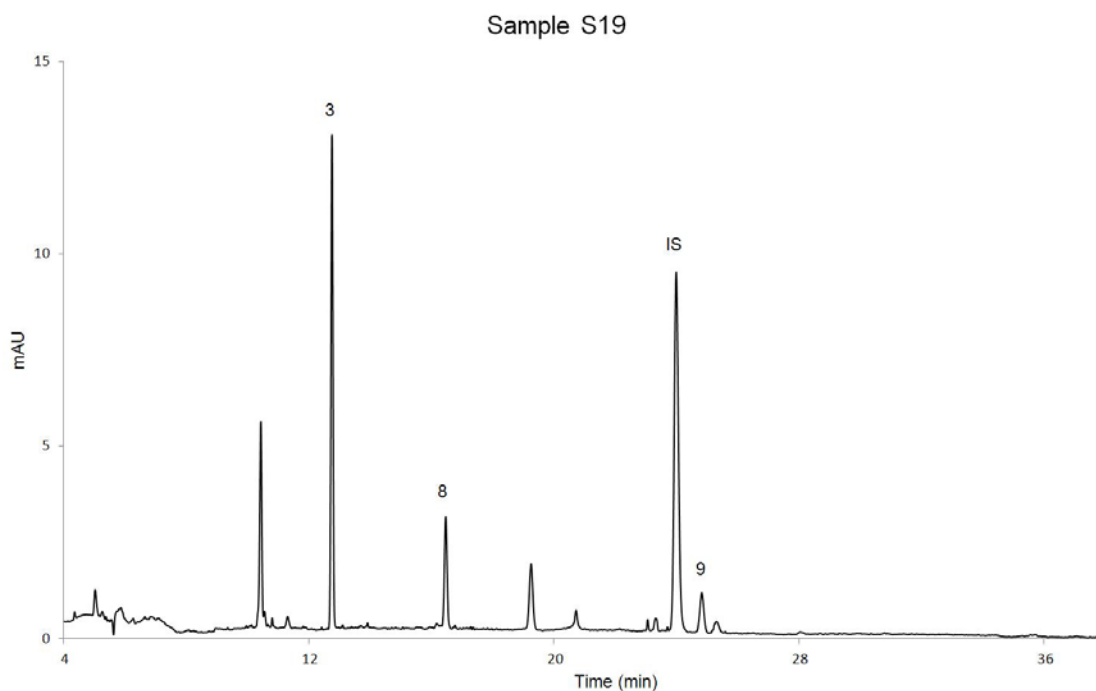
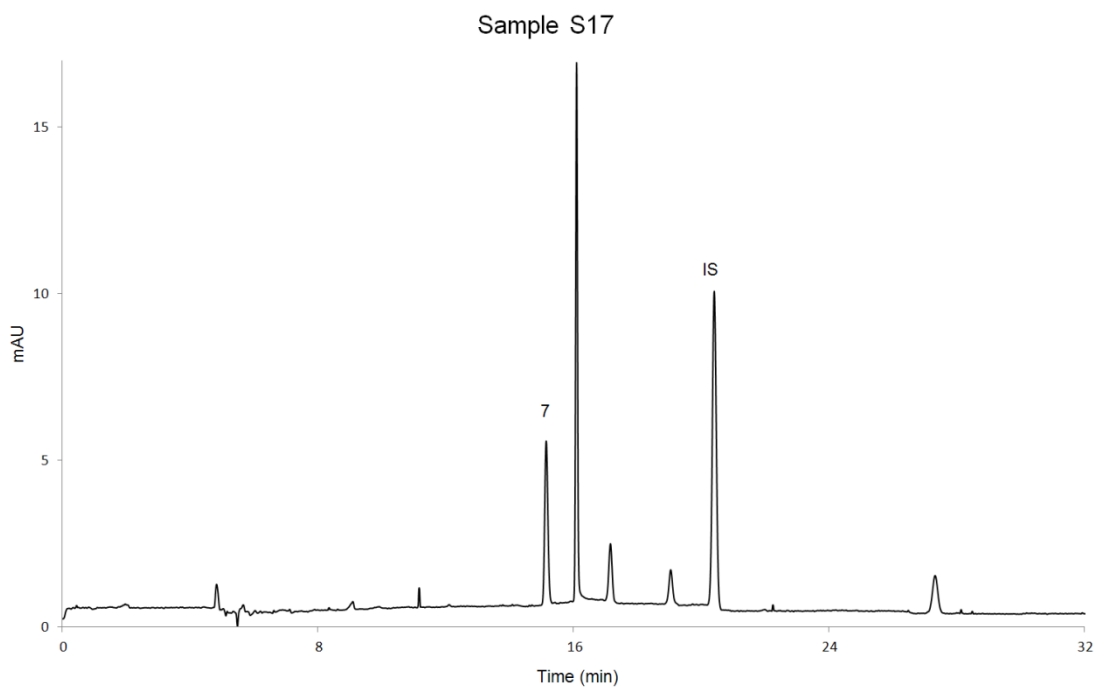
Lagina	Mota ^a	Konposatuak ^b
S1	Sh	1: 7200 \pm 150 (%2,0)
S2	So	1: 42,2 \pm 5,1 (%12,1); 5: 123,2 \pm 5,7 (%4,6); 6: 2760 \pm 120 (%4,3); 7: 5740 \pm 230 (%4,0); 10: 170,4 \pm 13,2 (%7,7); 13: 161,0 \pm 11,45 (%7,1)
S3	G	5: 634,3 \pm 7,8 (%1,2); 7: 3510 \pm 330 (%9,5); 13: 1410 \pm 160 (%11,0); 15: 389,9 \pm 32,4 (%8,3)
S4	G	7: 5130 \pm 120 (%2,3)
S5	P	5: 498,2 \pm 0,36 (%0,07)
S6	P	5: 593,8 \pm 0,9 (%0,15); 10: 2147 \pm 67 (%0,3)
S7	P	12: 69,6 \pm 2,2 (%3,2); 13: 2372 \pm 10 (%0,4); 15: 222,2 \pm 12,9 (%5,8)
S8	P	1: 203,3 \pm 4,2 (%2,1); 10: 1986 \pm 1 (%0,1); 13: 1240 \pm 10 (%0,5); 15: 345,5 \pm 18,1 (%5,2)
S9	P	12: 77,7 \pm 3,0 (%3,9); 13: 7035 \pm 83 (%1,2)
S10	P	7: 273,3 \pm 0,6 (%0,2); 10: 865,0 \pm 2,1 (%0,2); 12: 10,8 \pm 1,7 (%15,4); 13: 3294 \pm 6 (%0,2)
S11	P	7: 87,0 \pm 1,7 (%1,9); 13: 3474 \pm 190 (%5,6)
S12	P	2: 78,7 \pm 1,3 (%1,7); 5: 793 \pm 22 (%2,8); 12: 60,6 \pm 7,2 (%11,9); 13: 1742 \pm 48 (%2,7); 15: 150,3 \pm 12,4 (%8,2)
S13	P	3: 770,6 \pm 66,2 (%8,6)
S14	P	12: 1,30 \pm 0,05 (%3,8); 13: 464,3 \pm 9,7 (%2,1)
S15	HTC	1: 3595 \pm 42 (%1,2)
S16	AC	1: 124,0 \pm 5,7 (%4,6); 5: 659 \pm 11 (%1,7); 12: 27,9 \pm 1,2 (%4,2); 13: 3186 \pm 11 (%0,35)
S17	OA	7: 4130 \pm 178 (%4,3)
S18	OA	1: 609 \pm 17 (%2,8); 7: 4535 \pm 250 (%5,6)
S19	EC	3: 2575 \pm 101 (%3,9); 8: 602 \pm 25 (%4,1); 9: 280 \pm 13 (%4,7)
S20	G	6: 2462 \pm 56 (%2,3); 7: 5437 \pm 37 (%0,7)
S21	BM	8: 1465 \pm 44 (%3,0); 9: 881 \pm 28 (%3,2)
S22	Sh	1: 282,2 \pm 0,5 (%0,2); 5: 303,5 \pm 2,3 (%0,8); 7: 323,4 \pm 4,4 (%1,4)
S23	G	1: 334 \pm 20 (%6,0); 5: 442 \pm 11 (%2,4); 10: 452 \pm 9 (%2,1); 13: 1477 \pm 13 (%0,9); 15: 641 \pm 28 (%4,4)
S24	HTC	3: 1626 \pm 21 (%1,3)
S25	So	1: 36,4 \pm 0,3 (%0,9); 5: 96,5 \pm 4,4 (%4,6); 6: 2989 \pm 60 (%2,0); 7: 5770 \pm 226 (%3,9); 10: 201,0 \pm 0,1 (%0,1); 14: 14,64 \pm 0,04 (%0,3); 15: 957 \pm 30 (%3,0)
S26	HC	3: 1142 \pm 34 (%3,0); 6: 513 \pm 23 (%4,5); 7: 1099 \pm 73 (%6,6)
S27	HAF	10: 1912 \pm 19 (%1,0); 11: 1088 \pm 59 (%5,4); 12: 387,5 \pm 2,5 (%0,6); 13: 32900 \pm 1100 (%3,5)
S28	HAF	10: 5207 \pm 116 (%2,2); 13: 20460 \pm 780 (%3,8); 15: 143 \pm 3 (%2,1)
S29	HAF	5: 2636 \pm 35 (%1,3); 10: 1404 \pm 105 (%7,5); 13: 25300 \pm 1600 (%6,3)

^aLagin motak: Xanpua (Sh, *shampoo*), gela (G, *gel*), xaboia (So, *soap*), perfumea (P, *perfume*), eskuetarako krema (HC, *hand cream*), *aftershave* krema (AC, *aftershave cream*), ilerako krema (HTC, *hair treatment cream*), krema esfoliatzailea (EC, *exfoliant cream*), gorputzerako krema (BM, *body milk*), aire-gozagarria (HAF, *household air freshener*), aho-antiseptikoa (OA, *oral antiseptic*)

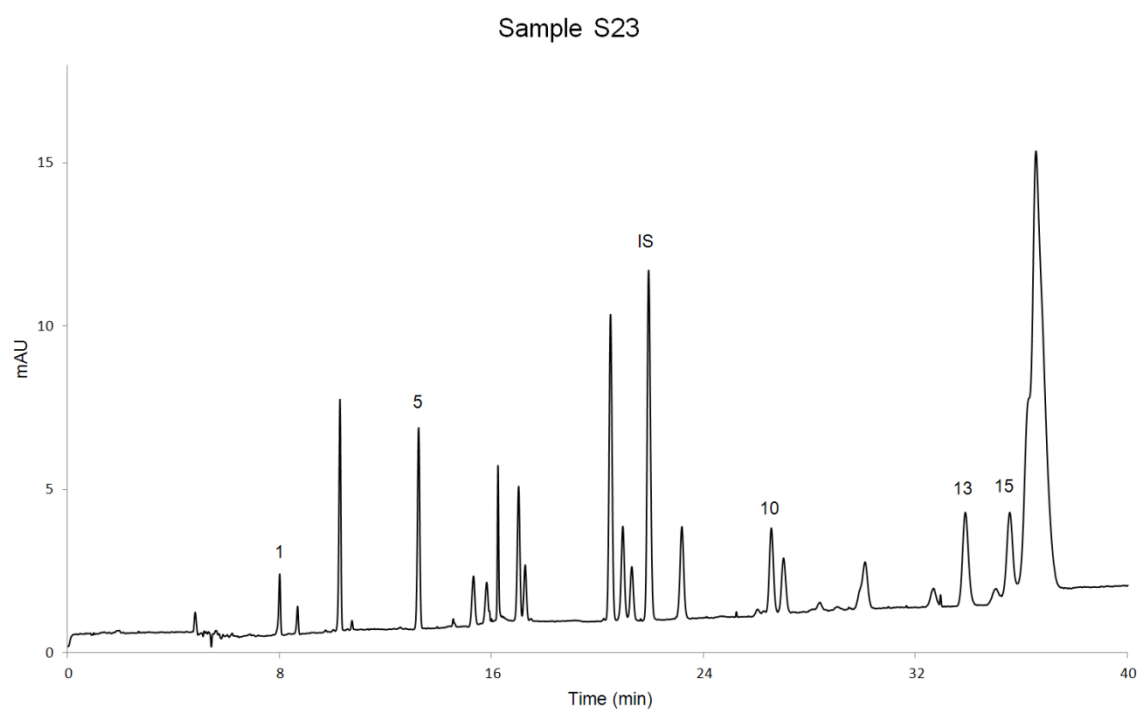
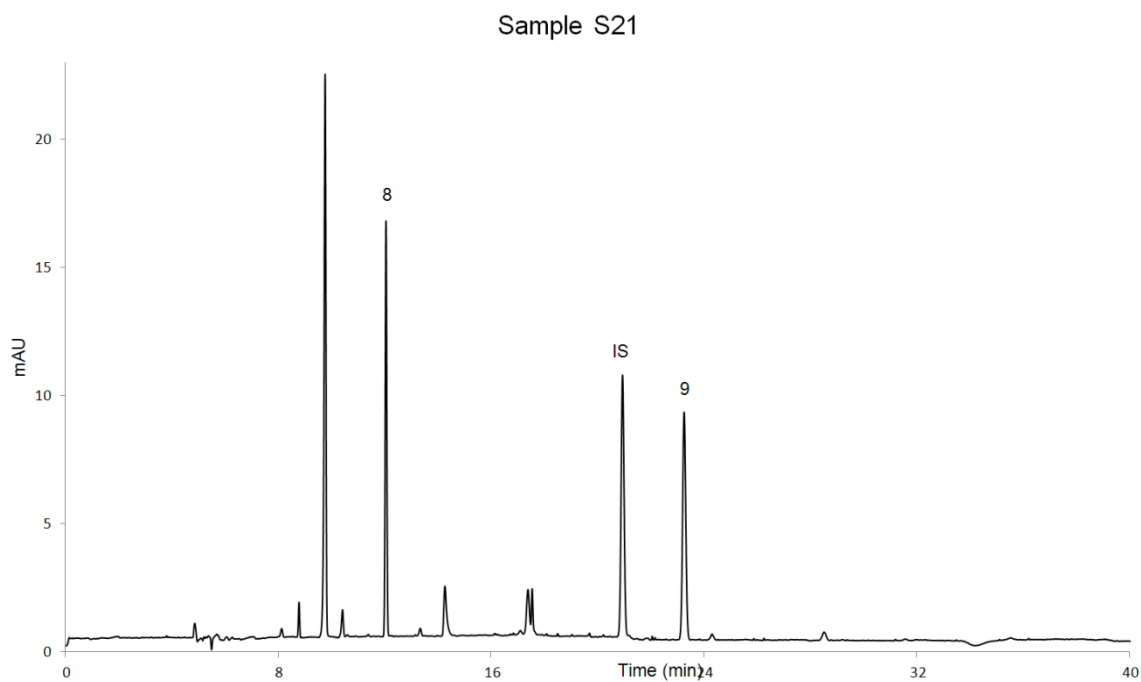
^bKonposatuak 6.5. taulan bezala zenbakituta daude.



6.7. Irudia. S8 eta S12 perfumeen banaketa elektroforetikoa. Baldintza esperimentalak: 6.3.3. azpiatalean definitutakoak. Seinaleen identifikazioa: 1) bentzil alkohola, 2) anisil alkohola, 5) kumarina, 10) eugenola, 12) zitrala (isomeroa), 13) linaloola, 15) geraniola eta IS) barne-patroia. Detekziorako uhin-luzera 210 nm.



6.8. Irudia. S17 eta S19 laginen banaketa elektroforetikoa. Baldintza esperimentalak: 6.3.3. azpiatalean definitutakoak. Seinaleen identifikazioa: 3) metilparabenoa, 7) azido bentzoikoa, 8) etilparabenoa, 9) propilparabenoa eta IS) barne-patroia. Detekziorako uhinluzera 210 nm.

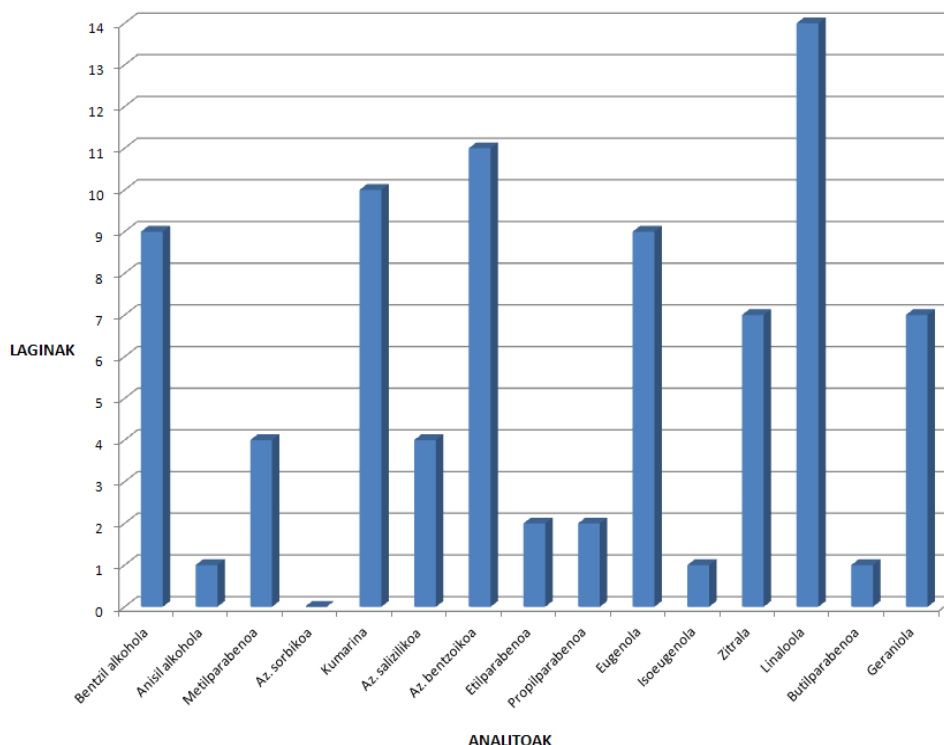


6.9. Irudia. S21 eta S23 laginen banaketa elektroforetikoa. Baldintza esperimentalak: 6.3.3. azpiatalean definitutakoak. Seinaleen identifikazioa: 1) bentzil alkohola, 5) kumarina, 8) etilparabenoa, 9) propilparabenoa, 10) eugenola, 13) linaloola, 15) geraniola eta IS) barne-patroia. Detekziorako uhin-luzera 210 nm.

Analitoen banaketa aztertuz gero, linaloola izan zen PAS arruntena —14 PCPtan kuantifikatu zen, alegia, %48,3an—. Beste analito guztiak ere aurkitu ziren aztertutako laginetan, azido sorbikoa izan ezik, honako ehuneko hauetan: bentzil alkohola (%31,0), anisil alkohola (%3,4), metilparabenoa (%13,8), kumarina (%34,5), azido salizilikoa (%13,8), azido bentzoikoa (%37,9), etilparabenoa (%6,9), propilparabenoa (%6,9), eugenola (%31,0), isoeugenola (%3,4), zitrala (%24,1), butilparabenoa (%3,4) eta geraniola (%24,1) (6.10. Irudia).

Lagin guztiek zuten gutxienez analito bat —PASa nahiz kontserbagarria—. Zehazki esanez, PCPen %48,3ak analito bat edo bi zituen, %37,9ak hiru edo lau eta %13,4ak bost baino gehiago.

Lortutako PAS eta kontserbagarri kontzentrazioak bat datoz literatura zientifikoan aurki daitezkeen beste metodoen bidez lortutako emaitzekin (Furlanetto *et al.*, 2010; Cheng *et al.*, 2012; Xue *et al.*, 2013). Aztertutakoaren arabera, PCP guztiek Europako 1223/2009 araudia betetzen zuten —kontuan izan araudi hori kosmetikoentzat bakarrik dela eta ez aire-freskagarri edo aho-antiseptikoentzat—. Aztertutako substantzia alergenoen kasuan etiketan identifikatuta daude kontzentrazioa %0,001 baino handiagoa bada kosmetiko iraunkorren kasuan eta %0,01 baino handiagoa bada eliminatzekoak diren produktu kosmetikoen kasuan. Era berean, kontserbagarriak ere araudiak finkatutakoaren arabera identifikatuta zeuden produktu kosmetikoetan.



6.10. Irudia. Analito bakoitza PCPtan zenbat aldiz aurkitu den jasotzen duen grafikoa. Ikus daitekeenez, linaloola da ohikoena den konposatua eta azido sorbikoa ez da detektatu.

6.4. Ondorioak

PASak eta kontserbagarriak aldiberean banatzeko eta kuantifikatzeko MEKC metodo azkarra, sinplea eta merkea garatu da. Deskribatutako metodoa aproposa da zainketa pertsonalerako produktuak analizatzeko eta ezaugarri analitiko onargarriak ditu metodoaren balioztapenari dagokionez, alegia, sentikortasuna, linealtasuna, LODak, LOQak, errepikakortasuna, bitarteko doitasuna eta zehaztasuna egokiak dira.

Metodoa optimizatzeko MCRF erantzun-funtzioa erabili da eta banaketa elektroforetikoak hobetzeko tresna egoki eta aproposa dela frogatu da. Era berean, MCRFak hobekuntza garrantzitsua dakar beste erantzun-funtzio batzuekin alderatzen bada, bereizmenaren eta denboraren garrantzi erlatiboa doitzeko aukera ematen duelako. Lortutako ezaugarri analitikoak UV metodologiek lortzen direnen antzekoak dira —bereziki LODei eta LOQei dagokienez—. MEKC metodoaren sinpletasuna ere azpimarragarria da, aurretratemendurik ez baita aplikatu behar izan.

Amaitzeko, laginen analisiak erakutsi duen moduan, MEKC teknika PCPen errutinako analisisira aplikatzeko tresna arrakastatsua dela frogatu da PASak eta kontserbagarriak aldiberean kuantifikatzeko.

6.5. Erreferentziak

Altria, K.D.: *Essential Peak Area Normalisation in Capillary Electrophoresis*, Chromatographia, 35, 177-182, 1993.

Altria, K.D.: *Capillary Electrophoresis Guidebook*, Humana Press, New Jersey, 1996a.

Altria, K.D.: *Determination of Drug-Related Impurities by Capillary Electrophoresis*, Journal of Chromatography A, 735, 43-56, 1996b.

Altria, K.D.: *Improved Performance in Capillary Electrophoresis*, LC-GC Europe, September vol., 1-5, 2002.

Altria, K.D.; Fabre, H.: *Approaches to Optimisation of Precision in Capillary Electrophoresis*, Chromatographia, 40, 313-320, 1995.

Altria, K.D.; Kelly, M.A.; Clark, B.J.: *Current Applications in the Analysis of Pharmaceuticals by Capillary Electrophoresis. II*, Trends in Analytical Chemistry, 17, 214-226, 1998.

Altria, K.D.; McLean, R.: *Development and Optimisation of a Generic Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography Method to Support Analysis of a Wide Range of Pharmaceuticals and Excipients*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 18, 807-813, 1998.

Asimakopoulos, A.G.; Wang, L.; Thomaidis, N.S.; Kannan, K.: *A Multi-Class Bioanalytical Methodology for the Determination of Bisphenol A Diglycidyl Ethers, p-Hydroxybenzoic Acid Esters, Benzophenone-Type Ultraviolet Filters, Triclosan, and Triclocarban in Human Urine by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*, Journal of Chromatography A, 1324, 141-148, 2014.

Blanco, E.; Casais, M. del C.; Mejuto, M. del C.; Cela, R.: *Simultaneous Determination of p-Hydroxybenzoic Acid and Parabens by Capillary Electrophoresis with Improved Sensitivity in Nonaqueous Media*, Electrophoresis, 29, 3229-3238, 2008.

Boonkerd, S.; Detaevernier, M.R.; Michotte, Y.: *Use of Capillary Electrophoresis for the Determination of Vitamins of the B Group in Pharmaceutical Preparations*, Journal of Chromatography A, 670, 209-214, 1994.

Brausch, J.M.; Rand, G.M.: *A Review of Personal Care Products in the Aquatic Environment: Environmental Concentrations and Toxicity*, Chemosphere, 82, 1518-1532, 2011.

Buszewski, B.; Dziubakiewicz, E.; Szumski, M.: *Electromigration Techniques: Theory and Practice*, Springer, Heidelberg, 2013.

Celeiro, M.; Guerra, E.; Lamas, J.P.; Lores, M.; Garcia-Jares, C.; Llompарт, M.: *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, 1-14, 2014.

Cheng, Y.-C.; Wang, C.-C.; Chen, Y.-L.; Wu, S.-M.: *Large Volume Sample Stacking with EOF and Sweeping in CE for Determination of Common Preservatives in Cosmetic Products by Chemometric Experimental Design*, Electrophoresis, 33, 1443-1448, 2012.

Del Nogal Sánchez, M.; Pérez-Pavón, J.L.; Moreno Cordero, B.: *Determination of Suspected Allergens in Cosmetic Products by Headspace-Programmed Temperature Vaporization-Fast Gas Chromatography-Quadrupole Mass Spectrometry*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 397, 2579-2591, 2010.

Devos, C.; Ochiai, N.; Sasamoto, K.; Sandra, P.; David, F.: *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, 207-215, 2012.

Dolzan, M.D.; Spudeit, D.A.; Azevedo, M.S.; Costa, A.C.O.; Leal de Oliveira, M.A.; Micke, G.A.: *A Fast Method for Simultaneous Analysis of Methyl, Ethyl, Propyl and Butylparaben in Cosmetics and Pharmaceutical Formulations Using Capillary Zone Electrophoresis with UV Detection*, Analytical Methods, 5, 6023-6029, 2013.

EURACHEM: *EURACHEM Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods*, EURACHEM Working Group, LGC, 1998.

European Parliament; European Council: *Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on Cosmetic Products (recast)*, Official Journal of the European Union, L342, 59-209, 2009.

Felhofer, J.L.; Garcia, C.D.: *Optimization of Micellar Electrokinetic Chromatography Separation Conditions by Chemometric Methods*. In Hanrahan,

G.; Gomez, F.A.: *Chemometric Methods in Capillary Electrophoresis*, Wiley, New Jersey, 2010, 113-132.

Furlanetto, S.; Orlandini, S.; Giannini, I.; Pasquini, B.; Pinzauti, S.: *Microemulsion Electrokinetic Chromatography: An Application for the Simultaneous Determination of Suspected Fragrance Allergens in Rinse-Off Products*, *Talanta*, 83, 72-77, 2010.

Gao, W.; Legido-Quigley, C.: *Fast and Sensitive High Performance Liquid Chromatography Analysis of Cosmetic Creams for Hydroquinone, Phenol and Six Preservatives*, *Journal of Chromatography A*, 1218, 4307-4311, 2011.

Hanrahan, G.; Montes, R.; Gomez, F.A.: *Chemometric Experimental Design Based Optimization Techniques in Capillary Electrophoresis: A Critical Review of Modern Applications*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390, 169-179, 2008.

Hasemann, P.; ter Balk, M.; Wätzig, H.: *Analysis of Substances to be Used as Internal Standards in MEKC*, *Electrophoresis*, 28, 1798-1804, 2007.

Joint Committee for Guides in Metrology (JCGM): *International Vocabulary for Metrology – Basic and General Concepts and Associated Terms*, VIM, 200, 2008.

Konieczka, P.; Namieśnik, J.: *Quality Assurance and Quality Control in the Analytical Chemical Laboratory, A Practical Approach*, CRC Press, Boca Raton, 2009.

Lin, Y.-H.; Yang, Y.-H.; Wu, S.-M.: *Experimental Design and Capillary Electrophoresis for Simultaneous Analysis of Arbutin, Kojic Acid and Hydroquinone in Cosmetics*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 44, 279-282, 2007.

Lopez-Gazpio, J.; Garcia-Arrona, R.; Millán, E.: *Application of Response Function Methodology for the Simultaneous Determination of Potential Fragrance Allergens and Preservatives in Personal Care Products Using Micellar Electrokinetic Chromatography*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406, 819-829, 2014.

Lopez-Gazpio, J.; Millán, E.: *Elektroforesi Kapilarraren Oinarriak*, UPV/EHUko Argitalpen Zerbitzua, Leioa, 2013.

Mayer, B.X.: *How to Increase Precision in Capillary Electrophoresis*, *Journal of Chromatography A*, 907, 21-37, 2001.

Orlandini, S.; Gotti, R.; Furlanetto, S.: *Multivariate Optimization of Capillary Electrophoresis Methods: A Critical Review*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 87, 290-307, 2014.

Ortiz, K.J.; Yiannias, J.A.: *Contact Dermatitis to Cosmetics, Fragrances and Botanicals*, Dermathologic Therapy, 17, 264-271, 2004.

Palmer, C.P.: *Method Development for Micellar Electrokinetic Chromatography*, Chromatographia, 57(S), S333-S337, 2003.

Pruñonosa, J.; Obach, R.; Diez-Gascón, A.; Gouesclou, L.: *Comparison of High-Performance Liquid Chromatography and High-Performance Capillary Electrophoresis for the Determination of Cicletanine in Plasma*, Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 581, 219-226, 1992.

Rakic, T.; Stojanovic, B.J.; Jovanovic, M.; Malenovic, A.; Ivanovic, D.; Medenica, M.: *Evaluation of Seven Chromatographic Response Functions on Simulated and Experimentally Obtained Chromatograms in Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography System*, Analytical Letters, 46, 1198-1212, 2013.

Sanchez-Prado, L.; Alvarez-Rivera, G.; Lamas, J.P.; Llompарт, M.; Lores, M.; Garcia-Jares, C.: *Content of Suspected Allergens and Preservatives in Marketed Baby and Child Care Products*, Analytical Methods, 5, 416-427, 2013.

Sanchez-Prado, L.; Llompарт, M.; Lamas, J.P.; Garcia-Jares, C.; Lores, M.: *Multicomponent Analytical Methodology to Control Phthalates, Synthetic Musks, Fragrance Allergens and Preservatives in Perfumes*, Talanta, 85, 370-379, 2011.

Schaeper, J.P.; Sepaniak, M.J.: *Parameters Affecting Reproducibility in Capillary Electrophoresis*, Electrophoresis, 21, 1421-1429, 2000.

Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products intended for Consumers (SCCNFP): *Fragrance Allergy in Consumers. A Review of the Problem*, SCCNFP/0017/98, 1999.

Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products intended for Consumers (SCCNFP): *Opinion Concerning Salicylic Acid*, SCCNFP/0522/02, 2002.

Scientific Committee on Consumer Products (SCCP): *Opinion on Benzoic Acid and Sodium Benzoate*, SCCP/0891/05, 2005.

Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS): *Opinion on Fragrance Allergens in Cosmetic Products*, SCCS/1459/11, 2012.

Sgorbini, B.; Ruosi, M.R.; Cordero, C.; Liberto, E.; Rubiolo, P.; Bicchi, C.: *Quantitative Determination of Some Volatile Suspected Allergens in Cosmetic Creams Spread on Skin by Direct Contact Sorptive Tape Extraction-Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, Journal of Chromatography A, 1217, 2599-2605, 2010.

Wang, J.; Mannino, S.; Camera, C.; Chatrathi, M.D.; Scampicchio, M.; Zima, J.: *Microchip Capillary Electrophoresis with Amperometric Detection for Rapid Separation and Detection of Seleno Amino Acids*, Journal of Chromatography A, 1091, 177-182, 2005.

Wang, L.H.: *Fragrances: From Essential Oils to the Human Body and Atmospheric Aerosols*, Analytical Methods, 5, 316-322, 2013.

Xue, Y.; Chen, N.; Luo, C.; Wang, X.; Sun, C.: *Simultaneous Determination of Seven Preservatives in Cosmetics by Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Coupled with High Performance Capillary Electrophoresis*, Analytical Methods, 5, 2391-2397, 2013.

Yang, T.-J.; Tsai, F.-J.; Chen, C.-Y.; Yang, T.C.-C.; Lee, M.-R.: *Determination of Additives in Cosmetics by Supercritical Fluid Extraction On-Line Headspace Solid-Phase Microextraction Combined with Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, Analytica Chimica Acta, 668, 188-194, 2010.

Yu, Y.; Wu, L.: *Application of Graphene for the Analysis of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Wastewater*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 405, 4913-4919, 2013.

Yusa, V.; Ye, X.; Calafat, A.M.: *Methods for the Determination of Biomarkers of Exposure to Emerging Pollutants in Human Specimens*, Trends in Analytical Chemistry, 38, 129-142, 2012.

6.6. Published paper: Application of response function methodology for the simultaneous determination of potential fragrance allergens and preservatives in personal care products using micellar electrokinetic chromatography

Application of response function methodology for the simultaneous determination of potential fragrance allergens and preservatives in personal care products using micellar electrokinetic chromatography

J. Lopez-Gazpio · R. Garcia-Arrona · E. Millán

Received: 6 September 2013 / Revised: 8 November 2013 / Accepted: 8 November 2013 / Published online: 4 December 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract A micellar electrokinetic chromatography method was developed for determination of 15 suspected fragrance allergens and preservatives. The target compounds are widely used as ingredients in many personal care products, and all of them are included in the European Regulation concerning cosmetic products. The method was optimized by using a central composite experimental design and response surface methodology. A modified chromatographic response function was defined to weigh the terms in the response function adequately. After optimization of experimental conditions, a background electrolyte of 100 mM sodium dodecyl sulphate and 24 mM sodium tetraborate and pH 9.0 was selected for the separation of the analytes. The developed methodology was evaluated in terms of linearity, limits of detection and quantification, precision and accuracy, showing appropriate values (i.e., $R^2 \geq 0.99$ and accuracy of 89–115 %). Finally, applicability of the micellar electrokinetic chromatography method was assessed by successfully quantifying fragrance allergens and preservatives in commercial personal care products. The most commonly found analyte was linalool (48.3 % of samples) followed by benzoic acid (37.6 %). All samples contained at least one of the target compounds, thus confirming the ubiquity of fragrance allergens and preservatives in personal care products.

Keywords Potential fragrance allergens · Preservatives · Personal care products · Response function · MEKC-DAD

Introduction

Potential risks of chemicals used in personal care products (PCPs) have received growing attention in the last decades. Considering the extensive use of PCPs, there is an increasing social concern about the safety of ingredients formulated in consumer products. The main classes of PCPs include fragrances, preservatives, antimicrobials, disinfectants, ultraviolet (UV) filters, insect repellents, phthalates, and fixatives [1]. These compounds are commonly used in many types of cosmetic products, such as gels, shampoos, soaps, creams, lotions, perfumes, and hair conditioners; and they are also used in household, food, and pharmaceutical products [2]. Among PCPs, fragrances and preservatives are the two most clinically relevant allergens in cosmetics [3].

Fragrances are ubiquitously used in scented cosmetic products for their odorous properties. Although more than 3,000 chemical substances are used for this aim, the Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS) identified among them 26 potential fragrance allergens with a well-recognised potential to cause allergy [4]. These compounds are known in the literature as potentially allergenic substances (PAS) or suspected allergens. Preservatives are used in cosmetic products to protect them against microbial growth, both for safety and to maintain product quality. Among the many preservatives approved for use in cosmetic products, probably most attention has been focused on four esters of 4-hydroxybenzoic acid, commonly known as parabens (methyl, ethyl, propyl, and butyl paraben). Reports found in the literature indicate that parabens are endocrine disrupting chemicals and may induce hormone-related activity [5]. Parabens were also linked to breast cancer in humans [6] but the SCCS refuted this point, and concluded that there was insufficient data to establish that link [5]. Other preservatives, such as salicylic

J. Lopez-Gazpio · R. Garcia-Arrona · E. Millán (✉)
Department of Applied Chemistry, University of the Basque Country,
Apdo. 1072, 20080 San Sebastián, Spain
e-mail: esmeralda.millan@ehu.es

— 7 —

Zainketa pertsonalerako produktuetan kontserbagarriak eta ultramore-iragazkiak aldirian determinatzeko kromatografia elektroinetiko mizelarrean oinarritutako metodoaren garapena eta optimizazioa

7.1. Sarrera

Aurreko kapituluetan azaldu den moduan, kontsumitzaileek egunero dute kontaktua zainketa pertsonalerako produktuekin nahiz etxean erabiltzen diren beste produktuekin (Brausch eta Rand, 2011). Produktu horien osagaiak, zenbaitetan, osasunarentzat kaltegarriak dira eta ingurugiroan ondorioak sortuzakete (Pedrouzo *et al.*, 2011). PCP osagai talde garrantzitsuenetako batzuk dagoeneko aztertu dira, alegia, lurrinak eta kontserbagarri antimikrobianoak. Kapitulu honetan kontserbagarri antimikrobianoez gainera, kontserbagarri antioxidatzaileak ere aztertuko dira. Beste osagai garrantzitsu bat ere gehituko da analisisian, hain zuzen ere, 3. kapituluaren 3.3. azpiatalean deskribatu diren ultramore-iragazkiak, zehazki bentzofenona motakoak.

Kontserbagarrien helburua, 3. kapituluaren aipatu den gisara, produktu kosmetikoen egonkortasuna bermatzea da, bai mikroorganismoen aurkako babesa emanez —kontserbagarri antimikrobianoen kasua— eta baita oxidazioaren aurkako babesa emanez —kontserbagarri antioxidatzaileen kasua—. Ikerketaren atal honetan, 6. kapituluaren analizatutako kontserbagarri antimikrobianoak mantentzea erabaki zen, interes handikoak baitira, bereziki parabenoak. Parabenoak produktu kosmetikoen %75-90ean erabiltzen direla zenbatetsi da —nagusiki metil, etil, propil eta butilparabenoa—, %0,01-0,3 tarteko kontzentrazioan (Cabaleiro *et al.*, 2014). Kontserbagarri antimikrobiano hidrofobo

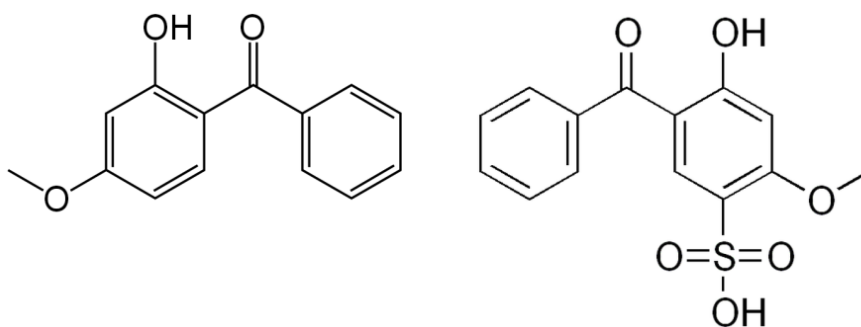
horietaz gainera —alegia, aipatutako lau parabenoak—, kontserbagarri antimikrobiano hidrofiloak ere kontuan hartu ziren, aurreko kapituluko ikerketan egin zen bezala, alegia, azido salizilikoa, azido bentzoikoa eta azido sorbikoa.

Beste kontserbagarri talde garrantzitsua isotiazolinona motako kontserbagarriak dira. Isotiazolinona arruntenak eta haien egitura kimikoak 3. kapituluko 3.4. taulan daude ikusgai. Aipatu den bezala, egun, metilisotiazolinona nahastea erabiltzen da kosmetikan, hain zuzen ere, 2-metil-3-isotiazolinonaren eta 5-kloro-2-metil-3-isotiazolinonaren 3:1 nahastea; Kathon edo ProClin izen komertzialarekin saltzen dena eta kontserbagarri oso eraginkorra dena. Isotiazolinonen erabilera asko handitu da azken urteotan (Alvarez-Rivera *et al.*, 2012) eta, ondorioz, sor ditzaketen albo-ondorioei buruzko ardura sortu da —3.2.1. azpiatalean aztertu da puntu hori—. Europako 1223/2009 araudian (European Parliament and European Council, 2009), isotiazolinonen kontzentrazio maximoak ezarrita daude —%0,0015 3:1 nahastearen kasuan eta %0,01 metilisotiazolinonaren kasuan— eta kontzentrazio horiek kontsumitzaileentzat seguruak direla bermatzen dute SCCSren azken berrikuspenek (SCCS, 2009; SCCS 2013), kontrako ikerketak ere argitaratu badira ere (Adki *et al.*, 2014). Amaitzeko, 1,2-bentzisotiazolinonaren kasua aipatu behar da: etxerako produktuetan erabiltzen da, baina, produktu kosmetikoetan ez dago onartuta, kontzentrazio maila segururik ez baita finkatu (SCCS, 2012). Antimikrobianoekin amaitzeko, triklosana —irgasan izen komertzialarekin ere ezagutzen dena— aztertzea erabaki zen kosmetikan eta zainketa pertsonalerako produktuetan duen presentzia handiaren ondorioz eta Europako 1223/2009 araudian jasotzen delako.

Aipatutako kontserbagarri antimikrobiano horietaz gainera, ikerketaren atal honetan kontserbagarrien analisia zabaldu egin zen kontserbagarri antioxidatzaileak gehituta. Kontserbagarri antioxidatzaile ohikoenak hidroxitolueno butilatua (BHT, *Butylated HydroxyToluene*) eta hidroxianisol butilatua (BHA, *Butylated HydroxyAnisole*) dira, 3.2.2. azpiatalean azaldu den bezala —egitura kimikoak 3.6. irudian daude ikusgai—. Kontuan izan behar da azkenak bi isomero dituela, hain zuzen ere, 3-*tert*-butil-4-hidroxianisola (3-BHA) eta 2-*tert*-butil-4-hidroxianisola (2-BHA). Antioxidatzaile horien albo-ondorioak eta kontsumitzaileentzat dituzten arriskuak 3.2.2. azpiatalean laburtu dira (Jeong *et al.*, 2005; Lanigan eta Yamarik, 2002; Prakash *et al.*, 2013)

UV-iragazkiak ere maiz egoten dira zainketa pertsonalerako produktuetan. UV-iragazki horien helburua erabiltzailearen larruazala babestea izan ohi da, baina, beste kasu batzuetan produktu kosmetikoa bera eguzki-izpien kalteetatik babesteko gehitzen dira (Chisvert *et al.*, 2013). UV-iragazki organikoen egitura kimikoak 3.6. taulan jasota daude eta 3. kapituluko 3.3. azpiatalean xehetasun guztiarekin aztertu dira konposatu horiek osasunean eragin ditzaketen albo-ondorio kaltegarriak. Aipatzekoak dira, esaterako, UV-iragazkiak disruptore endokrinoak direla frogatu duten ikerketak, izan ere substantzia horiek gai dira larruazala

zeharkatzeko (Chisvert eta Salvador, 2007; Liao eta Kannan, 2014). Azaldu den bezala, Europar Batasunean 26 UV-iragazki onartu dira PCPtan erabiltzeko. Horien artean, bentzofenonaren deribatuak dira kosmetikan gehien erabiltzen direnak, 2007ko berrikuspen bibliografikoaren arabera (Chisvert eta Salvador, 2007). Bentzofenona motako iragazkien artean bibliografiaren arabera arruntenak diren biak aukeratu ziren kosmetikoetan kuantifikatzeko. Hain zuzen ere, bentzofenona-3 eta bentzofenona-4 deribatuak (7.1. Irudia) dira bentzofenona motako UV-iragazki erabilienak —hurrenez hurren, oxibentzona eta sulisobentzona izenekin ere ezagutzen direnak—. %5 eta %10 dira bi iragazki horientzat Europako araudiak onartzen dituen kontzentrazio maximoak, hurrenez hurren; izan ere, frogatua dago konposatu horiek, zenbait albo-ondorio izan ditzaketela, hala nola narritadurak, erreakzio fotoalergenikoak eta aktibitate estrogenikoa (SCCP, 2008; Gao *et al.*, 2013; Kerdivel *et al.*, 2013). Bentzofenona-iragazkien analisiaren kasuan ere likido-kromatografia (Liao eta Kannan, 2014) eta gas-kromatografia metodoak dira (Benedé *et al.*, 2014) ohikoenak.



7.1. Irudia. Bentzofenona-3 (ezkerrean) eta bentzofenona-4 (eskuinean) UV-iragazkien egitura kimikoa.

Azaldutakoa kontuan hartuta, ikerketaren atal honetan 16 konposatu aukeratu ziren zainketa pertsonalerako produktuetan kuantifikatzeko. Konposatu horiek kontserbagarri eta UV-iragazki talde esanguratsuenetatik aukeratu ziren, bai erabilpenaren eta baita talde kimikoen arabera ere. Hautatutako osagaiak, hortaz, honako hauek izan ziren:

a) kontserbagarri antimikrobiano hidrofiloak: azido bentzoikoa, azido salizilikoa eta azido sorbikoa,

- b) kontserbagarri antimikrobiano hidrofoboak: triklosana, metilparabenoa, etilparabenoa, propilparabenoa eta butilparabenoa,
- c) kontserbagarri antioxidatzaileak: BHT, 2-BHA eta 3-BHA,
- d) isotiazolinonak: metilisotiazolinona, klorometilisotiazolinona eta bentzisotiazolinona eta,
- e) bentzofenona motako UV-iragazkiak: bentzofenona-3 eta bentzofenona-4.

Europar Batasuneko 1223/2009 araudiaren ondorioz, zenbait metodologia garatu dira kontserbagarriak eta UV-iragazkiak bereizita edo aldeberean kuantifikatzeko. Kontserbagarriak kuantifikatzeko metodo gehienek, GC-MS edo HPLC —HPLC-UV zein HPLC-MS— dute oinarri, 3.3.1. azpiatalean adierazi den moduan (Gao eta Legido-Quigley, 2011; Alvarez-Rivera *et al.*, 2014; Celeiro *et al.*, 2014). Era berean, UV-iragazki organikoak determinatzeko ohikoenak diren metodoak gas- edo likido-kromatografian oinarritzen dira, 3.3.1. azpiatalean aztertu den bezala (Chisvert *et al.*, 2013; Liao eta Kannan, 2014). Gauza bera esan daiteke kontserbagarrien eta UV-iragazkien aldebereko analisiari buruz, 3.7. taulan ikusgai dagoena. Elektromigrazio-tekniken aplikazioari dagokionez, kontserbagarrien analisi elektroforetikoa 3.2.1. eta 6.2. azpiataletan jaso da eta, laburbilduz, aipatu behar da CZE eta MEKC teknikak erabili direla gehien parabenoen determinazioan (Cheng *et al.*, 2012; Xue *et al.*, 2013; Dolzan *et al.*, 2013). Bentzofenona motako UV-iragazkien banaketa elektroforetikoa ere lortu da (Deng *et al.*, 2011), baina, ez horien aldebereko kuantifikazioa. Era berean, bibliografian jasotako metodoek ez dituzte prozedura aldagaiantzak aplikatzen optimizazioan.

Aurreko bi kapituluetan deskribatu den gisara, zientzia kromatografikoen erronkarik handienetakoa da konposatu askoren aldebereko kuantifikazioa lortzea. Helburu hori lortzeko estrategien artean, erantzun-funtzioen erabilpena azpimarragarria da (Rakic *et al.*, 2013). Ikerketa honetan, MCRF erantzun-funtzioa erabili zen, eta bere aplikagarritasuna frogatuta geratu zen musketa poliziklikoen, lurrin alergenoen eta kontserbagarrien analisisian era arrakastatsuan aplikatu zenean (Lopez-Gazpio *et al.*, 2012; Lopez-Gazpio *et al.*, 2014). MCRFren erabilpenak nabarmen erraztu zuen optimizazio prozedura, nagusiki analito kopurua handiagoa zenean, alegia, lurrin alergenoen eta kontserbagarrien aldebereko analisisian.

Jarraian azaltzen den ikerketaren helburua aldeberean kontserbagarriak eta ultramore-iragazkiak kosmetiko, zainketa pertsonalerako eta etxeko produktuetan kuantifikatzeko MEKC metodo elektroforetikoa garatzea izan zen. Interes berezia

izan zuen isotiazolinonen banaketa elektroforetikoak, izan ere, inoiz ez dira elektromigrazio-tekniken bidez kuantifikatu, ez bakarrik ezta aldebereko analisisetan ere. Era berean, ikerketaren bigarren helburua MCRF erantzun-funtzioaren aplikagarritasuna zabaltzea zen, diseinu esperimentalarekin batera, konposatu asko kuantifikatzeko garatzen diren metodo elektroforetikoak era errazean optimizatzeko erabilgarria dela frogatuz.

7.2. Materialak eta metodoa

7.2.1. Erreaktiboak

ProClin 300, metilisotiazolinona, bentzisotiazolinona, azido sorbikoa, triklosana, hidroxitolueno butilatua, hidroxianisol butilatua, metilparabenoa, etilparabenoa, propilparabenoa, butilparabenoa, bentzofenona-3, bentzofenona-4 eta sodio tetraborato dekahidratoa (STB) Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania) enpresari erosi zitzaizkion. Azido salizilikoa, azido bentzoikoa, sodio dodezilsulfatoa (SDS) eta metanola (MeOH) Panreac Química S.A. (Bartzelona, Espainia) enpresari erosi zitzaizkion. ProClin 300 erreaktiboak, 2-metil-3-isotiazolinona (%0,78) eta 5-kloro-2-metil-3-isotiazolinona (%2,45) nahastea zen. Hidroxianisol butilatua, berriz, 3-*tert*-butil-4-hidroxianisol (3-BHA) eta 2-*tert*-butil-4-hidroxianisol (2-BHA) konposatuen nahaste isomerikoa zen, baina, bakoitzaren kontzentrazioa adierazten zenez eta 3-BHA purua ere eskuragarri zegoenez, isomero bakoitzaren seinalea identifikatu ahal izan zen. Hortaz, kasu honetan bi isomeroak bereizita aztertu ziren, aurreko kapituluan isoeugenolaren eta zitralaren kasuan ez bezala.

Erreaktibo guztiek erreaktibo analitiko gradua zuten, testuan besterik aipatzen ez bada. Ikerketan erabilitako ur bidistilatua Aquatron A4D (J. Bibby Sterilin Ltd., Stone, Erresuma Batua) sistemari esker lortu zen.

Bentzalazetona erabili zen barne-patroi bezala (IS, *Internal Standard*) eta Fluka (Alemania) enpresari erosi zitzaion. ISa MeOH-tan disolbatuta prestatu zen, 1 g/L kontzentrazioan. *Stock* disoluziotik kantitate egokia hartuta, amaierako kontzentrazioa elektroforesi bialean 31,6 µg/mL zen. Bentzalazetona aukeratzeko hainbat saiakuntza egin ziren, izan ere, elektroferogramako lehen eta azken seinaleen tarteko migrazio denborako konposatu bat aurkitu nahi zen. ISaren erabilpenari buruzko xehetasunak aurreko kapituluko 6.2.1.1. azpiatalean aurki ditzake irakurleak.

UV-iragazkien eta kontserbagarrien *stock* disoluzioak prestatzeko metanola erabili zen eta disoluzioek 5 g/L kontzentraziokoak ziren. Kalibraketan erabilitako disoluzio estandarrak prestatzeko *stock* disoluzioen diluzio egokiak egin ziren %10 (v/v) MeOH zen ur-disoluzioarekin. *Stock* disoluzioak era independentean prestatu ziren, alegia, analito guztiak bereizita zeuden, baina, kalibraketarako analitoen nahasteak (*mix*) prestatu ziren. Disoluzio elektrolitiko, estandar eta lagin guztiak iragazi egin ziren injektatu aurretik, 0,45 µm-ko nylon iragazkiak erabiliz (Teknokroma, Bartzelona, Espainia). Era berean, disoluzio guztiak hozkailuan gorde ziren (4°C-tan) eta giro tenperaturara egokitu arte itxaron zen erabili aurretik.

7.2.2. Instrumentazioa eta prozedura

Esperimentu guztiak aurrera eramateko Agilent G7100A CE ekipoa (Agilent Technologies International Sarl, Morges, Suitza) erabili zen, lerrokatutako diodoen ultramore-ikusgai detektagailua (DAD) zuena. *Chemstation Software (Rev. B.04.02)* delakoa zuen ekipoa kontrolatzeko eta datuak jasotzeko. Diseinu esperimentala eta erantzun-gainazalen analisia egiteko Statistica 6.0 softwarea erabili zen (StatSoft, Inc., Tulsa, AEB). Kapilarrek 50 µm-ko barne diametroa zuen eta 64,5 cm luze zen; bestetik, 56 cm-ko luzera eraginkorra zuen —hau da, detektagailurainoko luzera—. Detekzio zelda *extended light path* motakoa zen (*bubble cell*) eta silize urtuzkoa zen (Agilent Technologies). Kapilarra lehen aldiz erabili aurretik 1 M NaOH (15 min), 0,1 M NaOH (15 min) eta ur bidistilatua (15 min) igaroarazi ziren. Injekzio batetik bestera kapilarra garbitzeko 0,1 M NaOH (3 min), ur bidistilatua (3 min) eta BGE disoluzioa (5 min) igaroarazi ziren.

Optimizatutako MEKC metodoan erabilitako disoluzio mizelar elektrolitikoaren elektrolito eta surfaktante kontzentrazioa 18 mM STB eta 60 mM SDS zen, hurrenez hurren. BGEa prestatzeko, elektrolitoa eta surfaktantea %10 (v/v) MeOH ur-disoluzioan disolbatu ziren eta pHa 9,4ra doitu zen. BGE n MeOH gehitzea ezinbestekoa zen analito hidrofoboaren hauspeaketa saihesteko. Kasu honetan MeOH kontzentrazioaren balioa optimizazio prozeduran lortu zen. Aipatzekoa da %10 (v/v) MeOH balioa lortu zela optimizazioan —aurrerago ikusiko den bezala—, eta balio hori aurreko kapituluaren lortutakoaren berdina dela, nahiz eta kasu hartan ez zen optimizazio prozeduran aztertu.

Lagina eta estandarrak injektatzeko 45 mbar-eko presioa aplikatu zen 8 segundoz —injekzio hidrodinamikoa— eta banaketa lortzeko 30 kV-ko potentzial-diferentzia konstantea aplikatu zen. Kapilarren tenperatura 25 °C-tan finkatu zen. Detektagailuan 210 nm-ko uhin-luzera ezarri zen analitoak kuantifikatzeko, azido sorbikoaren (260 nm), metilisotiazolinonaren (275 nm) eta klorometilisotiazolinonaren (275 nm) kasuan izan ezik. Pikoaren identifikazio egiteko

190-400 nm-ko tartean erregistratuz zen espektro osoa. Beharrezkoa zenean, aurreko ataletan egin zen bezala, pikoek identifikaziorako ISarekiko migrazio denbora erlatiboa kalkulatu zen edota laginei patroien estandarra gehitu zitzaien.

7.2.3. Laginak eta laginen prestaketa

Hainbat kosmetiko, zainketa pertsonalerako produktu eta etxeko beste produktu aztertu ziren, borondatezko kolaboratzaileei esker Gipuzkoako hainbat saltokitan lortutakoak. Tokiko zein nazioarteko markak aztertu ziren eta *Leave-on* eta *rinse-off* kosmetikoak analizatu ziren, araudiak bereizita aipatzen dituelako eta, hortaz, muga desberdinak dituztelako. Produktu kosmetikoak —xanpuak, gelak, xaboiak, perfumeak eta kremak—, zainketa pertsonalerako beste produktuak —hortzetako pasta—, etxeko produktuak —aire-gozagarria, baxera-detergentea— eta bestelako produktuak —txakurren xanpua— aztertu ziren. Guztira 24 PCP analizatu ziren.

Laginen prestaketa prozedura sinplea izan zen, aurreko ataletan bezala: zehazki pisatutako lagin kantitatea %10 (v/v) MeOH zen ur-disoluziotan disolbatu zen. Ultrasonikazioa aplikatu zen 5-10 minutuz lagina disolbatzeko beharrezkoa zen kasuetan. Ondoren, ISa gehitu zen eta 0,45 µm-ko nylon iragazkiak erabiliz iragazi egin zen. Azkenik, zuzenean ipini zen disoluzioa CE bialeetan analizatzeko. Laginen analisisa, oraingoan ere, aurretratatamendurik gabe egin zen; tratamendu bakarra PCPa diluitzea eta barne-patroia gehitzea izan zen. Aurreko kasuetan bezala, analitoak kontzentrazio oso desberdinetan aurkitu zirenez, diluzio egokiak egin behar izan ziren lagin bakoitzarekin eta sarritan bat baino gehiago. Kuantifikazioa, aipatu den bezala, barne-patroiaren metodoa aplikatuz egin zen eta azalera normalizatuak erabili ziren kalibraketa zuzenak lortzeko, 6.2.1.1. azpiatalean deskribatu den moduan.

7.3. Emaitzak eta eztabaida

7.3.1. Metodoaren optimizazioa

Metodoa optimizatzeko diseinu konposatu zentrala (CCD) erabili zen. Diseinuaren aukeraketa egiteko kontuan hartu zen, alde batetik CCD diseinuen eraginkortasuna eta malgutasuna, alegia, esperimendu kopuru nahiko txikiarekin informazio erlatiboki handia lortzeko aukera. Bestetik, aurreko kapituluan bezala, aldagai guztiak aldiberean muturreko balioan egoteko aukera aztertu nahi izan

zen (Hanrahan *et al.*, 2008). Lau aldagaiko CCDa prestatu zen, 7.1. taulan ikus daitekeen maila kodifikatuen eskema jarraituz. Ikus daitekeenez, $\alpha = \pm 1$ zen eta, $N = 2^k + 2k + C_0$ formularen bidez 7.1. taulan jasotako 25 esperimentuak lortzen dira — $k = 4$ eta $C_0 = 1$ izanik—. Aurreko kapituluaz aztertutako hiru aldagaiak berriz ere aukeratu ziren, alegia, surfaktante mizelar kontzentrazioa, sodio tetraborato elektrolito kontzentrazioa eta pHa. Hiru horietaz gainera, aurreko kapituluaz optimizazio prozeduran kontuan hartu ez zen aldagaia sartu zen, metanol kontzentrazioa, hain zuzen ere. 6. kapituluaz, elektrolito disoluzioak derrigor MeOH izan behar zuela ikusi zen, analito hidrofoboaren hauspeaketa arazoak saihesteko, baina, ehunekoa %10ean ezartzea erabaki arbitrarioa izan zen, nahiz eta aldeztu aurretik egindako proben eskarmentuan oinarrituta egon. Kasu honetan, MeOH ehunekoa ere diseinu esperimentalean gehitu zen eta, beraz, optimizazio prozeduran aztertu zen.

7.1. Taula. CCD diseinuaren maila kodifikatuak, lau aldagaien kasurako.

Esperimentua	x_1	x_2	x_3	x_4
1	-1	-1	-1	-1
2	-1	-1	-1	1
3	-1	-1	1	-1
4	-1	-1	1	1
5	-1	1	-1	-1
6	-1	1	-1	1
7	-1	1	1	-1
8	-1	1	1	1
9	1	-1	-1	-1
10	1	-1	-1	1
11	1	-1	1	-1
12	1	-1	1	1
13	1	1	-1	-1
14	1	1	-1	1
15	1	1	1	-1
16	1	1	1	1
17	-1	0	0	0
18	1	0	0	0
19	0	-1	0	0
20	0	1	0	0
21	0	0	-1	0
22	0	0	1	0
23	0	0	0	-1
24	0	0	0	1
C	0	0	0	0

(C): Puntu zentrala.

Hortaz, esandakoa kontuan hartuz, CCDko aldagaiak eta mailak honako hauek izan ziren:

- 1) SDS kontzentrazioa: 60, 80 eta 100 mM,
- 2) STB kontzentrazioa: 18, 24 eta 30 mM,
- 3) elektrolito disoluzioaren pHa: 9,0, 9,2 eta 9,4 eta,
- 4) MeOH ehunekoa: %0, %5 eta %10.

Aipatutako aldagaien eta mailen laburpena 7.2. taulan dago ikusgai. Aldagai horien aukeraketa arrazoitzeko, gogoratu behar da MEKC banaketetan garrantzi gehien duten aldagaiak honako hauek direla bibliografiaren arabera (Felhofer eta Garcia, 2010):

- 1) surfaktante kontzentrazioa,
- 2) elektrolito kontzentrazioa,
- 3) BGEren pH-a,
- 4) gehigarri organikoak eta,
- 5) aplikatutako potentzial-diferentzia.

Potentzial-diferentzia maximoa finkatu zen (30 kV) aurreko saiakuntzetako eskarmentuan oinarrituta eta, hortaz, beste lau aldagai garrantzitsuenak optimizazio prozeduran aztertu ziren.

7.2. Taula. Optimizatutako aldagaiak eta mailak.

Faktoreak	Maila		
	Baxua (-)	Zentrala (0)	Altua (+)
[STB] mM	18	24	30
[SDS] mM	60	80	100
pH	9,0	9,2	9,4
%MeOH (v/v)	0	5	10

Aldagaien mailak finkatzeko, 6. kapituluaren deskribatu den optimizazioaren garapena kontuan hartu zen. Aldagai esperimentalak eta haien mailak ezarri ondoren lortutako CCD osoa 7.3. taulan jasota dago.

7.3. Taula. CCD diseinuaren esperimentuak.

Esperimentua	[SDS], mM	[STB], mM	pH	%MeOH
1	60	18	9	0
2	60	18	9	10
3	60	18	9,4	0
4	60	18	9,4	10
5	60	30	9	0
6	60	30	9	10
7	60	30	9,4	0
8	60	30	9,4	10
9	100	18	9	0
10	100	18	9	10
11	100	18	9,4	0
12	100	18	9,4	10
13	100	30	9	0
14	100	30	9	10
15	100	30	9,4	0
16	100	30	9,4	10
17	60	24	9,2	5
18	100	24	9,2	5
19	80	18	9,2	5
20	80	30	9,2	5
21	80	24	9	5
22	80	24	9,4	5
23	80	24	9,2	0
24	80	24	9,2	10
25(C)	80	24	9,2	5
26(C)	80	24	9,2	5
27(C)	80	24	9,2	5
28(C)	80	24	9,2	5

(C): Puntu zentralak.

Mailak aukeratzeko hainbat faktore kontuan hartu behar izan ziren. pHaren kasuan, maila berdina mantentzea erabaki zen. STB kontzentrazioaren kasuan, atal hartan lortutako maila optimoa, alegia, 24 mM puntu zentralizat hartzea erabaki zen. SDS kontzentrazioaren kasuan, tartea zabaltzea erabaki zen —aurreko ikerkuntzan 95 mM-etik 105 mM-era bakarrik aztertu zen—, eta hortaz, 60 - 100 mM tartea aukeratu zen, beti ere aurreko atalean lortutako kontzentrazio optimoa (100 mM) tartea esperimentalaren barruan zegoela ziurtatuz. Azkenik,

MeOHri dagokionez, gehigarri organikorik ez gehitzeak epe luzean hauspeaketa arazoak sortuko bazituen ere CCDan %0 MeOH (v/v) ere kontuan hartu zen. Balio maximoa, aldiz, %10ean ezarri zen, MeOH kontzentrazio handiegiak BGEko mizelak desegin baititzake, eta ondorioz MEKC banaketa kaltetu. Era berean, mailen aukeraketa egiteko metodoen garapenerako gomendio generikoak kontuan hartu ziren (Altria eta McLean, 1998; Palmer, 2003).

3 puntu zentral gehitzea erabaki zenez, diseinuaren 25 esperimenduekin batera, guztira 28 esperimendu egin behar izan ziren. Aurreko kasuetan bezala, esperimendu guztiak zorizko ordenan egin ziren eta diseinuko esperimendu bakoitzaren elektroferograma erregistratu zen. Diseinurako analito guztien nahaste estandarra prestatu zen, eta bertan aurrerago kalibraketan erabiliko ziren kontzentrazioen tarteko kontzentrazioa aukeratu zen, gutxi gorabehera. Puntu zentralen kasuan lortutako emaitzek metodoaren errepikakortasuna baieztatu zuten.

CCD diseinu esperimentalean lortutako elektroferogramak erregistratu ondoren, hurrengo pausoa optimizazio estrategia globala ezartzea izan zen, alegia, erantzun-funtzio metodologia. Horretarako, elektroferograma guztien MCRF balioak kalkulatu ziren, 5.3.1.2. azpiatalean xehetasun guztiekin deskribatu den prozedura jarraituz —prozeduraren eskema 6.2. irudian ere ikus daiteke—.

Lehenik eta behin, MCRF kalkulatzeko bereizmenaren eta denboraren optimizazioaren irizpideak finkatu behar dira. Bereizmenaren kasuan, atal honetan ere irizpide berdinak mantendu ziren, alegia, $S^{k,k+1} = 0,9$ desiragarritasuna eman zitzaion $R^{k,k+1} = 2,0$ bereizmenari eta $S^{k,k+1} = 0,1$ desiragarritasuna $R^{k,k+1} = 0,5$ bereizmenari. Muga-baldintza horiek finkatuta, 5. kapituluaren deskribatu den (5.3) ekuazioko b_0 eta b_1 parametroen balioak 2,93 eta 3,66 ziren, hurrenez hurren.

$$S^{k,k+1} = \frac{1}{1 + e^{-b_0 \cdot R^{k,k+1} + b_1}} \quad (5.3)$$

Analisi denbora totalaren kasuan antzekoa eginez, (5.5) ekuazioko b_2 eta b_3 parametroak kalkulatu ziren. Horretarako, $g = 0,8$ desiragarritasuna eman zitzaion $T = 11,75$ min denborari —diseinuko esperimendu motzena— eta $g = 0,1$ desiragarritasuna $T = 38$ min denborari —esperimendu luzeena—. Muga-baldintza horiek finkatuta, b_2 eta b_3 parametroen balioak 0,137 eta -2,99 ziren, hurrenez hurren.

$$g = \frac{1}{1 + e^{b_2 \cdot T + b_3}} \quad (5.5)$$

Azkenik, MCRF balioa kalkulatzeko (5.7) adierazpena erabili zen, aurreko kapituluaren deskribatu den moduan.

$$\text{MCRF}(S, g) = \left[\sum_{i=1}^{N-1} e^{\alpha(s_{opt} - s_i)} + 1 \right] \cdot \left[2 - \frac{g}{g_{opt}} \right] \quad (5.7)$$

Beraz, (5.7) adierazpenaren ezkerreko aldea bereizmenarekin lotura duen atala da (MCRF_R) eta eskuineko aldea, aldiz, analisi denbora totalarekin lotura duen atala (MCRF_T). Bestalde, α faktoreaak bereizmenari dagokion atalaren eta denborari dagokion atalaren garrantzi erlatiboa doitzeko aukera ematen du.

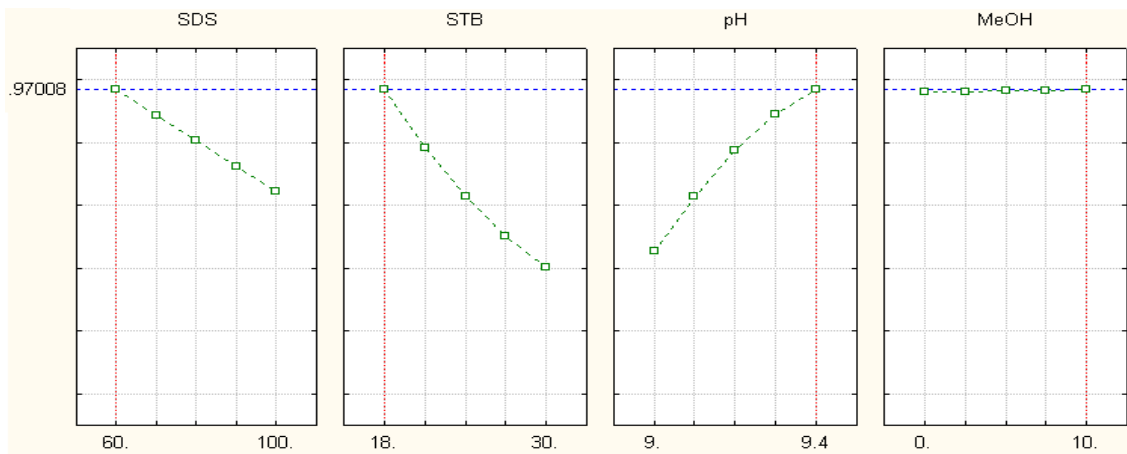
7.4. Taula. CCD diseinu esperimentalaren mailak eta erantzunak, UV-iragazki eta kontserbagarriekin patroiekin lortutakoak.

Esp.	[STB]	[SDS]	pH	%MeOH	RP	R_{cp}	$T(\text{min})$	MCRF_T	MCRF_R	MCRF
1	60	18	9	0	16	0	11,8	1,1	36,6	40,7
2	60	18	9	10	16	0	27,8	1,4	33,2	46,2
3	60	18	9,4	0	17	1,1	12,2	1,2	21,1	23,7
4	60	18	9,4	10	17	1,9	28,5	1,4	13,2	18,6
5	60	30	9	0	16	0	18,8	1,2	32,3	39,4
6	60	30	9	10	17	1,6	38	1,6	14,2	22,7
7	60	30	9,4	0	16	0	22,5	1,3	28,0	36,1
8	60	30	9,4	10	16	0	60	1,9	25,9	49,0
9	100	18	9	0	15	0	17	1,2	40,8	48,6
10	100	18	9	10	16	0	32,2	1,5	32,3	47,9
11	100	18	9,4	0	16	0	18	1,2	49,2	59,5
12	100	18	9,4	10	17	1,3	32,5	1,5	15,4	22,9
13	100	30	9	0	17	0,4	19	1,2	29,3	35,8
14	100	30	9	10	17	1,5	60	1,9	14,1	26,6
15	100	30	9,4	0	17	1,0	25	1,3	26,1	34,9
16	100	30	9,4	10	16	0	60	1,9	26,3	49,6
17	60	24	9,2	5	16	0	19	1,2	30,8	37,8
18	100	24	9,2	5	16	0	28,5	1,4	36,2	51,0
19	80	18	9,2	5	17	1	21	1,3	22,3	28,2
20	80	30	9,2	5	16	0	26	1,4	25,9	35,2
21	80	24	9	5	15	0	21,5	1,3	42,4	53,8
22	80	24	9,4	5	17	1,5	26,2	1,4	14,3	19,4
23	80	24	9,2	0	17	1,1	17,8	1,2	19,1	23,0
24	80	24	9,2	10	15	0	32	1,5	39,1	57,8
25(C)	80	24	9,2	5	16	0	22	1,3	25,9	33,2
26(C)	80	24	9,2	5	16	0,5	21	1,3	23,2	29,3
27(C)	80	24	9,2	5	16	0	23	1,3	27,1	35,2
28(C)	80	24	9,2	5	16	0	23,5	1,3	26,4	34,6

C: Puntu zentrala; RP: banatutako piko kopurua; R_{cp} : piko kritikoaren bereizmena; T: analisi denbora totala; MCRF: erantzun-funtzio kromatografiko aldatua; MCRF_R : MCRF aren bereizmenari dagokion atala; MCRF_T : MCRF aren denborari dagokion atala

Amaitzeko, b_0 , b_1 , b_2 eta b_3 parametroak lortu ondoren, (5.7) ekuazioko beste parametro arbitrarioak finkatu ziren, hain zuzen ere, $S_{opt} = 0,9$, $g_{opt} = 0,9$ eta $\alpha = 3$ balioak ezarriz. Parametro guztiak finkatu ondoren, CCD diseinuko banaketa elektroforetiko guztien MCRF balioak kalkulatu ziren eta, konparaketak egin ahal izateko, banatutako piko kopurua (RP, *Resolved Peaks*) eta R_{cp} (*Resolution of the Critical Pair*) ere kalkulatu ziren (7.4. Taula). Gogoratzekoa da proposatutako MCRF funtzioan balio minimoak direla optimoak, alegia, MCRFren balioa zenbat eta txikiagoa izan banaketa kromatografikoa orduan eta eraginkorragoa da.

Puntu horretan optimizazio prozedurak aurreko bi kapituluetan egin denarekiko desberdintasun garrantzitsua du. MCRF funtzioak baldintza elektroforetikoak era eraginkorren optimizatzeko bermea duenez, kasu honetan ez zen RSM metodologia aplikatu. Zuzenean, 7.4. taulako datuak aztertuta MCRF minimoko puntua aukeratu zen baldintza experimental optimoak finkatzeko. Prozedura horren arabera, 4. puntu experimentalak zuen MCRF baliorik txikiena (18,6) eta 11. puntuak, aldiz, baliorik handiena (59,5). Ondorioz, 4. puntu esperimentaleko baldintzak aukeratu ziren: 60 mM SDS, 18 mM STB, pH = 9,4 eta %10 MeOH (v/v). Statistica programa erabiliz Derringer desiragarritasuna irudikatzen bada, ondorio bera lortzen da (7.2. Irudia).



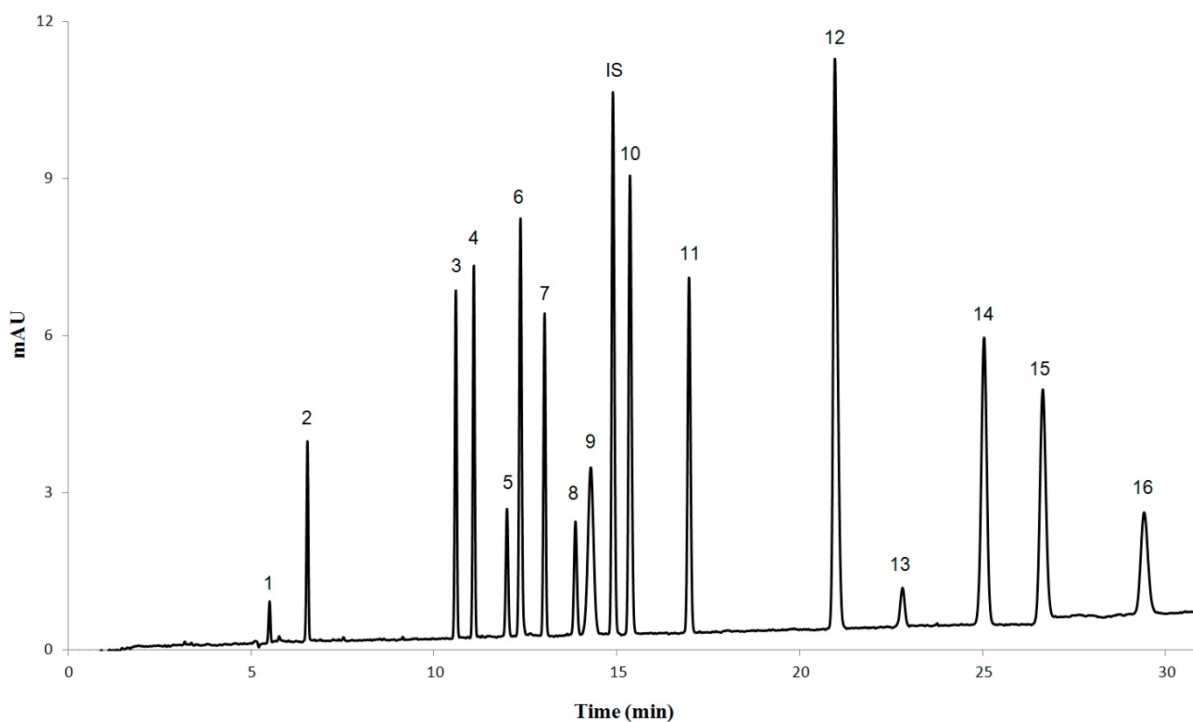
7.2. Irudia. Desiragarritasun optimoa (0,97) lortzeko, alegia, erantzun egokiena lortzeko, baldintza esperimentalak: 60 mM SDS, 18 mM STB, pH = 9,4 eta %10 (v/v) MeOH.

7.3. Irudian ikusgai dago baldintza experimental optimoetan lortutako analito guztien banaketa elektroforetiko. Bereziki nabarmendu behar da deskribatutako erantzun-funtzioaren prozedura erabiliz era simple eta errazean analito asko dituen banaketa elektroforetiko optimizatzea posible izan zela. Amaitzeko, azpimarragarria da MeOH ehunekoaren kasuan lortutako balioa; izan ere, lehenago aipatu den bezala metanola ez zen optimizazioan kontuan hartu aurreko kapituluko ikerketan eta %10eko metanol portzentajea gehitzea erabaki arbitrarioa izan zen —alde aurreko eskarmentuan bakarrik oinarritua—. Kasu

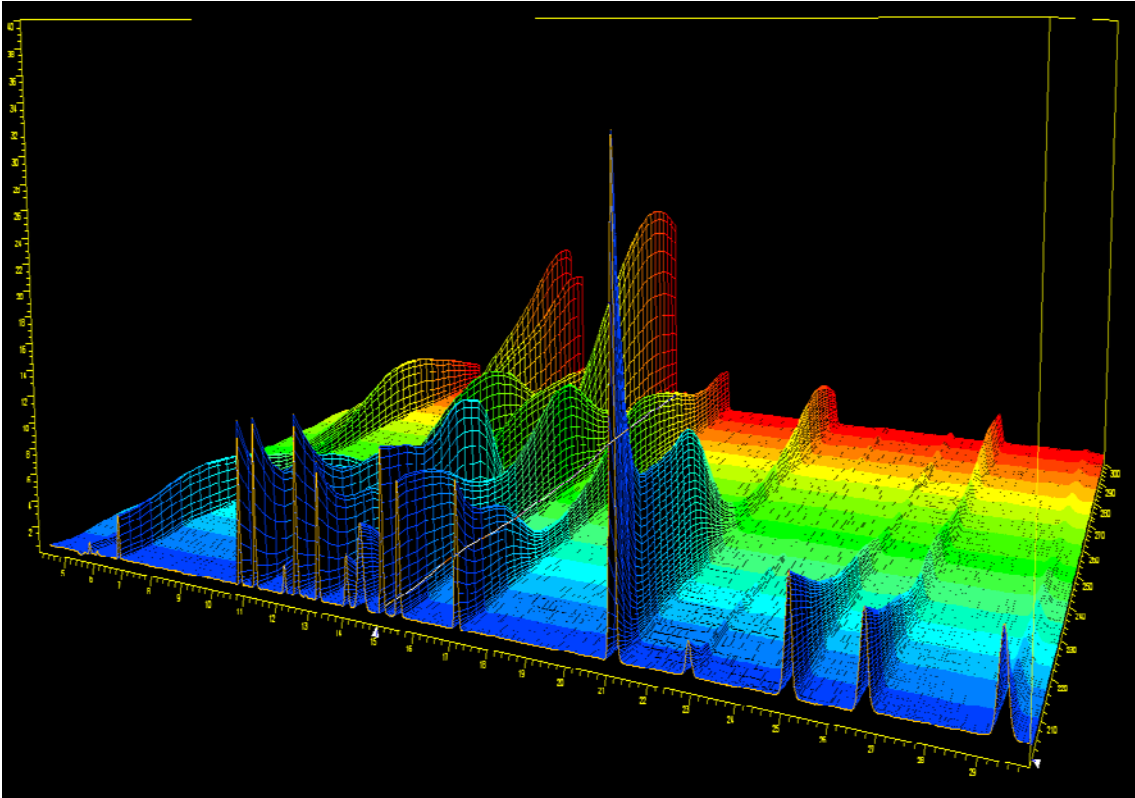
honetan optimizatutako aldagaia da eta, balio bera lortu da optimizazioaren ondoren: %10 MeOH (v/v). 7.4. Irudian lerrotutako diodoen detektagailuari esker lortutako elektroferograma tridimentsionala dago ikusgai, 7.3. irudian ikusi den banaketa elektroforetikoari dagokiona, hain zuzen ere.

7.3.1.1. MCRF erantzun-funtzioa: zenbait ohar

Testu honetan zehar sarritan aipatu da banaketa elektroforetikoak —eta jakina, kromatografikoak— optimizatzerakoan agertu ohi diren arazoak. Bereziki banatu nahi den analito kopurua handia denean agertzen dira, noski, ikerketa honen kasuan bezala, 16 analito aldiberean kuantifikatzen baitira. Optimizazio irizpide globalak garatzeko estrategia asko deskribatu dira literatura zientifikoan, aipagarria da, besteak beste, Rakic eta bere lankideek egindako berrikuspen sakona (Rakic *et al.*, 2013).



7.3. Irudia. Baldintza optimoetan lortutako elektroferograma. BGEren konposaketa: 18 mM STB, 60 mM SDS, pH = 9,4 eta %10 MeOH; potentzial-diferentzia: 30 kV; laginaren injekzioa: 45 mbar, 8 segundoz. Pikoien identifikazioa: 1) metilisotiazolinona, 2) klorometilisotiazolinona, 3) metilparabenoa, 4) etilparabenoa, 5) azido sorbikoa, 6) bentzisotiazolinona, 7) butilparabenoa, 8) azido bentzoikoa, 9) azido salizilikoa, 10) bentzofenona-4, 11) propilparabenoa, 12) 3-BHA, 13) 2-BHA, 14) triklosana, 15) bentzofenona-3, 16) BHT eta IS) barne-patroia. Detekziorako uhin-luzera 210 nm-koa da irudian, baina metilisotiazolinona (275 nm), klorometilisotiazolinona (275 nm) eta azido sorbikoa (260 nm) ez ziren uhin-luzera horretan kuantifikatu.



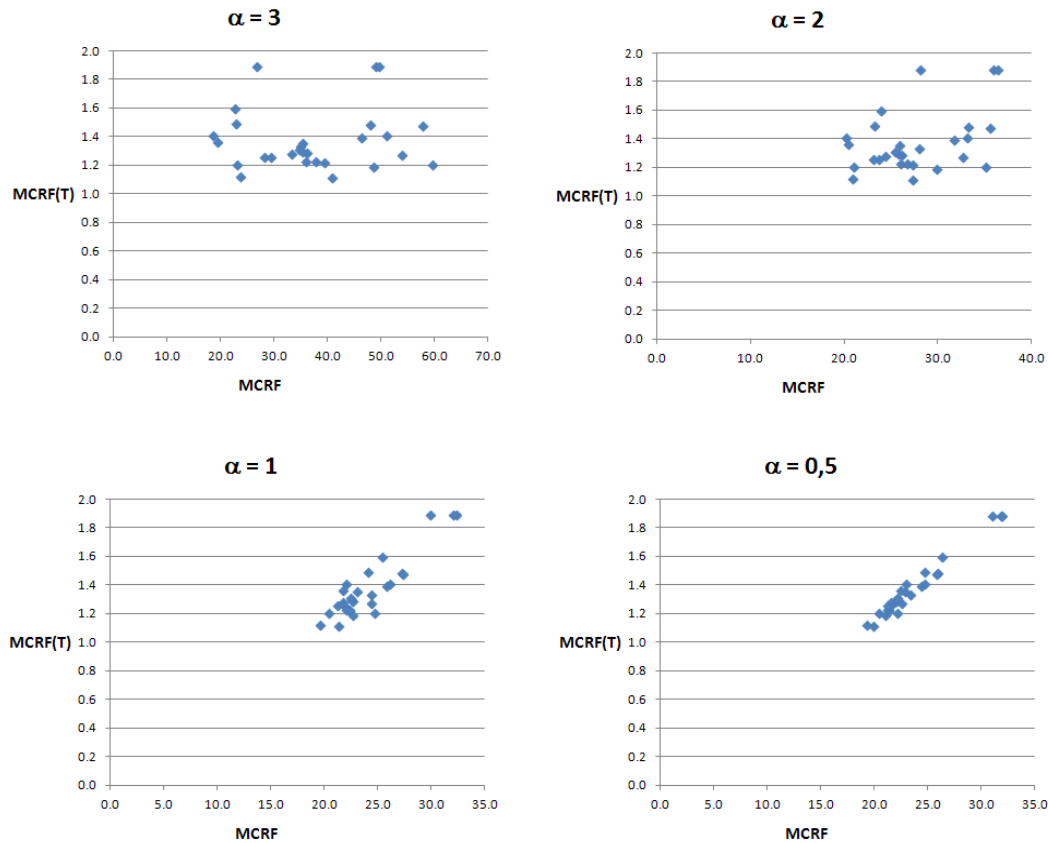
7.4. Irudia. Lerrokatutako diodoen detektagailu ultramoreari esker lortutako elektroferograma tridimentsioanala. Banaketa elektroforetikoa 7.3. irudian ikusi den berdina da, alegia, baldintza optimoetan lortutako 16 analitoen banaketa optimoa. Pikoen identifikazioari eta beste baldintzei buruzko xehetasunak 7.3. irudiaren oinean jasota daude.

7.3.1 azpiatalean azaldu dena kontuan hartuz, hiru aldiz aplikatu da MCRF erantzun-funtzioaren estrategia ikerketa honetan, lau analito mota kuantifikatu direnean, hain zuzen ere,

- 1) musketa poliziklikoak (5. kapituluatan),
- 2) lurrin alergenokoak (6. kapituluatan),
- 3) kontserbagarriak (6. eta 7. kapituluatan) eta,
- 4) UV-iragazkiak (7. kapituluatan).

Lortutako emaitzek eta eskarmentu esperimentalak erakutsi dutenez, MCRF funtzioaren atal onuragarriena α parametroa erantzun-funtzioran sartzea izan da. Horren bidez, azaldu den moduan, MCRF funtzioaren bereizmenari dagokion atalaren —MCRF_R, alegia, (5.7) ekuazioan ezkerreko kortexteen artean dagoena—

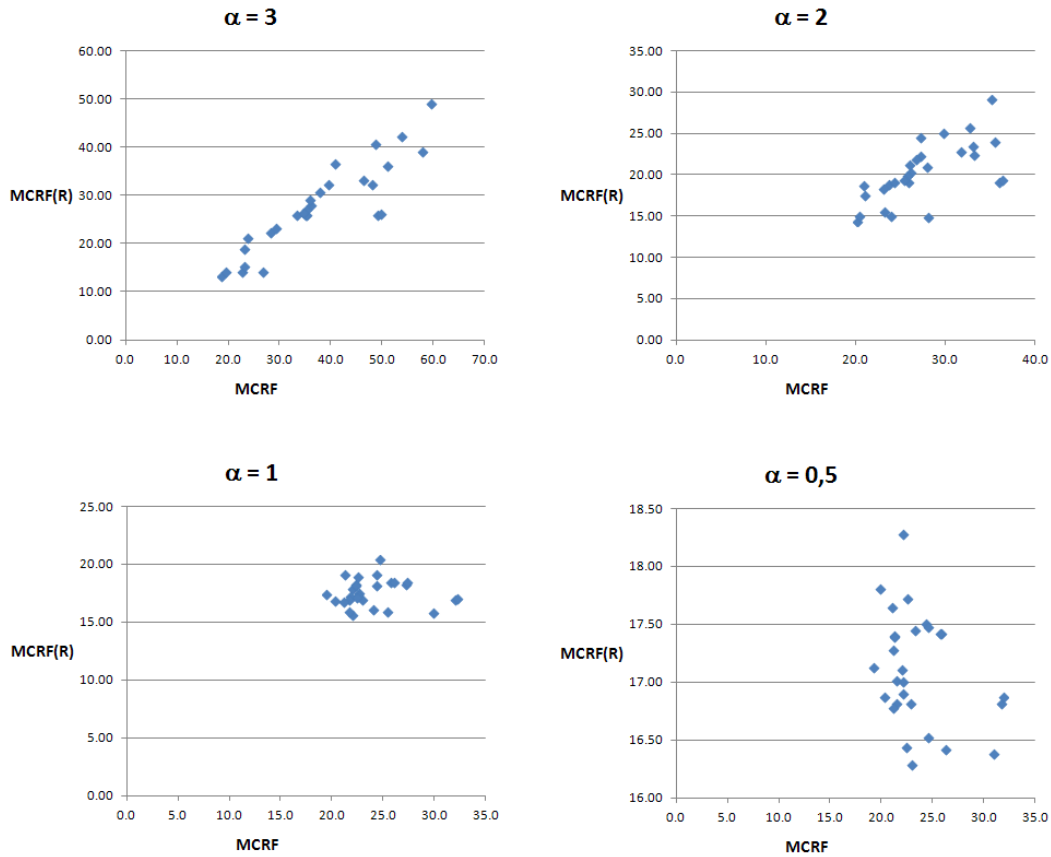
eta denborari dagokion atala — $MCRF_T$, (5.7) ekuazioan eskuineko kortxeteen artean dagoena— eta denborari dagokion atalaren garrantzi erlatiboa doitzeko aukera dago. Ikerketa honetan, pikoaren arteko bereizmen ona migrazio denbora laburra baino garrantzitsuagoa zela erabaki zenez, α parametroaren balio nahiko handiak ezarri zen: $\alpha = 2$ musketa poliziklikoen banaketaren kasuan eta $\alpha = 3$ beste bi kasuetan.



7.5. Irudia. $MCRF_T$ eta $MCRF$ balioen arteko korrelazioa, α parametroaren arabera.

α parametroaren eragina aztertzeko jarraian grafiko multzo bat aurkezten da. Grafiko horietan, α -ren balio desberdinak ezarri dira —hurrenez hurren, 3, 2, 1 eta 0,5—. Argi ikus daiteke $MCRF$ balio globalaren eta $MCRF_R$ zein $MCRF_T$ balioen arteko korrelazioa. 7.5. Irudian $MCRF$ balio globalaren eta $MCRF_T$ -ren arteko korrelazioa dago ikusgai, α parametroaren balio desberdinen arabera. Funtzioaren analisia egiteko, 7.4. taulan jasotako datuak erabili dira. $\alpha = 1$ balioa edo hori baino txikiagoak ezartzen badira, $MCRF$ globalak analisi denbora totalaren menpe egongo da, nagusiki. Bereizmenari dagokionez ere antzeko ondorioa lor daiteke 7.6. irudian aurkezten diren emaitzak ebaluatzen badira. Bertan ikus daiteke $\alpha = 3$ denean $MCRF_k$ pikoaren arteko bereizmenaren menpe dagoela eta, α -ren balio murriztu ahala korrelazio hori geroz eta txikiagoa dela. Aztertutakoaren arabera, $MCRF_k$ bi aukerak ematen dituela azpimarratu behar da eta kasuan kasu erabaki behar da bereizmen handiko banaketa edo analisi denbora laburreko banaketa

nahi den. Era berean, bi argudioen arteko egoerak ere har daitezke irizpide moduan. Edonola ere, α -ri esker era errazean alda daiteke optimizatu nahi den erantzuna eta, ikerketa honen kasuan, $\alpha = 2$ eta $\alpha = 3$ balioek era egokian doitu zuten bereizmenaren eta denboraren garrantzi erlatiboa.



7.6. Irudia. $MCRF_R$ eta $MCRF$ balioen arteko korrelazioa, α parametroaren arabera.

7.3.2. Ezaugarri analitikoak

MEKC baldintza optimoetan, metodoaren ezaugarri analitikoak aztertu ziren, hala nola linealtasuna eta kalibraketa zuzenekin lotura duten beste parametroak, detekzio eta kuantifikazio mugak, errepikakortasuna, bitarteko doitasuna eta zehaztasuna.

7.3.2.1. Kalibraketa zuzenak eta linealtasuna

Aurreko azpiatalean aipatu den bezala, barne-patroiaren metodoa erabili zen UV-iragazkiak eta kontserbagarriak kuantifikatzeko. Kalibraketak lortzeko azalera normalizatuak ere erabili ziren, 6.2.1.1. azpiatalean azaldutako arrazoen ondorioz —nagusiki, migrazio denboren gorabeheren efektuak minimizatzeko—. Beraz, barne-patroiaren eta azalera normalizatuaren erabilera elkartuta, kalibraketa zuzenak irudikatzeko analitoaren kontzentrazioa — X ardatzean— analitoaren azalera normalizatuaren eta barne-patroiaren azalera normalizatuaren erlazioarekiko — Y ardatzean— irudikatu zen, alegia, $A_{n,i}/A_{n,bp} = (A_i/t_{m,i})/(A_{bp}/t_{m,bp})$. Kalibraketa egiteko 16 analitoen 5 estandar prestatu eta analizatu ziren —7.5. taulan jasotako kontzentrazio tartean— zorizko ordenan.

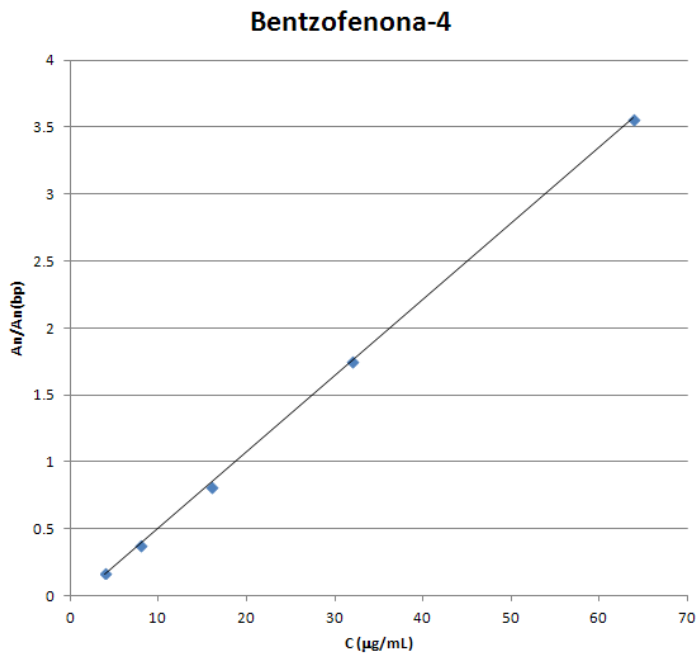
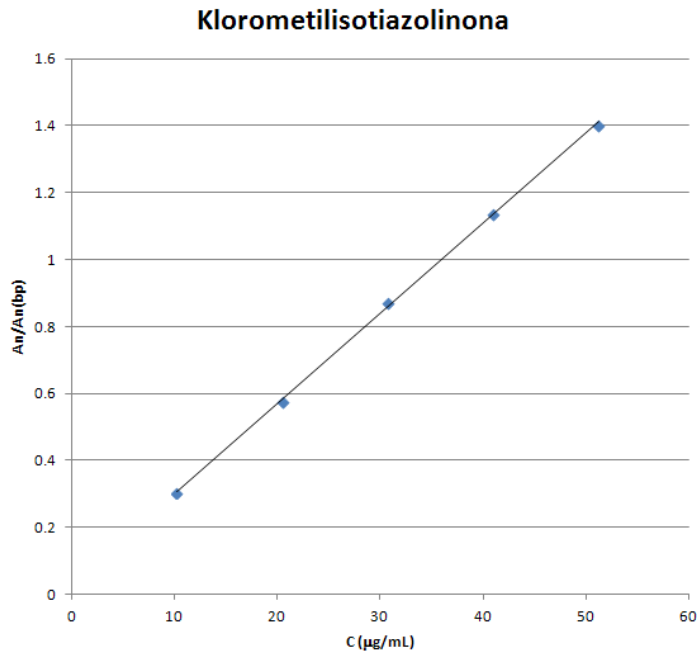
7.5. Taula. Kalibraketa zuzenen parametro analitikoak.

Konposatua	Tarte lineala ($\mu\text{g/mL}$)	Malda ^a	Ordenatua jatorrian ^a	R^2
1 Metilisotiazolinona	3,92 – 83,51	$0,0472 \pm 0,00087$	$-0,0204 \pm 0,0367$	0,9996
2 Klorometilisotiazolinona	3,50 – 51,24	$0,0269 \pm 0,00094$	$0,0313 \pm 0,0318$	0,9969
3 Metilparabenoa	4,32 – 65,25	$0,0316 \pm 0,00088$	$-0,0078 \pm 0,0296$	0,9991
4 Etilparabenoa	4,79 – 64,64	$0,0297 \pm 0,00093$	$0,0337 \pm 0,0310$	0,9994
5 Azido sorbikoa	4,71 – 65,42	$0,0960 \pm 0,00291$	$0,0472 \pm 0,0984$	0,9981
6 Bentzisotiazolinona	8,17 – 62,71	$0,0546 \pm 0,00300$	$-0,0659 \pm 0,0971$	0,9938
7 Butilparabenoa	5,78 – 64,88	$0,0356 \pm 0,00133$	$-0,0404 \pm 0,0447$	0,9968
8 Azido bentzoikoa	4,31 – 64,80	$0,0279 \pm 0,00078$	$0,0027 \pm 0,0262$	0,9951
9 Azido salizilikoa	5,19 – 65,55	$0,0870 \pm 0,00290$	$-0,1205 \pm 0,0981$	0,9938
10 Bentzofenona-4	2,72 – 63,82	$0,0569 \pm 0,00102$	$-0,0654 \pm 0,0337$	0,9921
11 Propilparabenoa	5,97 – 64,53	$0,0372 \pm 0,00145$	$-0,0352 \pm 0,0483$	0,9920
12 3-BHA	4,97 – 64,01	$0,0197 \pm 0,00065$	$-0,0150 \pm 0,0213$	0,9952
13 2-BHA	6,23 – 62,49	$0,0282 \pm 0,00059$	$-0,0108 \pm 0,0168$	0,9991
14 Triklosana	6,92 – 62,52	$0,0276 \pm 0,00129$	$0,0990 \pm 0,0416$	0,9958
15 Bentzofenona-3	6,79 – 69,64	$0,0383 \pm 0,00157$	$-0,1099 \pm 0,0566$	0,9972
16 BHT	8,41 – 101,71	$0,0036 \pm 0,00015$	$-0,0029 \pm 0,0101$	0,9933

^aErrorea %95eko konfiantza tarteari dagokio.

Estandarrak bi aldiz analizatu ziren eta bentzalazetona barne-patroiaren kontzentrazioa amaierako bialean $31,6 \mu\text{g/mL}$ zen, 7.2.1. azpiatalean adierazi den bezala. Kalibraketa zuzenei buruzko informazioa eta kalibraketarekin lotura duten parametroak 7.5. taulan jaso dira. Kalibraketa zuzenek linealtasun handia zuten, R^2 -ren balioa kasu guztietan 0,992 baino handiagoa baitzen. Aurreko kapitulu bezala, hondarren analisisa egin zen eta horiek banaketa normala zutela ikusi zen,

hortaz, erregresioen linealtasuna baieztatu zen. Tarte linealei dagokienez ere hobekuntza garrantzitsua lortu zen aurreko kapituluko emaitzekin alderatzen bada. Kasu honetan, tarte linealak zabalagoak ziren, kasu gehienetan 60 µg/mL-ra artekoak lortuz, gutxienez. 7.7. Irudian bi kalibraketa aurkezten dira adibide gisara.



7.7. Irudia. Klorometilisotiazolinona kontserbagarriaren eta bentzofenona-4 UV-iragazkiaren kalibraketa zuzenak.

7.3.2.2. Detekzio eta kuantifikazio mugak

5. kapituluko 5.3.2.2. azpiatalean definitu den bezala, detekzio muga kalkulatzeko hainbat prozedura deskribatu dira bibliografian (Koniczka eta Namieśnik, 2009), dena den, aipatutako erreferentzian azaltzen den moduan, analito kopurua handia denean LODa kalkulatzeko prozedura gomendatuena erregresio zuzenetik lortutako informazio estatistikoa erabiltzea da, 6. kapituluan egin den moduan. Gogoratua, LODak kalkulatzeko metodo desberdinei buruzko informazioa aipatutako bibliografian aurki daitekeela xehetasun guztiekin. Ikerketaren atal honetan aurreko kapituluko prozedura bera jarraituko da.

Hortaz, LODak kalkulatzeko, $(3,3 \times SD/b)$ adierazpena erabili zen, non $SD = SD_a$ den —hau da, ordenatu jatorriaren desbideraketa— eta b parametroa kalibraketa zuzenaren malda. Irizpide horrekin lortutako LODak 7.6. taulan jasota daude.

7.6. Taula. LOD eta LOQ parametroak.

	Konposatua	LOD ^a (µg/mL)	LOQ ^b (µg/mL)
1	Metilisotiazolinona	1,31	3,92
2	Klorometilisotiazolinona	1,17	3,50
3	Metilparabenoa	1,44	4,32
4	Etilparabenoa	1,60	4,79
5	Azido sorbikoa	1,57	4,71
6	Bentzisotiazolinona	2,72	8,17
7	Butilparabenoa	1,93	5,78
8	Azido bentzoikoa	1,44	4,31
9	Azido salizilikoa	1,73	5,19
10	Bentzofenona-4	0,91	2,72
11	Propilparabenoa	1,99	5,97
12	3-BHA	1,66	4,97
13	2-BHA	2,08	6,23
14	Triklosana	2,31	6,92
15	Bentzofenona-3	2,26	6,79
16	BHT	2,80	8,41

^aLOD = $(3,3 \times SD)/b$ (ikus. testua)

^bLOQ = $3 \times LOD$

Ikus daitekeenez, LODak 0,91 - 2,80 µg/mL tartean zeuden. LOQa kalkulatzeko, $LOQ = 3 \times LOD$ adierazpena aplikatu zen, aurreko kapituluetan bezala, non LOD aurreko paragrafoan deskribatutako detekzio muga den. Irizpide horrekin lortutako kuantifikazio mugak ere 7.6. taulan jasota daude eta guztiak 2,72 – 8,41 µg/mL tartean daude.

7.3.2.3. Doitasuna eta zehaztasuna

Kapitulu honetan ere, metodoak balioztatzeko aholkuei jarraituz (EURACHEM, 1998; Konieczka eta Namieśnik, 2009), 10 neurketa independente baino gehiago egin ziren (12) eta maila desberdinetan —maila altuan eta maila baxuan egin zen—. Errepikakortasuna lortzeko, beraz, 12 lagin independente analizatu ziren MEKC metodoa erabiliz eta elkarren segidako bi egunetan.

Kontzentrazio maila baxua LOQaren inguruko kontzentrazioan finkatu zen (7.6. Taula) eta maila altua, berriz, tarte linealaren kontzentrazio maximoa baino zertxobait baxuagoa, era horretan tarte lineal osoko informazioa eskuratu ahal izateko. Bi maila horietan analitoen disoluzio estandarrak prestatu ziren eta kontzentrazioaren errepikakortasuna aztertu zen, %RSDa kalkulatu. Emaitza guztiak 7.7. taulan jaso dira.

Bitarteko doitasuna lortzeko, aldiz, 12 analisiak 2 asteko epean egin ziren —6 egunetan—. Kasu guztietan laginak bi aldiz analizatu ziren eta batez bestekoak hartu ziren kontuan (7.7. Taula).

Aztertutako mailetan errepikakortasunaren %RSDa %3,2 – 8,8 tartean zegoen —maila baxuaren kasuan— eta %2,0 – 8,4 —maila altuaren kasuan—. Bitarteko doitasuna %14,2 azpitik zegoen maila baxuaren kasuan eta %13,8 azpitik, berriz, maila altuaren kasuan. Hortaz, zehaztasunaren ebaluazioari dagokionez balio onargarriak lortu ziren MEKC metodoan.

Azpiatalari amaiera emateko, MEKC metodoaren zehaztasuna ebaluatzeko 5.3.2.4. azpiatalean deskribatu den patroigehikuntza metodoa erabili zen, alegia, berreskuratze test (*recovery test*) prozedura. Horretarako, analitorik ez zuten laginetan horien kantitate ezagunak gehitu ziren eta berreskuratutako ehunekoak aztertu ziren. Lagin bakoitza bi aldiz analizatu zen eta lortutako emaitzak 7.7. taulan daude ikusgai.

Berreskuratzearen ebaluazioak ere emaitza onargarriak —kasu guztietan %90,0 – 115,0 tartean— eman zituen, hain zuzen ere, %91,4 – 114,8 tarteko berreskuratzeak lortu ziren maila baxuan egindako gehikuntzen kasuan eta %90,4 – 109,0 tartean maila altuko gehikuntzen kasuan.

Metodoaren ezaugarri analitikoekin amaitzeko kasu honetan ere aipatu behar da pikoien identifikazioa egiteko UV espektroak eta mugikortasun elektroforetikoak aztertu zirela. Horretaz gainera, beharrezkoa izan zen kasuetan patriiak gehitu ziren laginetan analitoen presentzia baieztatzeko, metodoaren espezifikotasuna bermatuz.

Metodoaren balioztapenean lortutako datu guztiek erakusten dute garatutako MEKC metodoa egokia eta eraginkorra dela UV-iragazkiak eta kontserbagarriak produktu kosmetikoetan eta etxeko beste produktuetan kuantifikatzeko. Era berean, proposatutako metodoaren ezaugarri analitikoak bibliografian deskribatutako UV-iragazkiak edo kontserbagarriak kuantifikatzeko metodoen

antzekoak ziren, bai LODei eta LOQei dagokienez (Gago-Ferrero *et al.*, 2013; Celeiro *et al.*, 2014) eta baita zehaztasunari eta doitasunari dagokionez ere (Rastogi, 2000; Liu eta Wu, 2011; Baranowska *et al.*, 2014). UV detektagailuetan oinarritutako metodoak bakarrik kontuan hartu dira LODen eta LOQen konparaketa hori egiteko, jakina, MS detektagailuak erabiltzen direnean detekzio mugak askoz ere txikiagoak baitira (Gracia-Lor *et al.*, 2012).

7.7. Taula. Metodoaren doitasunaren (%RSD) eta zehaztasunaren emaitzak.

Konposatua	Kontzentrazioa ($\mu\text{g/mL}$)	Errepikakortasuna	Bitarteko doitasuna	Berreskuratzea (%)
1 Metilisotiazolinona	4,59	6,1	5,6	105,6
	60,13	3,8	7,4	94,5
2 Klorometilisotiazolinona	4,10	3,3	4,7	91,4
	36,89	5,0	6,6	102,4
3 Metilparabenoa	4,49	6,7	5,8	100,8
	48,94	6,5	8,3	97,7
4 Etilparabenoa	4,85	7,8	13,5	93,7
	48,48	5,1	4,6	103,8
5 Azido sorbikoa	4,91	7,0	10,6	94,9
	49,06	6,0	5,6	100,4
6 Bentzisotiazolinona	8,62	6,2	5,3	97,3
	47,03	7,0	8,2	92,0
7 Butilparabenoa	6,08	3,2	5,7	107,6
	48,66	8,4	7,1	95,8
8 Azido bentzoikoa	4,46	5,6	5,0	109,8
	48,60	6,1	5,2	98,6
9 Azido salizilikoa	5,33	6,6	7,6	101,5
	49,16	3,8	6,5	93,4
10 Bentzofenona-4	3,19	7,2	5,7	107,4
	47,86	6,1	7,2	90,4
11 Propilparabenoa	6,05	3,8	3,6	102,2
	48,40	5,0	7,1	96,5
12 3-BHA	5,20	8,8	14,2	114,8
	48,00	3,0	3,2	95,3
13 2-BHA	4,17	7,9	11,5	104,6
	52,08	2,0	2,2	109,0
14 Triklosana	7,03	7,3	8,7	101,8
	46,89	3,9	6,2	105,2
15 Bentzofenona-3	6,96	4,6	9,7	107,0
	47,88	5,5	12,0	90,8
16 BHT	10,17	7,8	11,7	111,8
	61,03	5,1	13,8	101,1

7.3.2.4. Kontserbagarriak: metodoen konparaketa

Jarraian, 6. kapituluaren eta kapitulu honetan garatutako metodoen emaitzen konparaketa laburra azalduko da, izan ere, zazpi kontserbagarri bi metodo desberdinekin kuantifikatu dira, hain zuzen ere, azido sorbikoa, azido salizilikoa, azido bentzoikoa eta lau parabenoak. Kontuan izan behar da lurrin alergenoko eta kontserbagarriak aldiberean kuantifikatzeko metodoaren eta kapitulu honetan deskribatutako metodoaren arteko desberdintasunak txikiak direla, hain zuzen ere, aldatzen diren parametroak honako hauek dira:

- A metodoa: 24 mM STB, 100 mM SDS, pH = 9,0 (lurrin alergenoko eta kontserbagarriak),
- B metodoa: 18 mM STB, 60 mM SDS, pH = 9,4 (kontserbagarriak eta UV-iragazkiak).

Metanolaren kasuan, A eta B metodoen kasuan %10 MeOH (v/v) erabili zen gehigarri organiko moduan, nahiz eta azpimarragarria den B metodoaren kasuan bakarrik hartu zela kontuan optimizazio prozeduran. Gainerako baldintzak —potenzial-diferentzia, injekzioa, kapilarraren dimentsioak, tenperatura eta abar— berdinak izan ziren bi kasuetan. 7.8. Taulan 6. kapituluaren lortutako LODak jaso dira eta, konparaketa eginez gero, orokorrean desberdintasunak txikiak direla aipatu behar da, butilparabenoaren kasuan izan ezik, izan ere, 3,22 µg/mL-tik 1,93 µg/mL-ra murriztu baita.

7.8. Taula. LOD parametro analitikoaren konparaketa.

Konposatua	LOD ^a (µg/mL)	LOD ^b (µg/mL)
Metilparabenoa	2,07	1,44
Etilparabenoa	1,42	1,60
Propilparabenoa	1,55	1,99
Butilparabenoa	3,22	1,93
Azido sorbikoa	1,10	1,57
Azido bentzoikoa	1,71	1,44
Azido salizilikoa	1,17	1,73

^aLOD = (3,3×SD)/b (A metodoa)

^bLOD = (3,3×SD)/b (B metodoa)

Tarte linealaren kasuan, aldiz, kapitulu honetan deskribatzen den metodoak (B) ezaugarri hobeak ditu tarte lineal zabalagoa aztertu baitzen (7.9. Taula). Doitasunari eta zehaztasunari dagozkion ezaugarri analitikoak ez dira alderatu

kontzentrazio desberdinetan egin zirelako neurketak. Dena den, aipatzekoa da tarte linealen goi mugan dauden desberdintasunak ez direla metodoaren ondorio, baizik eta kasu bakoitzean metodoaren garapenean hartutako metodoen ondorio.

7.9. Taula. Aztertutako tarte linealen konparaketa.

Konposatua	A metodoaren tarte lineala ($\mu\text{g/mL}$)	B metodoaren tarte lineala ($\mu\text{g/mL}$)
Metilparabenoa	6,22 – 32,71	4,32 – 65,25
Etilparabenoa	4,25 – 20,90	4,79 – 64,64
Propilparabenoa	4,64 – 21,25	5,97 – 64,53
Butilparabenoa	9,65 – 32,84	5,78 – 64,88
Azido sorbikoa	3,29 – 21,26	4,71 – 65,42
Azido bentzoikoa	5,14 – 32,58	4,31 – 64,80
Azido salizilikoa	3,51 – 21,38	5,19 – 65,55

Metodoen arteko konparaketa amaitzeko, analitoen migrazio denboran ikusi diren desberdintasunak aipatuko dira. 7.10. Taulan A eta B metodoen kasuan elektroferograma optimoan lortutako migrazio denborak eta ahalmen-faktoreak jaso dira —gogoan izan ahalmen-faktorea (k') kalkulatzeko (4.27) ekuazioa erabil daitekeela—, eta baita ahalmen-faktoreak izan duen aldaketa, ehunekotan. 7.10. Taulan barne-patroia gehitu da, bi kasuetan bentzalazetona izan zelako eta EOFaren denbora ere gehitu da ahalmen-faktorea kalkulatzeko beharrezkoa delako. Gogoratu behar da, berez, ahalmen-faktorearen kalkulua MEK_{cen} (4.28) adierazpenaren bidez egin behar dela, baina, horretarako mizelen migrazio denbora ezagutu behar dela —markatzaile egoki baten bidez lor daitekeena—. Kasu honetan datu hori ezezaguna denez, (4.27) ekuazioa alternatiba egokia da, zeinetan EOFaren denbora ezagutzea nahiko den.

7.10. Taula. Migrazio denboren eta ahalmen faktoreen konparaketa.

Konposatua	A metodoa		B metodoa		Ahalmen-faktorearen aldaketa
	Migrazio denbora (min)	Ahalmen-faktorea (k')	Migrazio denbora (min)	Ahalmen-faktorea (k')	
Metilparabenoa	12,33	1,21	10,60	1,03	-%14,9
Etilparabenoa	15,73	1,82	11,09	1,13	-%37,9
Propilparabenoa	22,88	3,11	16,98	2,26	-%27,3
Butilparabenoa	33,57	5,03	13,02	1,50	-%70,2
Azido sorbikoa	13,00	1,33	11,98	1,30	-%2,3
Azido bentzoikoa	15,37	1,76	13,87	1,66	-%5,7
Azido salizilikoa	15,09	1,71	14,29	1,74	+%1,8
IS	22,57	3,05	14,90	1,86	-%39,0
EOF	5,57	-	5,21	-	-%6,5

7.10. Taulako emaitzak ebaluatzean, A metodotik B metodora aldatzean ahalmen-faktoreak txikitu egiten direla ikus daiteke, nagusiki SDS kontzentrazio aldaketarekin azal daitekeena —baina ez arrazoi horren ondorioz bakarrik, noski, pHa eta elektrolito kontzentrazioa ere aldatu delako—. EOFaren eta bentzazetona barne-patroiaren (IS) kasuetan argi ikusten da hori. Nabarmenak dira, aldiz,

- 1) azido salizilikoaren ahalmen-faktorearen gehikuntza (+%1,8) eta,
- 2) horren ondorioz gertatzen den azidoen migrazio ordenaren aldaketa. A metodoan azido salizilikoa azido bentzoikoaren aurretik iristen da detektagailura, baina, B metodoaren kasuan ordena alderantzizkoa da,
- 3) butilparabenoaren ahalmen-faktorearen murrizketa handia (-%70,2) eta,
- 4) azken horren ondorioz gertatzen den parabenoen migrazio ordenaren aldaketa: A metodoan karbono kopurua handitu ahala migrazio denbora handitzen da, baina, B metodoaren kasuan propilparabenoaren migrazio denbora butilparabenoarena baino handiagoa da.

Bereziki interesgarria da (4) puntuan azaldutakoa, izan ere literatura zientifikoan parabenoen migrazio denboraren aldaketa hori —beraz, mugikortasun elektroforetikoen aldaketa— jasota dago antzeko baldintzetan (Huang *et al.*, 2005); nahiz eta ez den ohikoena (Sirichai eta Hasajitto, 2004; He *et al.*, 2006; Dolzan *et al.*, 2013; Xue *et al.*, 2013). Dena den, bibliografia aztertuta eta ikerketa honetan eskuragarri dagoen informazio esperimentala kontuan hartuta, oraingoz, ezin da fenomeno horren azalpenik proposatu.

7.3.3. Aplikazioa

Metodoaren garapenarekin jarraituz, MEKC metodoa optimizatu eta balioztatu ondoren, zainketa pertsonalerako produktuen eta etxeko beste zenbait produkturen analisisian aplikatu zen —guztira 24 lagin—. Optimizatutako metodoan elektrolito-disoluzioak 18 mM STB, 60 mM SDS zituen eta pHa 9,4ra doituta zegoen. %10 (v/v) MeOH erabili zen gehigarri organiko moduan. Injekzioa hidrodinamikoa zen eta 45 mbar-eko presioa aplikatu zen 8 segundoz. Banaketa elektroforetikoa lortzeko 30 kV-ko potentzial-diferentzia aplikatu zen. Metodoari buruzko gainerako xehetasun guztiak 7.2.2. azpiatalean deskribatu dira.

Laginak prestatzeko 7.2.3. azpiatalean deskribatu den prozedura jarraitu zen eta, kasu honetan ere, azpimarragarria da laginak prestatzeko prozeduraren

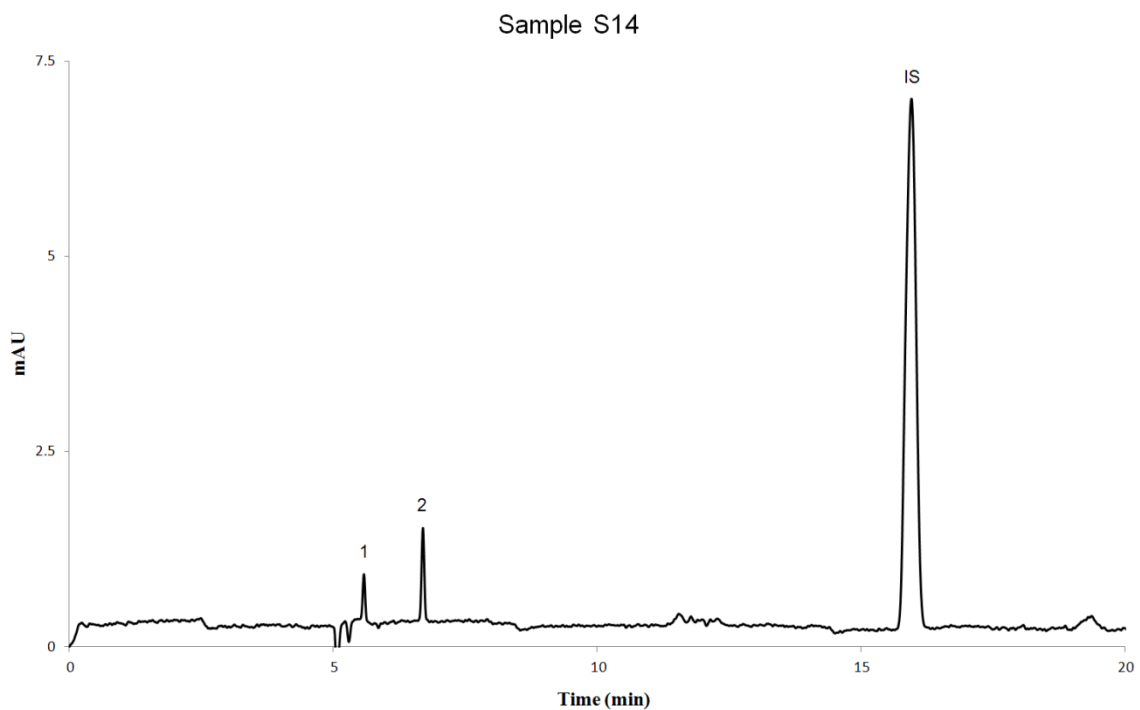
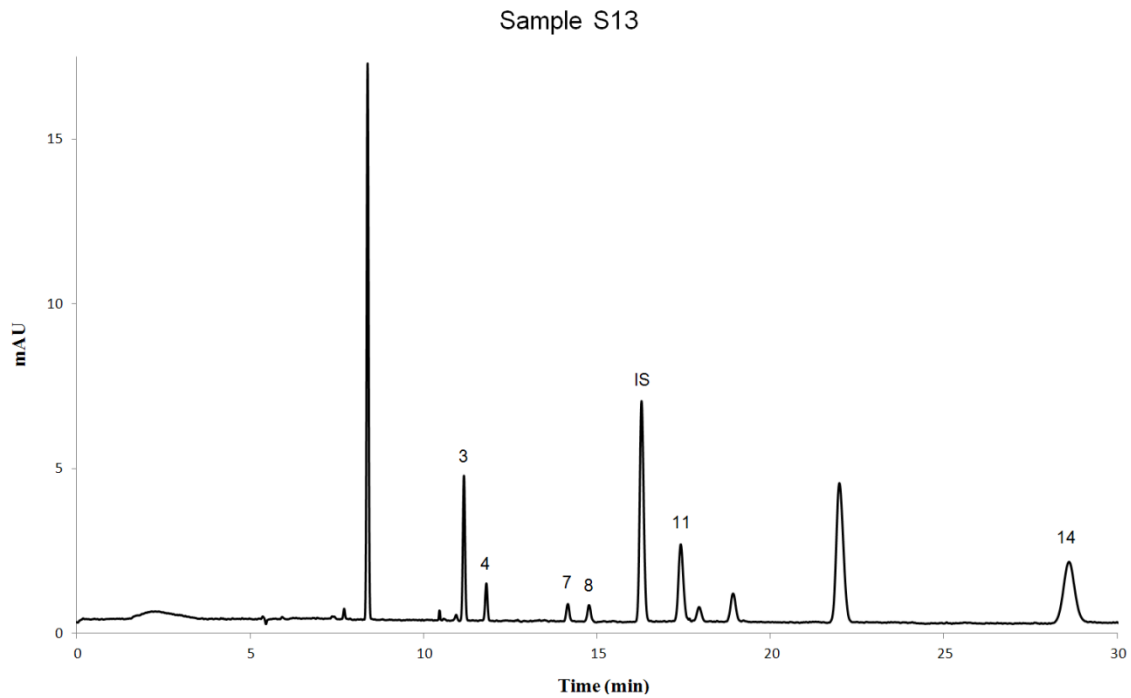
sinpletasuna: egin beharreko aurretratamendu bakarra diluzioa eta iragazpena zen. Lagin bakoitza bi aldiz analizatu zen, batez bestekoa eta desbiderapen estandarra kalkulatu ahal izateko. 16 analitoak 24 PCP eta etxerako produktuetan kuantifikatu ziren eta 7.11. taulan jaso dira emaitza guztiak. Jarraian, 7.8. Irudian laginen analisisian lortutako bi elektroferograma jaso dira; bertan 5 PASen eta 3 kontserbagarriren banaketa elektroforetikoa dago ikusgai. Ondoren, 7.9. eta 7.10. irudietan, laginen analisisian lortutako beste elektroferograma batzuk daude ikusgai.

7.11. Taula. UV-iragazkien eta kontserbagarrien kontzentrazioak laginetan. Emaitzak: batez bestekoa (mg/kg) \pm desbiderapen estandarra (%RSD).

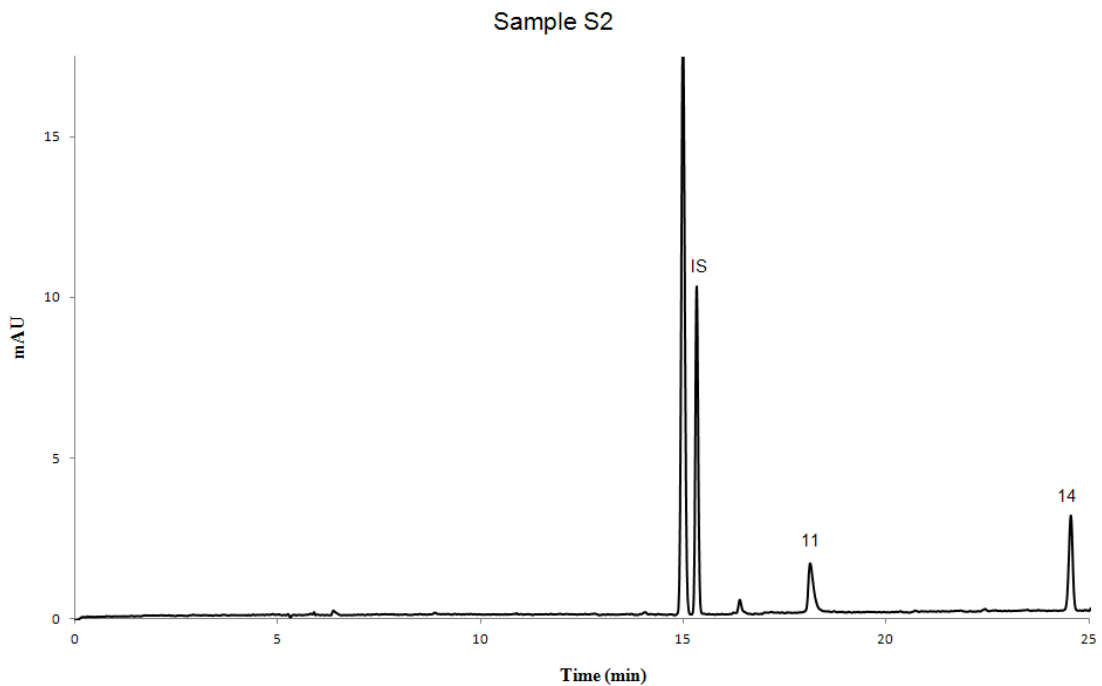
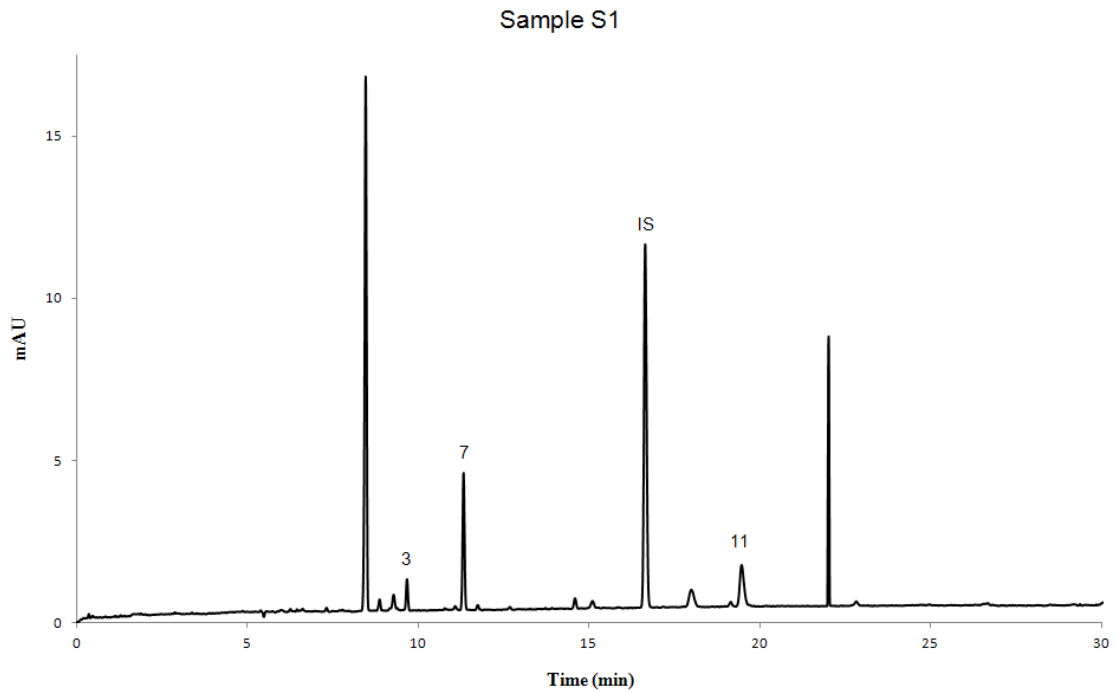
Lagina	Mota ^a	Konposatuak ^b
S1	HC	3: 183 \pm 8 (%4,5); 7: 271 \pm 9 (%3,4); 11: 640 \pm 30 (%4,6)
S2	T	11: 450 \pm 20 (%5,3); 14: 2800 \pm 100 (%4,4)
S5	So	8: 5210 \pm 40 (%0,7); 9: 2620 \pm 20 (%0,7)
S6	Sh	8: 4600 \pm 300 (%5,5); 9: 2130 \pm 20 (%1,1)
S7	SP	3: 147 \pm 3 (%5,0); 8: 150 \pm 10 (%8,8)
S8	Sh	1: 87,7 \pm 0,3 (%0,3); 8: 203 \pm 3 (%1,6)
S10	SP	3: 1520 \pm 20 (%1,4); 4: 161 \pm 6 (%3,8)
S11	NPR	3: 50 \pm 3 (%5,6); 16: 1500 \pm 30 (%2,0)
S12	Sh	8: 186 \pm 7 (%7,4)
S13	Dog Sh	3: 936 \pm 6 (%0,7); 4: 210 \pm 20 (%8,1); 7: 174 \pm 4 (%2,5); 8: 142 \pm 2 (%1,6); 11: 260 \pm 10 (%5,4); 14: 670 \pm 30 (%4,4)
S14	HP	1: 7,06 \pm 0,08 (%1,1); 2: 9,0 \pm 0,8 (%8,8)
S16	P	15: 680 \pm 60 (%9,4)
S17	P	15: 2000 \pm 200 (%9,2)
S18	P	12: 1920 \pm 30 (%1,6)
S19	HAF	8: 861,0 \pm 0,3 (%0,03)
S20	P	8: 118 \pm 9 (%7,6); 12: 2300 \pm 200 (%6,8); 13: 105 \pm 7 (%7,0)
S21	SP	10: 14000 \pm 1000 (%8,1)
S24	SP	3: 620 \pm 20 (%2,5); 4: 161 \pm 8 (%5,1); 7: 102 \pm 2 (%2,4); 11: 380 \pm 30 (%8,6)

^aLagin motak: Xanpua (Sh, *shampoo*), xaboia (So, *soap*), perfumea (P, *perfume*), eskuetarako krema (HC, *hand cream*), aire-gozagarria (HAF, *household air freshener*), hortzetako pasta (T, *toothpaste*), eguzkitarako produktua (SP, *sunscreem product*), azkazal-esmaltea kentzeko produktua (NPR, *nail polish remover*), etxerako produktua (HP, *household product*).

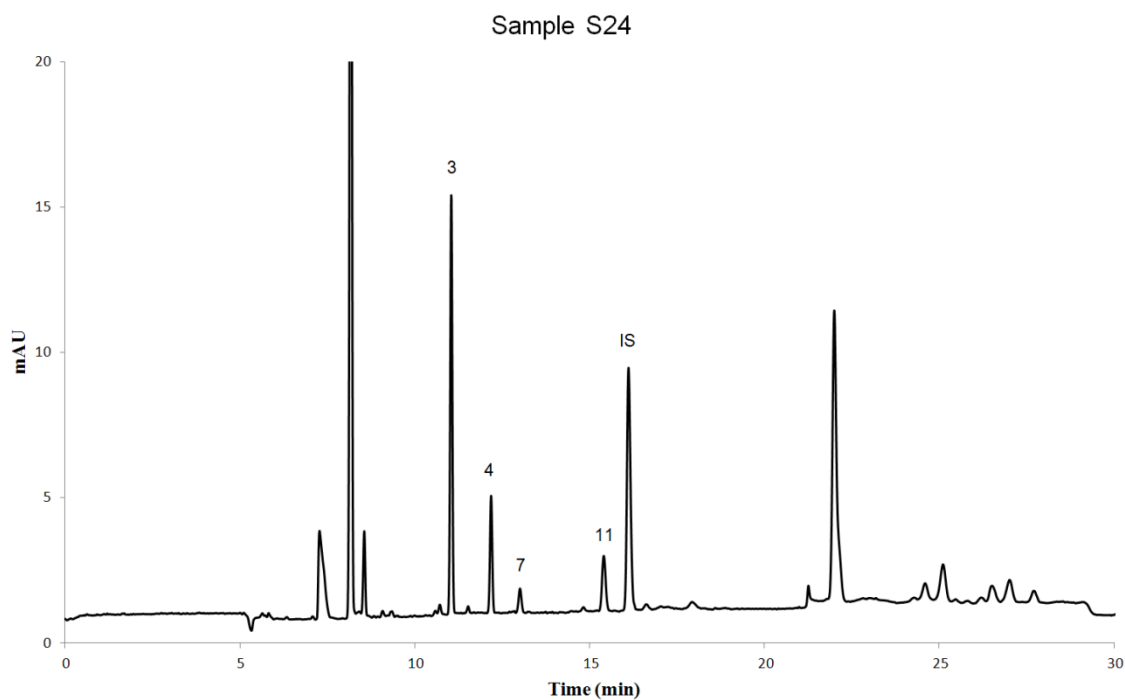
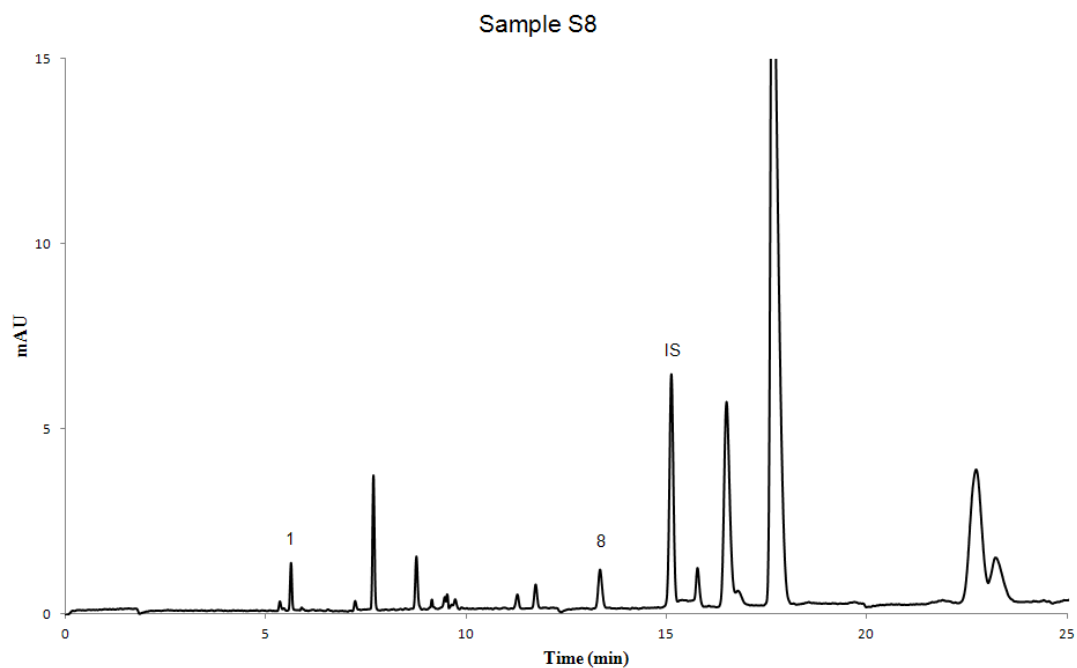
^bKonposatuak 7.6. taulan bezala zenbakituta daude.



7.8. Irudia. S13 eta S14 laginen banaketa elektroforetikoa. Baldintza esperimentalak: 7.3.3. azpiatalean definitutakoak. Seinaleen identifikazioa: 1) metilisotiazolinona, 2) klorometilisotiazolinona, 3) metilparabenoa, 4) etilparabenoa, 7) butilparabenoa, 8) azido bentoikoa, 11) propilparabenoa, 14) triklosana eta IS) barne-patroia. Detekziorako uhin-luzera 210 nm. S13 lagina txakurrentzat egindako xanpua da eta aztertutako lagin guztietatik analito kopuru handiena duena da (6).



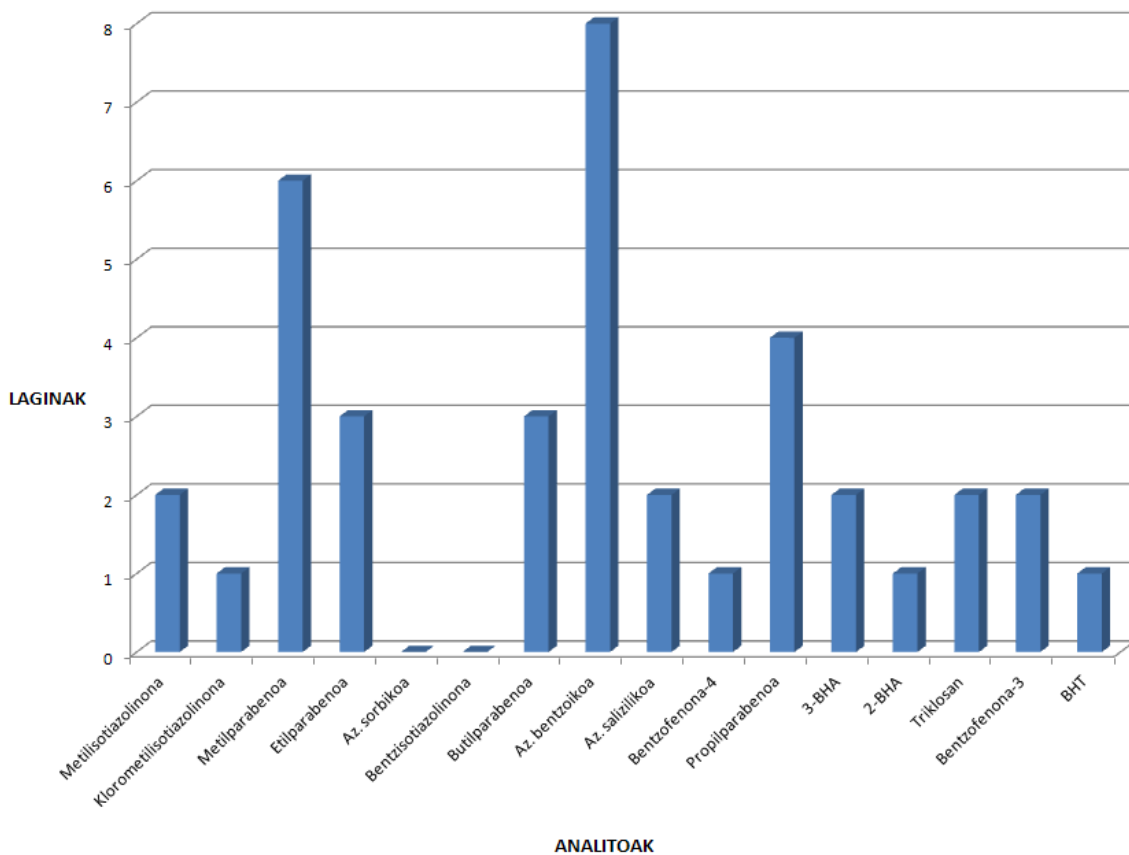
7.9. Irudia. S1 eta S2 laginen banaketa elektroforetikoa. Baldintza esperimentalak: 7.3.3. azpiatalean definitutakoak. Seinaleen identifikazioa: 3) metilparabenoa, 7) butilparabenoa, 11) propilparabenoa, 14) triklosana eta IS) barne-patroia. Detekziorako uhin-luzera 210 nm.



7.10. Irudia. S8 eta S24 laginen banaketa elektroforetikoa. Baldintza esperimentalak: 7.3.3. azpiatalean definitutakoak. Seinaleen identifikazioa: 1) metilisotiazolinona, 3) metilparabenoa, 4) etilparabenoa, 7) butilparabenoa, 8) azido bentoikoa, 11) propilparabenoa eta IS) barne-patroia. Detekziorako uhin-luzera 210 nm.

Azido bentzoikoa izan zen kontserbagarri arruntena eta 8 PCPtan aurkitu zen (%33,3). Kontserbagarri eta UV-iragazki guztiak aurkitu ziren laginetan, azido sorbikoa eta bentzisotiazolinona izan ezik, honako ehuneko hauetan: metilparabenoa (%25), propilparabenoa (%16,7), etilparabenoa (%12,5), butilparabenoa (%12,5), azido salizilikoa (%8,3) 3-BHA (%8,3), triklosana (%8,3), metilisotiazolinona (%8,3), bentzofenona-3 (%8,3), 2-BHA (%4,2), BHT (%4,2), klorometilisotiazolinona (%4,2) eta bentzofenona-4 (%4,2) (7.11. Irudia). Bestalde, laginen %75ak aztertutako analito bat zuen gutxienez, hain zuzen ere, %58,3ak analito 1 edo 2 zituen eta %16,7ak 3 edo gehiago.

Lortutako UV-iragazki eta kontserbagarri kontzentrazioak bat datoz literatura zientifikoan aurki daitezkeen beste metodoen bidez lortutako emaitzekin (Gago-Ferrero *et al.*, 2013; Alvarez-Rivera *et al.*, 2014; Celeiro *et al.*, 2014). Aztertutakoaren arabera, PCP guztiak Europako 1223/2009 araudia betetzen zuten, bai kontserbagarriek eta baita UV-iragazkiek ere.



7.11. Irudia. Analito bakoitza PCPtan zenbat aldiz aurkitu den jasotzen duen grafikoa. Ikus daitekeenez, azido bentzoikoa da ohikoena den konposatua eta azido sorbikoa eta bentzisotiazolinona ez dira detektatu.

7.4. Ondorioak

Kontserbagarriak eta UV-iragazkiak aldeberean banatzeko eta kuantifikatzeko MEKC metodo azkarra, fidagarria eta merkea garatu da. Aipagarria da kontserbagarriei dagokienez, mota desberdinetakoak aztertu direla, hain zuzen ere, kontserbagarri antimikrobiano hidrofiloak, kontserbagarri antimikrobiano hidrofoboak, kontserbagarri antioxidatzaileak eta isotiazolinonak. Bereizki aipatzekoa da isotiazolinonen kasua, izan ere, orain arte ez da deskribatu bibliografian horiek MEKC bidez kuantifikatzeko metodorik. Ikerketa honetan, isotiazolinonez gainera, beste kontserbagarriak eta UV-iragazkiak aldeberean aztertu ahal izan dira. Gainera, metodoak analito guztien banaketa aproposa lortzen du denbora-tarte laburrean (30 min) eta laginaren prestaketa ere oso sinplea da —15 minutu nahikoak dira prestaketarako—.

Deskribatutako metodoa aproposa da zainketa pertsonalerako produktuak analizatzeko eta ezaugarri analitiko onargarriak ditu metodoaren balioztapenari dagokionez, alegia, sentikortasuna, linealtasuna, LODak, LOQak, errepikakortasuna, bitarteko doitasuna eta zehaztasuna egokiak dira.

Metodoa optimizatzeko MCRF erantzun-funtzioa erabili da eta banaketa elektroforetikoak hobetzeko tresna egoki eta aproposa dela frogatu da. Era berean, MCRFak hobekuntza garrantzitsua dakar beste erantzun-funtzio batzuekin alderatzen bada, bereizmenaren eta denboraren garrantzi erlatiboa doitzeko aukera ematen duelako. Lortutako ezaugarri analitikoak UV metodologiekin lortzen direnen antzekoak dira —bereziki LODei eta LOQei dagokienez—. MEKC metodoaren sinpletasuna ere azpimarragarria da, aurretratamendurik ez baita aplikatu behar izan.

Amaitzeko, laginen analisisiak erakutsi duen moduan, MEKC teknika PCPen errutinako analisisira aplikatzeko tresna arrakastatsua dela frogatu da UV-iragazkiak eta kontserbagarriak aldeberean kuantifikatzeko. Lagin mota oso desberdinak aztertu dira —perfumeak, hortzetako pastak, xaboiak, eta abar— eta, kasu guztietan metodoa eraginkorra dela frogatu da.

7.5. Erreferentziak

Adki, V.S.; Jadhav, J.P.; Bapat, V.A.: *At the Cross Roads of Environmental Pollutants and Phytoremediation: A Promising Bio Remedial Approach*, Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 23, 125-140, 2014.

Altria, K.D.; McLean, R.: *Development and Optimisation of a Generic Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography Method to Support Analysis of a Wide Range of Pharmaceuticals and Excipients*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 18, 807-813, 1998.

Alvarez-Rivera, G.; Dagnac, T.; Lores, M.; Garcia-Jares, C.; Sanchez-Prado, L.; Lamas, J.P.; Llompart, M.: *Determination of Isothiazolinone Preservatives in Cosmetics and Household Products by Matrix Solid-Phase Dispersion Followed by High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*, Journal of Chromatography A, 1270, 41-50, 2012.

Alvarez-Rivera, G.; Vila, M.; Lores, M.; Garcia-Jares, C.; Llompart, M.: *Development of a Multi-Preservative Method Based on Solid-Phase Microextraction-Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry for Cosmetic Analysis*, Journal of Chromatography A, 1339, 13-25, 2014.

Baranowska, I.; Wojciechowska, I.; Solarz, N.; Krutysza, E.: *Determination of Preservatives in Cosmetics, Cleaning Agents and Pharmaceuticals Using Fast Liquid Chromatography*, Journal of Chromatographic Science, 52, 88-94, 2014.

Benedé, J.L.; Chisvert, A.; Salvador, A.; Sánchez-Quiles, D.; Tovar-Sánchez, A.: *Determination of UV Filters in both Soluble and Particulate Fractions of Seawaters by Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Followed by Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, Analytica Chimica Acta, 812, 50-58, 2014.

Brausch, J.M.; Rand, G.M.: *A Review of Personal Care Products in the Aquatic Environment: Environmental Concentrations and Toxicity*, 82, 1518-1532, 2011.

Cabaleiro, N.; de la Calle, I.; Bendicho, C.; Lavilla, I.: *An Overview of Sample Preparation for the Determination of Parabens in Cosmetics*, Trends in Analytical Chemistry, 57, 34-46, 2014.

Celeiro, M.; Guerra, E.; Lamas, J.P.; Lores, M.; Garcia-Jares, C.; Llompart, M.: *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, 1-14, 2014.

Cheng, Y.-C.; Wang, C.-C.; Chen, Y.-L.; Wu, S.-M.: *Large Volume Sample Stacking with EOF and Sweeping in CE for Determination of Common Preservatives in Cosmetic Products by Chemometric Experimental Design*, Electrophoresis, 33, 1443-1448, 2012.

Chisvert, A.; Salvador, A.: *UV Filters in Sunscreens and Other Cosmetics. Regulatory Aspects and Analytical Methods*. In Salvador, A.; Chisvert, A.: *Analysis of Cosmetic Products*, Elsevier, The Netherlands, 2007, 83-120.

Chisvert, A.; Tarazona, I.; Salvador, A.: *A Reliable and Environmentally-Friendly Liquid-Chromatographic Method for Multi-Class Determination of Fat-Soluble UV Filters in Cosmetic Products*, Analytica Chimica Acta, 790, 61-67, 2013.

Deng, Z.; Han, L.; Zhang, J.; Wu, Y.: *Analysis of Benzophenones in Environmental Water Samples after Topical Skin Application Using Dispersive Liquid-Liquid Microextraction and Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography*, Analytical Methods, 3, 2848-2853, 2011.

Dolzan, M.D.; Spudeit, D.A.; Azevedo, M.S.; Costa, A.C.O.; Leal de Oliveira, M.A.; Micke, G.A.: *A Fast Method for Simultaneous Analysis of Methyl, Ethyl, Propyl and Butylparaben in Cosmetics and Pharmaceutical Formulations Using Capillary Zone Electrophoresis with UV Detection*, Analytical Methods, 5, 6023-6029, 2013.

EURACHEM: *EURACHEM Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods*, EURACHEM Working Group, LGC, 1998.

European Parliament; European Council: *Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on Cosmetic Products (recast)*, Official Journal of the European Union, L342, 59-209, 2009.

Gago-Ferrero, P.; Mastroianni, N.; Díaz-Cruz, M.S.; Barceló, D.: *Fully Automated Determination of Nine Ultraviolet Filters and Transformation Products in Natural Waters and Wastewaters by On-Line Solid Phase Extraction-Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*, Journal of Chromatography A, 1294, 106-166, 2013.

Gao, W.; Legido-Quigley, C.: *Fast and Sensitive High Performance Liquid Chromatography Analysis of Cosmetic Creams for Hydroquinone, Phenol and Six Preservatives*, Journal of Chromatography A, 1218, 4307-4311, 2011.

Gao, L.; Yuan, T.; Zhou, C.; Cheng, P.; Bai, Q.; Ao, J.; Wang, W.; Zhang, H.: *Effects of Four Commonly Used UV Filters on the Growth, Cell Viability and Oxidative Stress Responses of the Tetrahymena thermophila*, Chemosphere, 93, 2507-2513, 2013.

Gracia-Lor, E.; Martínez, M.; Sancho, J.V.; Peñuela, G.; Hernández, F.: *Multi-Class Determination of Personal Care Products and Pharmaceuticals in Environmental and Wastewater Samples by Ultra-High Performance Liquid-Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*, Talanta, 99, 1011-1023, 2012.

Hanrahan, G.; Montes, R.; Gomez, F.A.: *Chemometric Experimental Design Based Optimization Techniques in Capillary Electrophoresis: A Critical Review of Modern Applications*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 390, 169-179, 2008.

He, S.; Zhao, Y.; Zhu, Z.; Liu, H.; Li, M.; Shao, Y.; Zhuang, Q.: *Comparative Study for the Analysis of Parabens by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography with and without Large-Volume Sample Stacking Technique*, Talanta, 69, 166-171, 2006.

Huang, H.-Y.; Chuang, C.-L.; Chiu, C.-W.; Yeh, J.-M.: *Application of Microemulsion Electrokinetic Chromatography for the Detection of Preservatives in Foods*, Food Chemistry, 89, 315-322, 2005.

Jeong, S.-H.; Kim, B.-Y.; Kang, H.-G.; Ku, H.-O.; Cho, J.-H.: *Effects of Butylated Hydroxyanisole on the Development and Functions of Reproductive System in Rats*, Toxicology, 208, 49-62, 2005.

Kerdivel, G.; Le Guevel, R.; Habauzit, D.; Brion, F.; Ait-Aissa, S.; Pakdel, F.: *Estrogenic Potency of Benzophenone UV Filters in Breast Cancer Cells: Proliferative and Transcriptional Activity Substantiated by Docking Analysis*, PLoS One, 8, e60567, 2013.

Konieczka, P.; Namieśnik, J.: *Quality Assurance and Quality Control in the Analytical Chemical Laboratory, A Practical Approach*, CRC Press, Boca Raton, 2009.

Lanigan, R.S.; Yamarik, T.A.: *Final Report on the Safety Assessment of BHT(1)*, International Journal of Toxicology, 21, 19-94, 2002.

Liao, C.; Kannan, K.: *Widespread Occurrence of Benzophenone-Type UV Light Filters in Personal Care Products from China and the United States: An Assessment of Human Exposure*, Environmental Science & Technology, 48, 4103-4109, 2014.

Liu, T.; Wu, D.: *Simultaneous Determination of Some Ultraviolet-Absorbing Chemicals in Sunscreen Cosmetics Using a High-Performance Liquid Chromatography Method*, International Journal of Cosmetic Science, 33, 408-415, 2011.

Lopez-Gazpio, J.; Garcia-Arrona, R.; Millán, E.: *Application of Response Function Methodology for the Simultaneous Determination of Potential Fragrance Allergens and Preservatives in Personal Care Products Using Micellar Electrokinetic Chromatography*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 406, 819-829, 2014.

Lopez-Gazpio, J.; Garcia-Arrona, R.; Ostra, M.; Millán, E.: *Optimization and Validation of a Nonaqueous Micellar Electrokinetic Chromatography Method for Determination of Polycyclic Musks in Perfumes*, Journal of Separation Science, 35, 1344-1350, 2012.

Palmer, C.P.: *Method Development for Micellar Electrokinetic Chromatography*, Chromatographia, 57(S), S333-S337, 2003.

Pedrouzo, M.; Borrull, F.; Marcé, R.M.; Pocurull, E.: *Analytical Methods for Personal-Care Products in Environmental Waters*, Trends in Analytical Chemistry, 30, 749-760, 2011.

Prakash, B.; Singh, P.; Yadav, S.; Singh, S.C.; Dubey, N.K.: *Safety Profile Assessment and Efficacy of Chemically Characterized Cinnamomum glaucescens Essential Oil Against Storage Fungi, Insect, Aflatoxin Secretion and as Antioxidant*, Food and Chemical Toxicology, 53, 160-167, 2013.

Rakic, T.; Stojanovic, B.J.; Jovanovic, M.; Malenovic, A.; Ivanovic, D.; Medenica, M.: *Evaluation of Seven Chromatographic Response Functions on Simulated and Experimentally Obtained Chromatograms in Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography System*, Analytical Letters, 46, 1198-1212, 2013.

Rastogi, S.C.: *Analytical Control of Preservative Labelling on Skin Creams*, Contact Dermatitis, 43, 339-343, 2000.

Scientific Committee on Consumer Products (SCCP): *Opinion on Benzophenone-3*, SCCP/1201/08, 2008.

Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS): *Opinion on the Mixture of 5-Chloro-2-methylisothiazolin-3(2H)-one and 2-Methylisothiazolin-3(2H)-one*, SCCS/1238/09, 2009.

Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS): *Opinion on Benzisothiazolinone*, SCCS/1482/12, 2012.

Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS): *Opinion on 2-Methylisothiazolinone (P94), Submission II (Sensitisation Only)*, SCCS/1521/13, 2013.

Sirichai, S.; Hasajitto, C.: *Separation of Preservatives in Cosmetic Products by Micellar Electrokinetic Chromatography*, Analytical Sciences, 20, 1741-1744, 2004.

Xue, Y.; Chen, N.; Luo, C.; Wang, X.; Sun, C.: *Simultaneous Determination of Seven Preservatives in Cosmetics by Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Coupled with High Performance Capillary Electrophoresis*, Analytical Methods, 5, 2391-2397, 2013.

7.6. Submitted paper: Simultaneous determination of multiclass preservatives and benzophenone-type UV-filters in consumer products by micellar electrokinetic chromatography

Simultaneous determination of multiclass preservatives and benzophenone-type UV-filters in consumer products by micellar electrokinetic chromatography.

Josu Lopez-Gazpio, Rosa Garcia-Arrona, Esmeralda Millán*

Department of Applied Chemistry, Faculty of Chemistry, University of the Basque Country (UPV/EHU), Donostia-San Sebastián 20018, Spain.

Keywords: Preservatives, UV-filters, Response function, Personal care products, MEKC-DAD

Abstract:

In this work a micellar electrokinetic chromatography method for the separation and quantification of 14 preservatives and 2 benzophenone-type UV-filters in household, cosmetic and personal care products was developed. The selected priority compounds are widely used as ingredients in many personal care products, and are included in the European Regulation concerning cosmetic products. The electrophoretic separation parameters were optimized by means of a modified chromatographic response function in combination with an experimental design, namely a central composite design. After optimization of experimental conditions, the background electrolyte selected for the separation of the targets consisted of 60 mM sodium dodecyl sulphate, 18 mM sodium tetraborate, pH 9.4 and 10% (v/v) methanol. The MEKC method was checked in terms of linearity, limits of detection and quantification, repeatability, intermediate precision and accuracy, providing appropriate values (i.e. $R^2 \geq 0.992$, repeatability RSD values below 9% and accuracy 90–115%). The validated method applicability was assessed by successfully quantifying preservatives and UV-filters in commercial consumer products.

* Corresponding author: Dr. Esmeralda Millán, Department of Applied Chemistry, Faculty of Chemistry, University of the Basque Country (UPV/EHU), Apdo. 1072, 20080 Donostia-San Sebastián, Spain.

E-mail address: esmeralda.millan@ehu.es

Fax number: 34 943015270

**ONDORIO
OROKORRAK**

ONDORIO OROKORRAK

Hasieran finkatutako helburuen arabera, hauek dira lan honen ondorioak:

1) Zainketa pertsonalerako produktuetan **kosmetikoen osagaiak banatzeko eta kuantifikatzeko kromatografia elektroinetiko mizelarrean oinarritutako metodologia analitikoak** garatu eta balidatu dira. Zehazki:

- 5. Kapitulan, parfumeetan **musketa poliziklikoak (PCM) determinatzeko metodoa** definitu da, kromatografia elektroinetiko mizelar ez-akuosoan (NAMEKC) oinarritzen dena. Metodologia berri hori kromatografia elektroinetiko mizelarraren (MEKC) muga nagusienetako gainditzeko baliagarria da, alegia, ur-disolbagarritasun eskasa duten konposatuak banatzeko ezintasuna. Hortaz, **kromatografia elektroinetiko mizelarraren aplikagarritasuna zabaldu** ahal izan da, ingurune ez-akuosoan konposatu hidrofoboak determinatzeko teknika alternatiboak garatu baitira.

- 6. Kapitulan, **lurrin alergenoko (PAS) eta kontserbagarri antimikrobiano hidrofilo eta hidrofoboak aldiberean determinatzeko** MEKC teknikan oinarritutako metodoa deskribatu da. Metodo hori hobekuntza garrantzitsua da laginen tratamenduaren erraztasunari dagokionez eta, hortaz, zainketa pertsonalerako eta etxeko beste produktuen errutinako analisisian erabiltzeko aproposa da.

- 7. Kapitulan, MEKC teknikan oinarritutako metodoa zabaldu da, **kontserbagarri antimikrobiano hidrofiloak, kontserbagarri antimikrobiano hidrofiloak, antioxidatzaileak, isotiazolinonak eta bentzofenonaren deribatuak diren ultramore-iragazkiak aldiberean determinatu ahal izateko**. Kosmetikoen aipatutako osagaiak aldiberean determinatzeko lehen metodoa izateaz gainera, isotiazolinonak kuantifikatzeko baliagarria den MEKC teknikan oinarritzen den lehen metodoa da. Aurrez deskribatu direnen kasuan bezala, metodoa erraza eta sinplea da laginen tratamenduari dagokionez eta etxeko zein zainketa pertsonalerako produktu desberdinetan aplika daiteke.

2) **Diseinu esperimentalak eta erantzun-gainazalen metodologia aplikatu** dira ikertutako sistemetan eragina duten aldagai adierazgarriak determinatzeko eta baldintza analitiko hoberenak aurkitzeko. **Erabilitako diseinu esperimentalak Box-Behnken diseinua (BBD) eta diseinu konposatu zentrala (CCD)** izan dira. Era berean, MEKC sistemetan eragin garrantzitsuena

duzen aldagaien efektua aztertu da, alegia, elektrolito eta surfaktante mizelar kontzentrazioa, gehigarri bezala erabilitako disolbatzaile organikoaren kontzentrazioa, banaketa disoluzioaren pHa eta aplikatutako potentzial-diferentzia. Bestalde, analisi aldagaien itza ezinbestekoa izan da kasu bakoitzean aipatutako faktoreen baldintza optimoak ezartzeko. Gainera, eredu matematiko horiei esker aztertu ez diren baldintza esperimentalen lortuko liratekeen erantzunak aurrean ahal izan dira eta, ondorioz, aldagaiak banan-banan aztertzen dituzten alternatibekin alderatuta, denbora eta kostua murriztu dira.

3) **Erantzun-funtzio kromatografiko aldatua (MCRF) proposatu eta deskribatu da**, diseinu esperimentalarekin batera metodo elektroforetikoak optimizatzeko tresna erraz eta eraginkorra dena. Funtzio hori erabilgarritasun handikoa da analito asko dituzten metodologia analitikoak optimizatzerakoan, izan ere bereizmen maximoak denbora minimoan lortu nahi izaten dira. Hiru metodoekin lortutako optimizazioen **emaitzek funtzioaren aplikagarritasun potentziala baieztatzen dute** MEKC metodoak optimizatzeko.

4) **Garatutako metodoen ezaugarri analitikoaren ebaluazioa ona izan da**, eta horretarako zenbait ezaugarri aztertu dira baldintza optimoetan: kalibraketa zuzenak, zehaztasuna, doitasuna, detekzio eta kuantifikazio mugak. Prest jarritako hiru metodoek detekzio ultramorean oinarritzen diren gainerako metodoen antzeko ezaugarri analitikoak dituzte.

5) Garatutako eta optimizatutako metodologiak erabiliz **etxeko eta zainketa pertsonalerako produktu desberdinetan kosmetikoen osagai hautatuak analizatu dira**, era horretan metodoa matrize desberdinetan aplika daitekeela egiaztatuz. Gainera, aztertutako produktu kosmetikoen kasuan, Europar Batasunaren 1223/2009 araudia betetzen dutela baieztatu da.

6) Amaitzeko, lan honen helburu osagarria ere bete da, hain zuzen ere, **elektromigrazio-tekniken esparruan euskarazko terminologia garatu da**, orain arte oso urria zena. Azterketa bibliografikoaren eta terminologikoaren emaitzak monografia batean argitaratu dira (Elektroforesi Kapilarraren Oinarriak); Euskara Errektoreordetzaren euskarazko ikasmaterialgintza sustatzeko deialdian laguntza jaso duena eta Euskara Zerbitzuaren hizkuntza-zuzenketaren aldeko txostena duena. Gainera, proiektuaren jarraipena den materiala (Elektroforesi Kapilarraren Aplikazioak) ikasmaterialgintza sustatzeko 2014ko deialdian onartua izan da eta, egun, idazketa bide onetik doa.

CONCLUSIONES GENERALES

En base a los objetivos establecidos inicialmente, las conclusiones del presente trabajo son las siguientes:

1) Se han desarrollado y validado **metodologías analíticas para la separación y cuantificación de ingredientes de cosmética** en productos para el cuidado personal por cromatografía electrocinética micelar. En concreto:

- En el capítulo 5 se detalla el método basado en cromatografía electrocinética micelar no acuosa (NAMEKC) para la **determinación de almizcles policíclicos (PCMs)** en perfumes. Esta metodología novedosa supera el impedimento habitual de la cromatografía electrocinética micelar (MEKC) en medio acuoso, incapaz de separar compuestos insolubles en agua. Con ello se ha **ampliado la aplicabilidad de la cromatografía electrocinética micelar desarrollando técnicas alternativas en medio no acuoso para la determinación de compuestos hidrófobos.**

- En el capítulo 6 se describe el método basado en MEKC para la **determinación simultánea de fragancias alérgicas (PAS) y conservantes antimicrobianos hidrófilos e hidrófobos.** Este método supone una mejora importante en cuanto a sencillez en la preparación de muestras, lo que hace que sea idóneo para el análisis rutinario de productos para el cuidado personal y otros productos del hogar.

- En el capítulo 7 se amplía el método basado en MEKC comprendiendo la **determinación simultánea de conservantes antimicrobianos hidrófilos, conservantes antimicrobianos hidrófobos, antioxidantes, isotiazolinonas y filtros ultravioleta derivados de la benzofenona.** Además de ser el primer método basado en MEKC para la determinación simultánea de los ingredientes de cosmética mencionados, también es el primer método basado en MEKC para la cuantificación de isotiazolinonas. Al igual que los anteriormente descritos, el método es sencillo y simple en lo que a preparación de muestra se refiere, y aplicable a distintos tipos de cosméticos y productos del hogar.

2) **Se ha aplicado el diseño experimental y la metodología de superficies de respuesta** para determinar las variables significativas que afectan a los sistemas objeto de estudio y para encontrar las mejores condiciones analíticas experimentales. Los diseños experimentales utilizados han sido el **diseño Box-Behnken (BBD)** y el **diseño central compuesto (CCD)**. También se ha estudiado el efecto de las variables más importantes que afectan a los sistemas

MEKC, es decir, concentración del electrolito y del surfactante micelar, concentración del disolvente orgánico utilizado como aditivo, pH de la disolución de separación y voltaje aplicado. El estudio multivariable de dichos factores ha sido esencial a la hora de establecer las condiciones óptimas en cada caso. Además, los modelos matemáticos han permitido hacer predicciones de respuestas en condiciones experimentales no realizadas, lográndose una reducción en coste y tiempo frente a la alternativa de considerar las variables una a una.

3) **Se ha propuesto y descrito una función de respuesta cromatográfica modificada (MCRF)** que, junto con el diseño experimental, ha servido como instrumento sencillo y eficaz para optimizar métodos electroforéticos. Esta función es de gran utilidad a la hora de optimizar metodologías analíticas con un elevado número de analitos en los que se busca la máxima resolución en el menor tiempo posible. Los resultados obtenidos en los tres métodos optimizados confirman su **aplicabilidad potencial en la optimización de métodos MEKC**.

4) **Las características analíticas de los métodos desarrollados han sido evaluadas de forma satisfactoria**, llevando a cabo los correspondientes estudios de las rectas de calibrado, precisión, exactitud, límites de detección y cuantificación, en las condiciones óptimas. Los métodos puestos a punto presentan características analíticas comparables a las obtenidas con otras metodologías basadas en la detección ultravioleta.

5) Se han utilizado las metodologías desarrolladas y optimizadas para **analizar los ingredientes seleccionados de cosmética en distintos tipos de productos comerciales para el cuidado personal y del hogar** para demostrar la aplicabilidad de las mismas en diferentes matrices. También se ha confirmado que los productos cosméticos con ingredientes regulados por la Unión Europea en el Reglamento 1223/2009 cumplen con la legislación.

6) Finalmente, el objetivo complementario derivado de este trabajo, es decir, **el desarrollo de nueva terminología en euskara en el campo de las técnicas de electromigración**, que hasta ahora resultaba ser deficitaria o inexistente, también se ha completado de forma satisfactoria. Los resultados del estudio bibliográfico y terminológico **han dado lugar a la publicación de una monografía (Elektroforesi Kapilarraren Oinarriak)** subvencionada en convocatoria competitiva del Vicerrectorado de Euskara para la promoción de la producción de material docente y el texto cuenta con el informe favorable del Servicio de Euskara. Además, el proyecto de la segunda parte de dicho material (Elektroforesi Kapilarraren Aplikazioak) ha sido aceptado en la convocatoria de 2014 y su redacción está en desarrollo.

Argitalpenak / Publicaciones

Memoria honetan deskribatutako lanak honako argitalpen eta komunikazio hauek ahalbidetu ditu: / El trabajo descrito en la presente memoria ha dado lugar a las siguientes publicaciones y comunicaciones:

Artikuluak / Artículos

“Optimization and validation of a nonaqueous micellar electrokinetic chromatography method for determination of polycyclic musks in perfumes”

Journal of Separation Science, 2012, 35(10-11), 1344-1350.

“Usaimena, zentzumen ahaztu hori”

Ekaia, Euskal Herriko Unibertsitateko Zientzi eta Teknologi Aldizkaria, 2013, 26, 31-45

“Application of response function methodology for the simultaneous determination of potential fragrance allergens and preservatives in personal care products using micellar electrokinetic chromatography”

Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2014, 406(3), 819-829.

“Simultaneous determination of multiclass preservatives and benzophenone-type UV-filters in consumer products by micellar electrokinetic chromatography”

(Bidalitako artikulua / Artículo enviado)

Liburuak / Libros

“Elektroforesi Kapilarraren Oinarriak” (ISBN: 978-84-9860-895-3)

EHUko Argitalpen Zerbitzua, Leioa, 2013.

“Elektroforesi Kapilarraren Aplikazioak”

(Euskara Errektoreordetzaren euskarazko ikasmaterialgintza sustatzeko 2014ko deialdian onartutako proiektua / Proyecto aceptado en la convocatoria de 2014 del Vicerrectorado de Euskara para la promoción de la producción de material docente en euskara).

Komunikazioak / Comunicaciones

“Determinación de Fragancias Potencialmente Alérgicas y Conservantes Representativos en Productos para el Cuidado Personal mediante Cromatografía Electrocinética Micelar y DAD”

XVIII Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica (SEQA), Úbeda, 2013.