

KUUEDES KOMISSIION DIREKTIIVI 95/32/EY,

annettu 7 päivänä heinäkuuta 1995,

kosmeettisten valmisteiden koostumuksen tarkistamisessa tarvittavista
analyysimenetelmistä

(ETA:n kannalta merkityksellinen teksti)

EUROOPAN YHTEISÖJEN KOMISSIO, joka

ottaa huomioon Euroopan yhteisön perustamissopimuksen,

ottaa huomioon kosmeettisia valmisteita koskevan jäsenvaltioiden lainsäädännön lähentämisestä 27 päivänä heinäkuuta 1976 annetun neuvoston direktiivin 76/768/ETY⁽¹⁾, sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna komission direktiivillä 94/32/EY⁽²⁾, ja erityisesti sen 8 artiklan 1 kohdan,

sekä katsoo, että

direktiivissä 76/768/ETY säädetään kosmeettisten valmisteiden virallisesta testaamisesta sen varmistamiseksi, että kosmeettisten valmisteiden koostumusta koskevilla yhteisön säännöksissä vahvistetut edellytykset täyttyvät,

kaikki tarvittavat analyysimenetelmät olisi vahvistettava mahdollisimman pian; tietyt menetelmiä on jo vahvistettu komission direktiivillä 80/1335/ETY⁽³⁾, sellaisena kuin se on muutettuna direktiivillä 87/143/ETY⁽⁴⁾, komission direktiivillä 82/434/ETY⁽⁵⁾, sellaisena kuin se on muutettuna direktiivillä 90/207/ETY⁽⁶⁾, sekä komission direktiivillä 83/514/ETY⁽⁷⁾, komission direktiivillä 85/490/ETY⁽⁸⁾ ja komission direktiivillä 93/73/ETY⁽⁹⁾,

kosmeettisten valmisteiden sisältämän bentsoehapon, 4-hydroksibentsoehapon, sorbiinihapon, salisyylihapon ja propionihapon tunnistus ja määrittäminen sekä kosmeettisten valmisteiden sisältämän hydrokinonin, hydrokinonin monometyylieetterin, hydrokinonin monoetyylieetterin ja hydrokinonin monobentsyylieetterin tunnistus ja määrittäminen muodostavat kuudennen vaiheen, ja

tässä direktiivissä säädetyt toimenpiteet ovat direktiivin 76/768/ETY mukauttamista tekniikan kehitykseen käsittelevän komitean lausunnon mukaiset,

ON ANTANUT TÄMÄN DIREKTIIVIN:

1 artikla

Jäsenvaltioiden on toteutettava tarvittavat toimenpiteet sen varmistamiseksi, että kosmeettisten valmisteiden virallisen testaamisen aikana

— bentsoehapon, 4-hydroksibentsoehapon, sorbiinihapon, salisyylihapon ja propionihapon tunnistus ja määrittäminen,

— hydrokinonin, hydrokinonin monometyylieetterin, hydrokinonin monoetyylieetterin ja hydrokinonin monobentsyylieetterin tunnistus ja määrittäminen

suoritetaan liitteessä esitettyjen menetelmien mukaisesti.

2 artikla

1. Jäsenvaltioiden on saatettava tämän direktiivin noudattamisen edellyttämät lait, asetukset ja hallinnolliset määräykset voimaan viimeistään 30 päivänä syyskuuta 1996. Niiden on ilmoitettava tästä komissiolle viipymättä.

Näissä jäsenvaltioiden antamissa säädöksissä on viitattava tähän direktiiviin tai niitä virallisesti julkaistaessa niihin on liitettävä viittaus tähän direktiiviin. Jäsenvaltioiden on säädettävä siitä, miten viittaukset tehdään.

2. Jäsenvaltioiden on toimitettava tässä direktiivissä tarkoitetuista kysymyksistä antamansa kansalliset säännökset komissiolle.

3 artikla

Tämä direktiivi tulee voimaan kahdentenakymmenentenä päivänä sen jälkeen, kun se on julkaistu *Euroopan yhteisöjen virallisessa lehdessä*.

4 artikla

Tämä direktiivi on osoitettu kaikille jäsenvaltioille.

Tehty Brysselissä 7 päivänä heinäkuuta 1995.

Komission puolesta

Emma BONINO

Komission jäsen

⁽¹⁾ EYVL N:o L 262, 27.9.1976, s. 169⁽²⁾ EYVL N:o L 181, 15.7.1994, s. 31⁽³⁾ EYVL N:o L 383, 31.12.1980, s. 27⁽⁴⁾ EYVL N:o L 57, 27.2.1987, s. 56⁽⁵⁾ EYVL N:o L 185, 30.6.1982, s. 1⁽⁶⁾ EYVL N:o L 108, 28.4.1990, s. 92⁽⁷⁾ EYVL N:o L 291, 24.10.1983, s. 9⁽⁸⁾ EYVL N:o L 295, 7.11.1985, s. 30⁽⁹⁾ EYVL N:o L 231, 14.9.1993, s. 34

LIITE

I BENTSOEHAPON, 4-HYDROKSIBENTSOEHAPON, SORBIINIHAPON, SALISYYLIHAPON JA PROPIONIHAPON TOTEAMINEN JA MÄÄRITYS KOSMEETTISISTA TUOTTEISTA**1. Laajuus ja soveltamisala**

Tämä menetelmä soveltuu bentsoehapon, 4-hydroksibentsoehapon, sorbiinihapon, salisyylihapon ja propionihapon toteamiseen ja määrittämiseen kosmeettisista tuotteista. Näiden säilöntäaineiden toteaminen, propionihapon määrittäminen sekä 4-hydroksibentsoehapon, salisyylihapon, sorbiinihapon ja bentsoehapon määrittäminen kuvataan erillisissä menettelyissä.

2. Määritelmä

Tällä menetelmällä määritetyt bentsoehapon, 4-hydroksibentsoehapon, salisyylihapon, sorbiinihapon ja propionihapon määrät ilmaistaan vapaiden happojen massaprosentteina.

A. TOTEAMINEN**1. Periaate**

Säilöntäaineiden happo/emäsuuton jälkeen uute määritetään ohutkerroskromatografialla (TLC) käyttäen levyllä tapahtuvaa johdannaisten muodostamista. Toteaminen vahvistetaan tulosten mukaan HPLC-kromatografialla tai, kun on kyse propionihaposta, kaasukromatografialla.

2. Reagenssit**2.1 Yleistä**

Kaikkien reagenssien tulee olla analyysilaatua. Käytettävän veden tulee olla tislattua tai puhtauteltaan vähintään sitä vastaavaa vettä.

2.2 Asetoni**2.3 Dietyylieetteri****2.4 Asetonitriili****2.5 Toluene****2.6 n-Heksaani****2.7 Parafiiniöljy****2.8 Vetykloridihappo, 4 M****2.9 Kaliumhydroksidin vesiliuos, 4 M****2.10 Kalsiumkloridi, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$** **2.11 Litiumkarbonaatti, Li_2CO_3** **2.12 2-Bromo-2'-asetonaftoni****2.13 4-Hydroksibentsoehappo****2.14 Salisyylihappo****2.15 Bentsoehappo****2.16 Sorbiinihappo****2.17 Propionihappo**

- 2.18 Vertailuliukokset:
Valmistetaan kunkin säilöntäaineen (2.13—2.17) 0,1-prosenttinen (m/V) dietyylieetteriliuos (100 mg/100 ml).
- 2.19 Johdannaisen muodostusreagenssi:
2-Bromo-2'-asetonaftonin (2.12) 0,5-prosenttinen (m/V) liuos asetonitrilissä (2.4) (50 mg/10 ml). Tämä liuos on valmistettava viikoittain ja säilytettävä jääkaapissa.
- 2.20 Katalyyttiliuos:
Litiumkarbonaatin (2.11) 0,3-prosenttinen (m/V) vesiliuos (300 mg/100 ml). Tämä liuos on valmistettava juuri ennen käyttöä.
- 2.21 Kehiteliuotin:
Tolueenin (2.5) ja asetonin (2.2) seos 20:0,5 (V/V).
- 2.22 Parafiiniöljyn (2.7) ja n-heksaanin (2.6) seos 1:2 (V/V).

3. Laitteisto

Tavanomainen laboratoriovälineistö.

- 3.1 Vesihaude, jossa voidaan pitää yllä 60 °C:n lämpötilaa
- 3.2 Kehityssäiliö
- 3.3 Ultraviolettilähde, 254 nm ja 366 nm.
- 3.4 Ohutkerroslevyjä, Kieselgel 60, ilman fluoresenssi-indikaattoria, 20 × 20 cm, kerrospaksuus 0,25 mm, väkevöitymisalueen koko 2,5 × 20 cm. (Merck 11845 tai vastaava)
- 3.5 Mikroruisku, 10 µl
- 3.6 Mikroruisku, 25 µl
- 3.7 Uuni, jossa voidaan pitää yllä lämpötiloja 105 °C:een asti.
- 3.8 Lasisia 50 ml:n koeputkia, joissa on kierrekorkki
- 3.9 Suodatinpaperia, halkaisija 90 mm, Schleicher & Schull, Weissband No 5892 tai vastaava
- 3.10 Yleiskäyttöistä pH-indikaattoripaperia, pH 1—11
- 3.11 Lasisia 5 ml:n näyteampulleja
- 3.12 Pyöröhaihdutin (Rotavapor tai vastaava)
- 3.13 Lämpölevy

4. Menettely

4.1 Näytteen valmistelu

Punnitaan noin 1 gramma näytettä kierrekorkilla varustettuun 50 ml:n lasikoeputkeen (3.8). Lisätään 4 tippaa 4 M:n vetykloridihappoa (2.8) ja 40 ml asetonin (2.2). Jos tuote on voimakkaasti emäksinen (esimerkiksi saippua), on syytä lisätä 20 tippaa 4 M:n vetykloridihappoa (2.8). Tarkistetaan yleisindikaattoripaperilla (3.10), että pH on noin 2. Putki suljetaan ja sitä ravistetaan voimakkaasti minuutin ajan.

Tarvittaessa voidaan tehostaa säilöntäaineiden uuttumista asetonifaasiin lämmittämällä seos varovasti noin 60 °C:n lämpötilaan, jotta rasvafaasi sulaa.

Liuos jäädytetään huoneenlämpötilaan ja suodatetaan suodatinpaperin (3.9) läpi erlenmeyerpulloon.

Siirretään 20 ml suodosta 200 ml:n erlenmeyerpulloon, lisätään 20 ml vettä ja sekoitetaan. Seoksen pH säädetään noin 10:een lisäämällä 4 M:n kaliumhydroksidiliuosta (2.9); pH mitataan indikaattoripaperilla (3.10).

Lisätään 1 g kalsiumkloridia (2.10) ja ravistetaan voimakkaasti. Suodatetaan suodatinpaperin (3.9) läpi 250 ml:n erotussuppiloon, jossa on 75 ml dietyylieetteriä (2.3), ja ravistetaan voimakkaasti minuutin ajan. Annetaan seoksen asettua kerroksiksi ja lasketaan vesikerros 250 ml:n erlenmeyerpulloon. Eetterikerros heitetään pois. Vesiliuoksen pH säädetään 4 M:n natriumkloridihapolla (2.8) noin 2:een käyttäen apuna indikaattoripaperia (3.10). Lisätään 10 ml dietyylieetteriä (2.3), suljetaan pullo tulpalla ja ravistetaan voimakkaasti minuutin ajan. Kerrosten annetaan erottua ja eetterikerros siirretään pyöröhaihduttimeen (3.12). Vesikerros heitetään pois.

Eetterikerros haihdutetaan lähes kuivaksi ja jäännös liuotetaan uudelleen 1 ml:aan dietyylieetteriä (2.3). Liuos siirretään näytepulliin (3.11).

4.2 Ohutkerroskromatografia

Kutakin kromatografisesti määritettävää vertailuainetta ja näytettä kohden pannaan noin 3 μ l:n täplät litiumkarbonaattiliuosta (2.20) tasaisin välein ruiskulla (3.5) TLC-levyn (3.4) väkevytymisalueen alkuväliä; levy kuivataan kylmässä ilmavirrassa.

TLC-levy siirretään 40 °C:n lämpöiselle lämpölevylle (3.13), jotta täplät pysyisivät mahdollisimman pieninä. Mikroruiskulla (3.5) pannaan 10 μ l:n täplä kutakin vertailuliuosta (2.18) ja näyteliuosta (4.1) levyn aloitusväliä tasaisesti niihin kohtiin, joihin aiemmin pantiin litiumkarbonaattitäplät.

Lopuksi lisätään 15 μ l johdannaisen muodostusreagenssia (2.19) (2-bromo-2'-asetonaftoniliuos) täsmälleen kuhunkin täplään, johon on aiemmin pantu vertailu- tai näyteliuosta ja litiumkarbonaattiliuosta.

TLC-levyä kuumennetaan uunissa (3.7) 80 °C:n lämpötilassa 45 minuutin ajan.

Kun levy on jäähtynyt, se kehitetään säiliössä (3.2), joka on saanut tasapainottua 15 minuutin ajan (ilman suodatinpaperivuorausta), käyttäen kehiteliuotinta 2.21 (tolueeni/asetoni), kunnes liuotinrintama on edennyt 15 cm (tämä voi kestää n. 80 minuuttia).

Levy kuivataan kylmässä ilmavirrassa ja muodostuneet täplät tutkitaan ultraviolettivalossa (3.3). Heikkojen täplien fluoresenssia voidaan vahvistaa kastamalla TLC-levy parafiiniöljyn n-heksaani-liuokseen (2.22).

5. Toteaminen

Lasketaan kunkin täplän R_f-arvo.

Verrataan näytteen ja vertailuliuosten tuottamia R_f-arvoja ja täplien ulkonäköä ultraviolettivalossa.

Päätellään alustavasti, mitä säilöntäaineita näytteessä on. Tehdään B jaksossa esitetty HPLC-määritys tai, jos on todettu propionihappoa, C jaksossa esitetty kaasukromatografinen määritys. Verrataan saatuja retentioaikoja vertailuliuksilla saatuihin retentioaikoihin.

Yhdistetään TLC-määrityksen ja HPLC- tai kaasukromatografisen määrityksen tulokset; lopullinen arvio säilöntäaineiden esiintymisestä annetaan yhdistettyjen tulosten perusteella.

B. BENTSOEHAPON, 4-HYDROKSIBENTSOEHAPON, SORBIINIHAPON JA SALISYYLIHAPON MÄÄRITYS

1. Periaate

Happamaksi tekemisen jälkeen näyte uutetaan etanolin ja veden seoksella. Suodattamisen jälkeen säilöntäaineet määritetään suurtehonestekromatografialla (HPLC).

2. Reagenssit

2.1 Kaikkien reagenssien tulee olla analyysilaita ja tarvittaessa HPLC-määritykseen soveltuvia. Käytettävän veden tulee olla tislattua tai puhtaudeltaan vähintään sitä vastaavaa vettä.

2.2 Absoluuttinen etanoli

2.3 4-Hydroksibentsoehappo

- 2.4 Salisyylihappo
- 2.5 Bentsoehappo
- 2.6 Sorbiinihappo
- 2.7 Natriumasetaatti ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)
- 2.8 Etikkahappo, $d^{20/4} = 1,05$ g/ml
- 2.9 Asetonitriili
- 2.10 Rikkihappo, 2 M
- 2.11 Kaliumhydroksidin vesiliuos, 0,2 M
- 2.12 2-Metoksibentsoehappo
- 2.13 Etanolin ja veden seos:
Sekoitetaan 9 tilavuusosaa etanolia (2.2) ja 1 tilavuusosa vettä (2.1).
- 2.14 Sisäinen standardiliuos:
Valmistetaan liuos, jossa on noin 1 gramma 2-metoksibentsoehappoa (2.12) 500 ml:ssa etanolin ja veden seosta (2.13).
- 2.15 HPLC:n liikkuva faasi
- 2.15.1 Asetaattipuskuri: lisätään 1 litraan vettä 6,35 g natriumasetaattia (2.7) ja 20,0 ml etikkahappoa (2.8) ja sekoitetaan.
- 2.15.2 Valmistetaan liikkuva faasi sekoittamalla 9 tilavuusosaa asetaattipuskuria (2.15.1) ja 1 tilavuusosa asetonitriiliä (2.9).
- 2.16 Säilöntäaineiden varastoliuos:
Punnitaan tarkasti noin 0,05 g 4-hydroksibentsoehappoa (2.3), 0,2 g salisyylihappoa (2.4), 0,2 g bentsoehappoa (2.5) ja 0,05 g sorbiinihappoa (2.6) 50 ml:n mittapulloon, joka täytetään mittatilavuuteen etanolin ja veden seoksella (2.13). Liuosta säilytetään jääkaapissa. Liuos säilyy noin viikon.
- 2.17 Standardisäilöntäaineliuokset
Siirretään 8,00, 4,00, 2,00, 1,00 ja 0,50 ml 2.16 kohdassa mainittua varastoliuosta viiteen 20 ml:n mittapulloon. Kuhunkin pulloon lisätään 10,00 ml sisäistä standardiliuosta (2.14) ja 0,5 ml 2 M:n rikkihappoa (2.10). Täytetään mittatilavuuteen etanolin ja veden seoksella (2.13). Nämä liuokset on valmistettava juuri ennen käyttöä.
3. Laitteisto
- Tavanomainen laboratoriovälineistö, jota ei eritellä tarkemmin, sekä lisäksi seuraavat:
- 3.1 Vesihaude, jonka lämpötilaksi on asetettu 60 °C.
- 3.2 Suurtehonestekromatografi (HPLC), jonka ultraviolettidetektorissa on säädettävä aallonpituus ja jossa on 10 µl:n injektiosilmukka.
- 3.3 Määrityskolonni:
Ruostumattomasta teräksestä tehty kromatografiakolonni, jonka pituus on 12,5—25 cm, sisähalkaisija 4,6 mm ja joka on täytetty Nucleosil 5C18:lla tai vastaavalla täyteellä.
- 3.4 Suodatinpaperi, halkaisija 90 mm, Schleicher and Schull, Weissband No. 5892 tai vastaava.
- 3.5 Lasisia 50 ml:n koeputkia, joissa on kierrekorkki.

3.6 Lasisia 5 ml:n näyteampulleja.

3.7 Karborundumkiehumakiviä, koko 2—4 mm, tai vastaavia.

4. Menettely

4.1 Näytteen valmistus

4.1.1 Näytteen valmistus ilman sisäisen standardin lisäystä

Punnitaan 1 g näytettä kierrekorkilla varustettuun lasiseen 50 ml:n koeputkeen (3.5).

Pipetoidaan 1,00 ml M:n rikkihappoa (2.10) ja 40,0 ml etanolin ja veden seosta (2.13) putkeen. Lisätään noin 1 g kiehumakiviä (3.7), suljetaan putki ja ravistetaan voimakkaasti vähintään minuutin ajan, kunnes syntyy homogeeninen suspensio. Säilöntäaineiden uuttumista etanolifaasiin voidaan tehostaa asettamalla koeputki 60 °C:n lämpöiseen vesihauteeseen (3.1) täsmälleen viideksi minuutiksi.

Putki jäädytetään välittömästi kylmässä juoksevassa vedessä ja uutetta pidetään tunnin ajan 5 °C:n lämpötilassa.

Uute suodatetaan suodatinpaperin (3.4) läpi. Siirretään noin 2 ml uutetta näyteampulliin (3.6). Uute säilytetään 5 °C:n lämpötilassa ja HPLC-määritys tehdään 24 tunnin kuluessa valmistuksesta.

4.1.2 Näytteen valmistus, kun lisätään sisäistä standardia

Punnitaan kolmen desimaalin tarkkuudella $1 \pm 0,1$ g (a grammaa) näytettä kierrekorkilla varustettuun lasiseen 50 ml:n koeputkeen (3.5). Lisätään pipetillä 1,00 ml 2 M:n rikkihappoa (2.10) ja 30,0 ml etanolin ja veden seosta (2.13). Lisätään noin 1 g kiehumakiviä (3.7) ja 10,00 ml sisäistä standardiliuosta (2.14). Putki suljetaan ja sitä ravistetaan voimakkaasti vähintään minuutin ajan, kunnes syntyy homogeeninen suspensio. Säilöntäaineiden uuttumista etanolifaasiin voidaan tehostaa asettamalla koeputki 60 °C:n lämpöiseen vesihauteeseen (3.1) täsmälleen viideksi minuutiksi.

Putki jäädytetään välittömästi kylmässä juoksevassa vedessä ja uutetta pidetään tunnin ajan 5 °C:n lämpötilassa.

Uute suodatetaan suodatinpaperin (3.4) läpi. Siirretään noin 2 ml suodosta näyteampulliin (3.6). Suodos säilytetään 5 °C:n lämpötilassa ja HPLC-määritys tehdään 24 tunnin kuluessa valmistuksesta.

4.2 Suurtehonestekromatografia (HPLC)

Liikkuva faasi: asetonitrili/asetaattipuskuri (2.15). Kolonnin läpi kulkevan liikkuvan faasin virtausnopeudeksi asetetaan $2,0 \text{ ml/min} \pm 0,5 \text{ ml/min}$. Detektorin aallonpituudeksi asetetaan 240 nm.

4.2.1 Kalibrointi

Injektoidaan 10 μl :n annos kutakin standardisäilöntäaineliuosta (2.17) nestekromatografiin (3.2). Jokaisesta liuksesta määritetään tutkittavien säilöntäaineiden huippujen korkeuden suhde kromatogrammeista saatavan sisäisen standardin huipun korkeuteen. Kutakin säilöntäainetta varten piirretään kuvaaja, joka esittää huipun korkeussuhteen kunkin standardiliuoksen väkevyyden funktiona.

Varmistetaan, että kalibroinnissa käytettävillä vakioliuoksilla saavutetaan lineaarinen vaste.

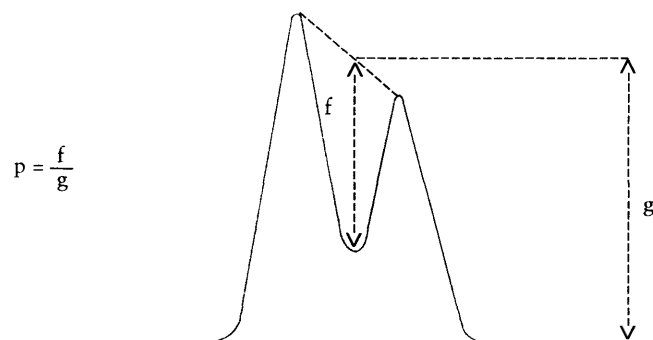
4.2.2 Määritys

Injektoidaan 10 μl näyteuutetta (4.1.1) nestekromatografiin (3.2) ja tulostetaan kromatogrammi. Injektoidaan 10 μl standardisäilöntäaineliuosta (2.17) ja tulostetaan kromatogrammi. Verrataan saatuja kromatogrammeja. Jos näyteuutteesta (4.1.1) saadussa kromatogrammissa ei näy olevan huippua, jolla olisi suunnilleen sama retentioaika kuin 2-metoksibentsoehapolla (suositeltu sisäinen standardi), injektoidaan nestekromatografiin 10 μl näyteuutetta, johon on lisätty sisäistä standardia, (4.1.2) ja tulostetaan kromatogrammi.

Jos näyteuutteen (4.1.1) kromatogrammissa havaitaan häiriöhuippu, jonka retentioaika on sama kuin 2-metoksibentsoehapon, on syytä valita jokin muu sopiva sisäinen standardi. (Jos kromatogrammistä puuttuu jokin tutkittavista säilöntäaineista, tätä voidaan käyttää sisäisenä standardina.)

Varmistetaan, täyttävätkö standardiliuoksella ja näyteliuoksella saadut kromatogrammit seuraavat vaatimukset:

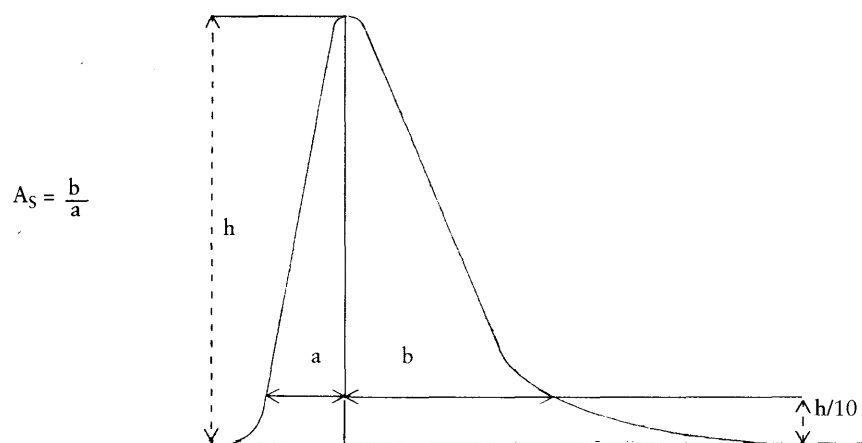
— huonon erottuvan huippuparin huippujen erottuvuuden tulee olla vähintään 0,90 (huippujen erottuvuuden määritelmä on kuvassa 1).



Kuva 1: huippujen erottuvuus

Jos vaadittua erottuvuutta ei saavuteta, on joko käytettävä tehokkaampaa kolonnia tai on muutettava liikkuvan faasin koostumusta, kunnes vaatimus täyttyy.

- Kaikkien huippujen epäsymmetrisyyskerroimen A_s tulee olla 0,9—1,5. (Epäsymmetrisyyskerroimen määritelmä on kuvassa 2.) Kun kromatogrammi tulostetaan epäsymmetrisyyskerroimen määrittämistä varten, on suotavaa käyttää paperin nopeutta, joka on vähintään 2 cm/min.



Kuva 2: huipun epäsymmetrisyyskerroin

- perusviivan tulee olla vakaa.

5. Laskelmat

Happamien säilöntäaineiden pitoisuudet näyteliuoksessa lasketaan käyttämällä tutkittavien säilöntäaineiden huippujen korkeuden suhdetta 2-metoksibentsoehapon (sisäinen standardi) huipun korkeuteen sekä kalibrointikuvaajaa. Bentsoehapon, 4-hydroksibentsoehapon, sorbiinihapon ja salisyylihapon pitoisuudet massaprosentteina (x_i) lasketaan seuraavan kaavan avulla:

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

jossa:

b = kalibrointikuvaajasta saatu säilöntäaineen pitoisuus ($\mu\text{g/ml}$) näyteuutteesta (4.1.2)

a = näyteannoksen (4.1.2) massa (g)

6. Toistettavuus⁽¹⁾

Kun 4-hydroksibentsoehapon pitoisuus on 0,40 %, samasta näytteestä tehdyn kahden rinnakkaismäärityksen tulosten eron ei pitäisi olla suurempi kuin 0,035 %.

Kun bentsoehapon pitoisuus on 0,50 %, samasta näytteestä tehdyn kahden rinnakkaismäärityksen tulosten eron ei pitäisi olla suurempi kuin 0,050 %.

Kun salisyylihapon pitoisuus on 0,50 %, samasta näytteestä tehdyn kahden rinnakkaismäärityksen tulosten eron ei pitäisi olla suurempi kuin 0,045 %.

Kun sorbiinihapon pitoisuus on 0,60 %, samasta näytteestä tehdyn kahden rinnakkaismäärityksen tulosten eron ei pitäisi olla suurempi kuin 0,035 %.

7. Huomautukset

7.1 Esitetylle menetelmälle tehtyt kestävyystestit osoittavat, että näytteeseen happojen uuttamiseksi lisättävän rikkihapon määrä on kriittinen, ja käsiteltävän näytteen määrää koskevia rajoja on syytä noudattaa.

7.2 Haluttaessa voidaan käyttää sopivaa suojakolonnia.

C. PROPIONIHAPON MÄÄRITYS**1. Laajuus ja soveltamisala**

Tämä menetelmä soveltuu propionihapon määritykseen kosmeettisista tuotteista, kun sen pitoisuus on enintään 2 % (m/m).

2. Määritelmä

Tällä menetelmällä mitattu propionihapon pitoisuus ilmaistaan massaprosentteina (% m/m) tuotteen massasta.

3. Periaate

Tuotteesta uutettu propionihappo määritetään kaasukromatografian avulla käyttäen 2-metyyli-propionihappoa sisäisenä standardina.

4. Reagenssit

Kaikkien reagenssien tulee olla analyysilaatua; käytettävän veden on oltava tislattua tai laadultaan vastaavaa vettä.

4.1 Etanoli 96 % (V/V)

4.2 Propionihappo

4.3 2-Metyylipropionihappo

4.4 Ortofosforihappo, 10 % (m/V)

4.5 Propionihappoliuos.

Punnitaan tarkasti noin 1,00 g (p grammaa) propionihappoa 50 ml:n mittapulloon, joka täytetään mittatilavuuteen etanolilla (4.1).

4.6 Sisäinen standardiliuos.

Punnitaan tarkasti noin 1,00 g (e grammaa) 2-metyylipropionihappoa 50 ml:n mittapulloon, joka täytetään mittatilavuuteen etanolilla (4.1).

⁽¹⁾ ISO 5725

5. Laitteisto

- 5.1 Tavanomainen laboratoriovälineistö sekä lisäksi:
- 5.2 Kaasukromatografi, jossa on liekki-ionisaatiodektori
- 5.3 Lasinen koeputki (20 × 150 mm), jossa on kierrekorkki
- 5.4 Vesihaude, jonka lämpötila on 60 °C
- 5.5 Lasinen 10 ml:n ruisku, jossa on suodatinkalvo (huokoskoko: 0,45 µm)

6. Menettely

6.1 Näytteen valmistus

6.1.1 Näytteen valmistus ilman sisäistä standardia

Lasiseen koeputkeen (5.3) punnitaan noin 1 g näytettä. Lisätään 0,5 ml fosforihappoa (4.4) ja 9,5 ml etanolia (4.1).

Suljetaan putki ja ravistetaan sitä voimakkaasti. Tarvittaessa putki pannaan 60 °C:n lämpöiseen vesihauteeseen (5.4) viideksi minuutiksi, jotta rasvafaasi liukenee täydellisesti. Jäähdytetään nopeasti juoksevassa vedessä. Osa liuosta suodatetaan kalvosuodattimen (5.5) läpi. Kromatografinen määrittäminen on tehtävä suodoksesta saman päivän kuluessa.

6.1.2 Näytteen valmistus, kun lisätään sisäistä standardia

Lasiseen koeputkeen (5.3) punnitaan kolmen desimaalin tarkkuudella 1 g ± 0,1 g (a grammaa) näytettä. Lisätään 0,5 ml fosforihappoa (4.4), 0,50 ml sisäistä standardiliuosta (4.6) ja 9 ml etanolia (4.1).

Suljetaan putki ja ravistetaan sitä voimakkaasti. Tarvittaessa putki pannaan 60 °C:n lämpöiseen vesihauteeseen (5.4) viideksi minuutiksi, jotta rasvafaasi liukenee täydellisesti. Jäähdytetään nopeasti juoksevassa vedessä. Osa liuosta suodatetaan kalvosuodattimen (5.5) läpi. Kromatografinen määrittäminen on tehtävä suodoksesta saman päivän kuluessa.

6.2 Kaasukromatografiaolosuhteet

Suosittelavat olosuhteet ovat seuraavat:

Kolonne

Laji	ruostumaton teräs
Pituus	2 m
Halkaisija	1/8"
Täyte	10 % SP TM 1000 (tai vastaava) + 1 % H ₃ PO ₄ Chromosorb WAW:ssä (100—120 mesh)

Lämpötila

Injektori	200 °C
Kolonne	120 °C
Detektori	200 °C
Kantajakaasu	typpi
Virtausnopeus	25 ml/min

6.3 Kromatografia

6.3.1 Kalibrointi

Siirretään pipetillä 0,25, 0,50, 1,00, 2,00 ja 4,00 ml propionihappoliuosta (4.5) viiteen 20 ml:n mittapulloon. Siirretään kuhunkin mittapulloon pipetillä 1,00 ml sisäistä standardiliuosta (4.6); pullot täytetään mittatilavuuteen etanolilla (4.1) ja sekoitetaan. Näin valmistetut liuokset sisältävät sisäisenä standardina e mg/ml (so. 1 mg/ml, jos e = 1,000) 2-metyylipropionihappoa ja p/4, p/2, p, 2p ja 4p mg/ml (so. 0,25, 0,50, 1,00, 2,00 ja 4,00 mg/ml, jos p = 1,000) propionihappoa.

Injektoidaan 1 µl kutakin näistä liuoksista ja piirretään niitä vastaava kalibrointikuvaaja siten, että x-akselin arvot ilmaisevat propionihapon ja 2-metyylipropionihapon massojen suhteen ja y-akselin arvot ilmaisevat vastaavien huippujen pinta-alojen suhteen.

Kutakin liuosta injektoidaan kolme kertaa, ja niistä lasketaan huippujen pinta-alasuhteen keskiarvo.

6.3.2 Määrittäminen

Injektoidaan 1 µl näytestuodosta (6.1.1). Verrataan kromatogrammia standardiliuoksen (6.3.1) kromatogrammiin. Jos huipun retentioaika on suunnilleen sama kuin 2-metyylipropionihapolla, on käytettävä jotakin muuta sisäistä standardia. Jos päällekkäisyyksiä ei esiinny, ruiskutetaan 1 µl näytestuodosta (6.1.2) ja mitataan propionihapon huipun ja sisäisen standardin huipun pinta-alat.

Kutakin liuosta injektoidaan kolme kertaa, ja niistä lasketaan huippujen pinta-alasuhteen keskiarvo.

7. Laskelmat

7.1 Määritetään 6.3.1 kohdassa saadusta kalibroitikuvaajasta 6.3.2 kohdassa laskettua huippujen pinta-alasuhdetta vastaava massasuhte (K).

7.2 Näin saadusta massasuhteesta lasketaan näytteen propionihappopitoisuus (X) massaprosentteina seuraavan kaavan avulla:

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

jossa K = suhde, joka saatiin 7.1 kohdassa

e = 4.6 kohdassa punnitun sisäisen standardin massa grammoina

a = 6.1.2 kohdassa punnitun näytteen massa grammoina

Tulokset pyöristetään yhteen desimaaliin.

8. Toistettavuus⁽¹⁾

Kun propionihapon pitoisuus on 2 % (m/m), samasta näytteestä tehdyn kahden rinnakkaismäärittäksen tulosten eron ei pitäisi olla suurempi kuin 0,12 %.

II. HYDROKINONIN, HYDROKINONIN MONOMETYLLIEETTERIN, HYDROKINONIN MONOETYLLIEETTERIN JA HYDROKINONIN MONOBENTSYLLIEETTERIN TOTEAMINEN JA MÄÄRITYS KOSMEETTISISTA TUOTTEISTA

A. TOTEAMINEN

1. Laajuus ja soveltamisala

Tässä menetelmässä kuvataan hydrokinonin, hydrokinonin monometyylieetterin, hydrokinonin monoetyylieetterin ja hydrokinonin monobentsyylieetterin (monobentsonin) toteaminen ja määrittäminen ihon vaalentamiseen tarkoitetuista kosmeettisista tuotteista

2. Periaate

Hydrokinoni ja sen eetterit todetaan ohutkerroskromatografialla (TLC).

3. Reagenssit

Kaikkien reagenssien tulee olla analyysilaatua.

⁽¹⁾ ISO 5725

- 3.1 Etanoli, 96 % (V/V)
- 3.2 Kloroformi
- 3.3 Dietyylieetteri
- 3.4 Kehiteliuotin:
kloroformi/dietyylieetteri, 66:33 (V/V)
- 3.5 Ammoniakki, 25 % (m/m) ($d_4^{20} = 0,91$ g/ml)
- 3.6 Askorbiinihappo
- 3.7 Hydrokinoni
- 3.8 Hydrokinonin monometyylieetteri
- 3.9 Hydrokinonin monoetyylieetteri
- 3.10 Hydrokinonin monobentsyylieetteri (monobentsoni)
- 3.11 Vertailuliukset
- Seuraavat vertailuliukset on valmistettava juuri ennen käyttöä, ja ne säilyvät yhden päivän.
- 3.11.1 Punnitaan 0,05 g hydrokinonia (3.7) asteikolla varustettuun 10 ml:n koeputkeen. Lisätään 0,250 g askorbiinihappoa (3.6) ja 5 ml etanolia (3.1). Lisätään ammoniakkia (3.5), kunnes pH on 10; lisätään etanolia (3.1), kunnes tilavuus on 10 ml.
- 3.11.2 Punnitaan 0,05 g hydrokinonin monometyylieetteriä (3.8) asteikolla varustettuun 10 ml:n koeputkeen. Lisätään 0,250 g askorbiinihappoa (3.6) ja 5 ml etanolia (3.1). Lisätään ammoniakkia (3.5), kunnes pH on 10; lisätään etanolia (3.1), kunnes tilavuus on 10 ml.
- 3.11.3 Punnitaan 0,05 g hydrokinonin monoetyylieetteriä (3.9) asteikolla varustettuun 10 ml:n koeputkeen. Lisätään 0,250 g askorbiinihappoa (3.6) ja 5 ml etanolia (3.1). Lisätään ammoniakkia (3.5), kunnes pH on 10; lisätään etanolia (3.1), kunnes tilavuus on 10 ml.
- 3.11.4 Punnitaan 0,05 g hydrokinonin monobentsyylieetteriä (3.10) asteikolla varustettuun 10 ml:n koeputkeen. Lisätään 0,250 g askorbiinihappoa (3.6) ja 5 ml etanolia (3.1). Lisätään ammoniakkia (3.5), kunnes pH on 10; lisätään etanolia (3.1), kunnes tilavuus on 10 ml.
- 3.12 Hopeanitraatti
- 3.13 12-Molybdofosforihappo
- 3.14 Kaliumferrisyaniidiheksahydraatti
- 3.15 Ferrikloridi, heksahydraatti
- 3.16 Sumutereagenssit
- 3.16.1 Lisätään hopeanitraatin (3.12) 5-prosenttiseen (m/V) vesiliuokseen ammoniakkia (3.5), kunnes muodostuva sakka liukenee.
- Varoitus: liuos muuttuu seisottuaan herkästi räjähtäväksi, joten se on heitettävä pois käytön jälkeen.
- 3.16.2 12-molybdofosforihapon (3.13) 10-prosenttinen (m/V) etanoliliuos (3.1).

- 3.16.3 Valmistetaan kaliumferrisyänidin (3.14) 1-prosenttinen (m/V) vesiliuos ja ferrikloridin (3.15) 2-prosenttinen vesiliuos. Sekoitetaan yhtä suuri määrä kumpaakin liuosta juuri ennen käyttöä.

4. Laitteisto

Tavanomainen laboratoriovälineistö ja seuraavat:

- 4.1 Tavanomainen TLC-laitteisto.
- 4.2 Käyttövalmiita TLC-levyjä: silikageeli GHR/UV₂₅₄; 20 cm × 20 cm (Machery, Nagel tai vastaava) kerrospaksuus 0,25 mm
- 4.3 Ultraäänihaude.
- 4.4 Sentrifugi.
- 4.5 Ultraviolettilamppu, 254 nm.

5. Menettely

5.1 Näytteen valmistus

Punnitaan 3,0 g näytettä asteikolla varustettuun 10 ml:n koeputkeen. Lisätään 0,250 g askorbiinihappoa (3.6) ja 5 ml etanolia (3.1). Säädetään liuoksen pH 10:een käyttämällä ammoniakkia (3.5). Lisätään etanolia, kunnes tilavuus on 10 ml. Suljetaan koeputki tulpalla ja homogenoidaan ultraäänihauhteessa 10 minuutin ajan. Suodatetaan suodatinpaperin läpi tai sentrifugoidaan nopeudella 3 000 kierrosta/min.

5.2 TLC

- 5.2.1 Kyllästetään kromatografiasäiliö kehiteliuottimella (3.4).
- 5.2.2 Pannaan levyille 2 µl vertailuliukuksia (3.11) ja 2 µl näyteliuosta (5.1). Kehitetään pimeässä huoneenlämpötilan vallitessa, kunnes liuotin on edennyt 15 cm lähtötasosta.
- 5.2.3 Poistetaan levy ja annetaan sen kuivua huoneenlämpötilassa.
- 5.3 Tunnistaminen
- 5.3.1 Levyä tarkastellaan ultraviolettivalossa, jonka aallonpituus on 254 nm, ja merkitään täplien paikat.
- 5.3.2 Levy sumutetaan:
- hopeanitraattireagenssilla (3.16.1);
 - tai: 12-molybdofosforihapporeagenssilla (3.16.2); kuumennetaan n. 120 °C:n lämpötilaan;
 - tai: kaliumferrisyänidiliuksella ja ferrikloridiliuksella (3.16.3).

6. Toteaminen

Lasketaan kunkin täplän R_f-arvo.

Verrataan näyteliuoksen täpliä vertailuliuoksen täpliin seuraavien ominaisuuksien osalta: täplien R_f-arvot, täplien väri ultraviolettivalossa ja täplien väri sen jälkeen, kun ne on tehty näkyviksi sumutereagenssilla.

Suoritetaan seuraavassa B jaksossa esitetty HPLC-määritys ja verrataan näytteiden huippujen retentioaikoja vertailuliuosten huippujen retentioaikoihin. TLC- ja HPLC-määritysten tulokset yhdistetään hydrokinonin ja/tai sen eetterien toteamiseksi.

7. Huomautuksia

Edellä esitetyissä olosuhteissa saatiin seuraavat R_f-arvot:

hydrokinoni	0,32
hydrokinonin monometyylieetteri	0,53
hydrokinonin monoetyylieetteri	0,55
hydrokinonin monobentsyylieetteri	0,58

B. MÄÄRITYS

1. Laajuus ja soveltamisala

Tässä menetelmässä vahvistetaan menettely hydrokinonin, hydrokinonin monometyylieetterin, hydrokinonin monoetyylieetterin ja hydrokinonin monobentsyylieetterin määrittämiseksi ihon vaalentamiseen tarkoitetuista kosmetisista tuotteista.

2. Periaate

Näyte uutetaan veden ja metanolin seoksella lämmittämällä varovasti niin, että kaikki rasva-aines sulaa. Määritys tehdään tästä liuoksesta käänteisfaasinestekromatografialla käyttäen ultraviolettisäilyä.

3. Reagenssit

3.1 Kaikkien reagenssien on oltava analyysilaatua. Käytettävän veden on oltava tislattua vettä tai puhtaudeltaan vähintään vastaavaa vettä.

3.2 Metanoli

3.3 Hydrokinoni

3.4 Hydrokinonin monometyylieetteri

3.5 Hydrokinonin monoetyylieetteri

3.6 Hydrokinonin monobentsyylieetteri

3.7 Tetrahydrofuraani, HPLC-laatua

3.8 Veden ja metanolin seos 1:1 (V/V). Sekoitetaan 1 tilavuusosa vettä ja 1 tilavuusosa metanolia (3.2).

3.9 Liikkuva faasi: tetrahydrofuraanin ja veden seos 45:55 (V/V). Sekoitetaan 45 tilavuusosaa tetrahydrofuraania (3.7) ja 55 tilavuusosaa vettä.

3.10 Vertailuliuos

Punnitaan 0,06 g hydrokinonia (3.3), 0,08 g hydrokinonin monometyylieetteriä (3.4), 0,10 g hydrokinonin monoetyylieetteriä (3.5) ja 0,12 g hydrokinonin monobentsyylieetteriä (3.6) 50 ml:n mittapulloon. Liuotetaan metanoliin (3.2), jota lisätään mittatilavuuteen asti. Valmistetaan vertailuliuos laimentamalla 10,00 ml tätä liuosta 50,00 ml:n tilavuuteen veden ja metanolin seoksella (3.8). Näiden liuosten tulee olla äskettäin valmistettuja.

4. Laitteisto

Tavanomainen laboratoriovälineistö ja lisäksi seuraavat:

4.1 Vesihaude, jossa voidaan pitää yllä 60 °C:n lämpötilaa.

4.2 Suurtehonestekromatografi (HPLC), jonka ultraviolettidetektorin aallonpituus on muutettavissa ja jossa on 10 µl:n injektiosilmukka.

4.3 Määrityskolonni:

Ruostumattomasta teräksestä tehty kromatografiakolonni, jonka pituus on 250 mm, sisähalkaisija 4,6 mm ja joka on täytetty Zorbax phenylillä (kemiallisesti sidostettu fenetyylisilaani Zorbax

SIL:n pinnalla, päädyt käsitelty trimetyylikloorisilaanilla), hiukkaskoko 6 μm , tai vastaava. Suojakolonnia ei saa käyttää (lukuun ottamatta fenyyli suojaa tai vastaavaa).

- 4.4 Suodatinpaperi, halkaisija 90 mm, Schleicher and Schull, Weissband n:o 5892 tai vastaava.

5. Menettely

5.1 Näytteen valmistus

Punnitaan kolmen desimaalin tarkkuudella 1 g $\pm$ 0,1 g (a grammaa) näytettä 50 ml:n mittapulloon. Näyte dispergoidaan 25 ml:aan veden ja metanolin seosta (3.8). Pullo suljetaan ja sitä ravistetaan voimakkaasti, kunnes syntyy homogeeninen suspensio. Seosta on ravistettava vähintään yhden minuutin ajan. Pullo asetetaan vesihauteeseen (4.1) ja pidetään 60 °C:n lämpötilassa uuttamisen tehostamiseksi. Pullo jäähdytetään ja täytetään mittatilavuuteen veden ja metanolin seoksella (3.8). Uute suodatetaan suodatinpaperilla (4.4). HPLC-määritys tehdään 24 tunnin kuluessa uutteen valmistamisesta.

5.2 HPLC-kromatografia

- 5.2.1 Liikkuvan faasin (3.9) virtausnopeudeksi asetetaan 1,0 ml/min ja detektorin aallonpituudeksi 295 nm.

- 5.2.2 Injektoidaan 10 μl 5.1 kohdan mukaisesti valmistettua näyteliuosta ja tulostetaan kromatogrammi. Mitataan huippujen alat. Tehdään 5.2.3 kohdassa kuvattu kalibrointi. Verrataan näyteliuoksen ja standardiliuoksen kromatogrammeja. Määritettävien yhdisteiden pitoisuus näyteliuoksessa lasketaan huippujen pinta-alan ja 5.2.3 kohdassa laskettujen vastekertoimien (RF) avulla.

5.2.3 Kalibrointi

Injektoidaan 10 μl vertailuliuosta (3.10) ja tulostetaan kromatogrammi. Injektoidaan useita kertoja, kunnes huipun pinta-ala pysyy vakiona.

Määritetään vastekerroin RF_i :

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

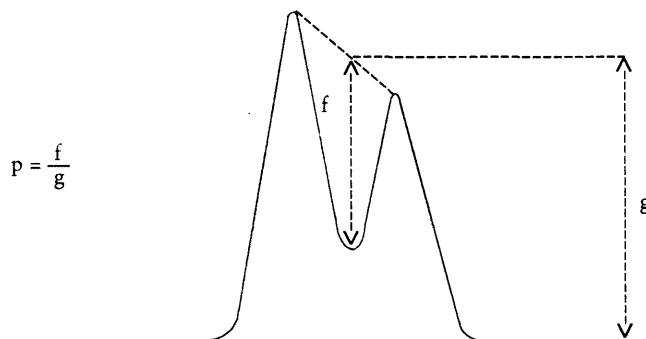
jossa:

p_i = hydrokinonin, hydrokinonin monometyylieetterin, hydrokinonin monoetyylieetterin ja hydrokinonin monobentsyylieetterin huippujen pinta-alat, ja

c_i = hydrokinonin, hydrokinonin monometyylieetterin, hydrokinonin monoetyylieetterin ja hydrokinonin monobentsyylieetterin pitoisuudet (g/50 ml) vertailuliuoksessa (3.10).

On varmistettava, täyttävätkö standardiliuoksella ja näyteliuoksella saadut kromatogrammit seuraavat vaatimukset:

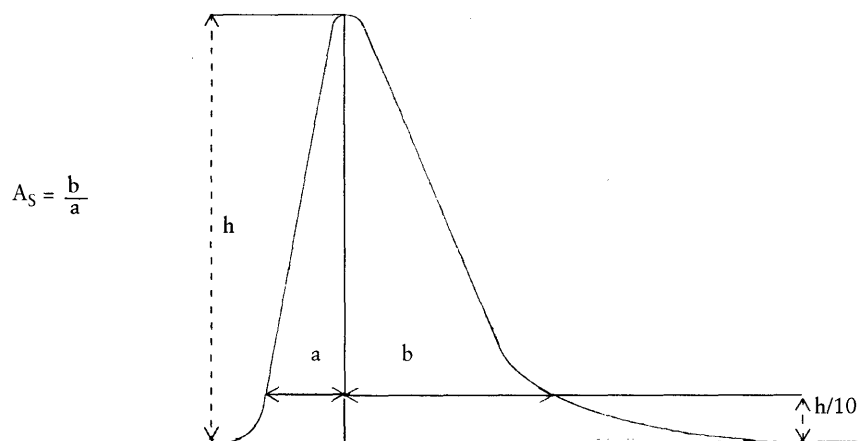
- huonoiten erottuvan huippuparin huippujen erottuvuuden tulee olla vähintään 0,90 (huippujen erottuvuuden määritelmä on kuvassa 1).



Kuva 1: huippujen erottuvuus

Jos vaadittua erottuvuutta ei saavuteta, on joko käytettävä tehokkaampaa kolonnia tai on muutettava liikkuvan faasin koostumusta, kunnes vaatimus täyttyy.

- Kaikkien huippujen epäsymmetrisyyskerroimen A_s tulee olla 0,9—1,5. (Epäsymmetrisyyskerroimen määritelmä on kuvassa 2.) Kun kromatogrammi tulostetaan epäsymmetrisyyskerroimen määrittämistä varten, on suotavaa käyttää paperin nopeutta, joka on vähintään 2 cm/min.



Kuva 2: huipun epäsymmetrisyyskerroin

- perusviivan tulee olla vakaa.

6. Laskelmat

Määritettävän yhdisteen (yhdisteiden) pitoisuus (pitoisuudet) näytteessä lasketaan niiden tuottamien huippujen pinta-aloista. M pitoisuus näytteessä massaprosentteina (x_i) lasketaan kaavalla:

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

jossa:

a = näytteen massa grammoina, ja

b_i = näytteessä olevan määritettävän yhdisteen i huipun pinta-ala

7. Toistettavuus⁽¹⁾

- 7.1 Kun hydrokinonipitoisuus on 2,0 %, samasta näytteestä tehdyn kahden rinnakkaismäärityksen tulosten eron ei pitäisi olla suurempi kuin 0,13 %.
- 7.2 Kun hydrokinonin monometyylieetterin pitoisuus on 1,0 %, samasta näytteestä tehdyn kahden rinnakkaismäärityksen tulosten eron ei pitäisi olla suurempi kuin 0,1 %.
- 7.3 Kun hydrokinonin monoetyylieetterin pitoisuus on 1,0 %, samasta näytteestä tehdyn kahden rinnakkaismäärityksen tulosten eron ei pitäisi olla suurempi kuin 0,11 %.
- 7.4 Kun hydrokinonin monobentsyylietterin pitoisuus on 1,0 %, samasta näytteestä tehdyn kahden rinnakkaismäärityksen tulosten eron ei pitäisi olla suurempi kuin 0,11 %.

8. Uusittavuus⁽¹⁾

- 8.1 Kun hydrokinonipitoisuus on 2,0 %, samasta näytteestä eri olosuhteissa (eri laboratoriot, eri henkilöt, eri laitteisto ja/tai eri aika) tehdyn kahden määrityksen tulosten eron ei pitäisi olla suurempi kuin 0,37 %.

⁽¹⁾ ISO 5725

- 8.2 Kun hydrokinonin monometyylieetterin pitoisuus on 1,0 %, samasta näytteestä eri olosuhteissa (eri laboratoriot, eri henkilöt, eri laitteisto ja/tai eri aika) tehdyn kahden määrittelyn tulosten eron ei pitäisi olla suurempi kuin 0,21 %.
- 8.3 Kun hydrokinonin monoetyylieetterin pitoisuus on 1,0 %, samasta näytteestä eri olosuhteissa (eri laboratoriot, eri henkilöt, eri laitteisto ja/tai eri aika) tehdyn kahden määrittelyn tulosten eron ei pitäisi olla suurempi kuin 0,19 %.
- 8.4 Kun hydrokinonin monobentsyylieetterin pitoisuus on 1,0 %, samasta näytteestä eri olosuhteissa (eri laboratoriot, eri henkilöt, eri laitteisto ja/tai eri aika) tehdyn kahden määrittelyn tulosten eron ei pitäisi olla suurempi kuin 0,11 %.

9. Huomautuksia

- 9.1 Jos hydrokinonipitoisuus on huomattavasti suurempi kuin 2 % ja tarvitaan tarkka arvio pitoisuudesta, näyte (5.1) on laimennettava väkevyyteen, joka vastaa hydrokinonipitoisuudeltaan 2-prosenttista näytteestä saatavaa uutetta; tämän jälkeen määrittely toistetaan.

(Joissakin laitteissa detektorin absorbanssi ei suurilla hydrokinonipitoisuuksilla ole enää lineaarisella alueella.)

9.2 Häiriöt

Edellä esitetyn menetelmän avulla voidaan määrittää hydrokinoni ja sen eetterit yhdellä määrittelykerralla samanaikaisesti. Fenyyliekolonin käyttö takaa hydrokinonin riittävän retention, mitä ei voida taata käytettäessä C18-kolonnilla edellä kuvatun liikkuvan faasin kanssa.

Käytetty menetelmä on kuitenkin altis häiriöille, joita monet parabeenit voivat aiheuttaa. Jos häiriöitä esiintyy, määrittely on syytä toistaa käyttäen erilaista liikkuvan faasin ja stationaarifaasin yhdistelmää. Sopivia menetelmiä on viitteissä 1 ja 2, nimittäin:

Kolonne: Zorbax ODS, 4,6 mm × 25 cm tai vastaava

Lämpötila: 36 °C

virtaus: 1,5 ml/min

liikkuva faasi:

hydrokinonia varten: metanoli-vesiseos 5/95 (V/V)

hydrokinonin monometyylieetteriä varten: metanoli-vesiseos 30/70 (V/V)

hydrokinonin monobentsyylieetteriä varten: metanoli-vesiseos 80/20 (V/V)⁽¹⁾

Kolonne: Spherisorb S5-ODS tai vastaava

liikkuva faasi: vesi-metanoliseos 90/10 (V/V)

virtaus: 1,5 ml/min

Nämä olosuhteet soveltuvat hydrokinonille⁽²⁾.

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

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