

31995L0032

L 178/20

EUROPOS BENDRIJŲ OFICIALUSIS LEIDINYS

1995 7 28

ŠEŠTOJI KOMISIJOS DIREKTYVA 95/32/EB**1995 m. liepos 7 d.****susijusi su analizės metodais, kurie yra būtini kosmetikos gaminių sudėčiai tikrinti****(tekstas svarbus EEE)**

EUROPOS BENDRIJŲ KOMISIJA,

atsižvelgdama į Europos Bendrijos steigimo sutartį,

atsižvelgdama į 1976 m. liepos 27 d. Tarybos direktyvą 76/768/EEB dėl valstybių narių įstatymų, susijusių su kosmetikos gaminiiais, suderinimo ⁽¹⁾, su paskutiniais pakeitimais, padarytais Komisijos direktyva 94/32/EB ⁽²⁾, ypač į jos 8 straipsnio 1 dalį,

kadangi Direktyvoje 76/768/EEB numatyta oficialiai tirti kosmetikos gaminius, užtikrinant, kad bus laikomasi sąlygų, nurodytų Komisijos nuostatose dėl kosmetikos gaminių sudėties;

kadangi visi reikalingi analizės metodai turėtų būti kaip galima greičiau parengti; kadangi tam tikri metodai jau buvo priimti Komisijos direktyvoje 80/1335/EEB ⁽³⁾ su pakeitimais, padarytais Direktyvomis 87/143/EEB ⁽⁴⁾, 82/434/EEB ⁽⁵⁾ su pakeitimais, padarytais Direktyvomis 90/207/EEB ⁽⁶⁾, 83/514/EEB ⁽⁷⁾, 85/490/EEB ⁽⁸⁾ ir 93/73/EEB ⁽⁹⁾;

kadangi benzenkarboksirūgštis, 4-hidroksibenzenkarboksirūgštis, sorbo rūgštis, salicilo rūgštis ir propiono rūgštis atpažinimas ir kiekio nustatymas bei hidrochinono, hidrochinono monometileterio, hidrochinono monoetileterio ir hidrochinono monobenzileterio atpažinimas ir kiekio nustatymas kosmetikos gaminiuose sudaro šeštąjį žingsnį;

kadangi šioje direktyvoje nustatytos priemonės atitinka komiteto nuomonę dėl Direktyvos 76/768/EEB derinimo su technikos pažanga,

PRIĖMĖ ŠIĄ DIREKTYVĄ:

1 straipsnis

Valstybės narės imasi būtinų priemonių užtikrinti, kad oficialiai tiriant kosmetikos gaminius:

— benzenkarboksirūgštis, 4-hidroksibenzenkarboksirūgštis, sorbo rūgštis, salicilo rūgštis ir propiono rūgštis atpažinimas ir kiekio nustatymas,

— hidrochinono, hidrochinono monometileterio, hidrochinono monoetileterio ir hidrochinono monobenzileterio atpažinimas ir kiekio nustatymas,

būtų atliekami taikant priede aprašytus metodus.

2 straipsnis

1. Valstybės narės priima įstatymus ir kitus teisės aktus, kurie įsigalioję ne vėliau kaip iki 1996 m. rugsėjo 30 d., įgyvendina šią direktyvą. Apie tai jos nedelsdamos praneša Komisijai.

Valstybės narės, priimdamos šias nuostatas, daro jose nuorodą į šią direktyvą arba tokia nuoroda daroma jas oficialiai skelbiant. Nuorodos darymo tvarką nustato valstybės narės.

2. Valstybės narės pateikia Komisijai šios direktyvos taikymo srityje priimtas nacionalinės teisės aktų nuostatas.

3 straipsnis

Ši direktyva įsigalioja dvidešimtą dieną po jos paskelbimo *Europos Bendrijų oficialiajame leidinyje*.

4 straipsnis

Ši direktyva skirta valstybėms narėms.

Priimta Briuselyje, 1995 m. liepos 7 d.

Komisijos vardu

Emma BONINO

Komisijos narė⁽¹⁾ OL L 262, 1976 9 27, p. 169.⁽²⁾ OL L 181, 1994 7 15, p. 31.⁽³⁾ OL L 383, 1980 12 31, p. 27.⁽⁴⁾ OL L 57, 1987 2 27, p. 56.⁽⁵⁾ OL L 185, 1982 6 30, p. 1.⁽⁶⁾ OL L 108, 1990 4 28, p. 92.⁽⁷⁾ OL L 291, 1983 10 24, p. 9.⁽⁸⁾ OL L 295, 1985 11 07, p. 30.⁽⁹⁾ OL L 231, 1993 9 14, p. 34.

PRIEDAS

I. BENZENKARBOKSIRŪGŠTIES, 4-HIDROKSIBENZENKARBOKSIRŪGŠTIES, SORBO RŪGŠTIES, SALICILO RŪGŠTIES IR PROPIONO RŪGŠTIES ATPAŽINIMAS IR KIEKIO NUSTATYMAS KOSMETIKOS GAMINIUOSE

1. **Apimtis ir taikymo sritis**

Šis metodas taikomas benzenkarboksirūgšties, 4-hidroksibenzenkarboksirūgšties, sorbo rūgšties, salicilo rūgšties ir propiono rūgšties atpažinimui kosmetikos gaminiuose ir jų kiekių nustatymui. Šių konservantų atpažinimo, taip pat propiono rūgšties, 4-hidroksibenzenkarboksirūgšties, salicilo rūgšties, sorbo rūgšties ir benzenkarboksirūgšties kiekio nustatymo procedūros aprašomos atskirai.

2. **Apibrėžimas**

Benzenkarboksirūgšties, 4-hidroksibenzenkarboksirūgšties, sorbo rūgšties, salicilo rūgšties ir propiono rūgšties kiekiai, nustatyti šiuo metodu, išreiškiami laisvųjų rūgščių masės procentais.

A. ATPAŽINIMAS

1. **Metodo esmė**

Atlikus konservantų rūgštinių/šarminių ekstrahavimą, ekstraktas analizuojamas plonasluoksnės chromatografijos (TLC) metodu, naudojant pažangiausią medžiagų nustatymo techniką. Priklausomai nuo gautų rezultatų, atpažinimas patvirtinamas didelio slėgio skysčių chromatografijos (HPLC) metodu arba, propiono rūgšties atveju, dujų chromatografijos (GC) metodu.

2. **Reagentai**

2.1. Bendroji dalis

Turi būti naudojami analiziškai grynai reagentai. Vanduo turi būti naudojamas distiliuotas arba bent jau lygiavercio grynumo.

2.2. Acetonas

2.3. Dietileteris

2.4. Acetonitrilas

2.5. Toluenas

2.6. n-heksanas

2.7. Parafinas, skystas

2.8. Vandenilio chloridas, 4 M

2.9. Kalio hidroksidas, vandeninis 4 M tirpalas

2.10. Kalcio chloridas, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.11. Ličio karbonatas, Li_2CO_3

2.12. 2-brom-2'-acetonafonas

2.13. 4-hidroksibenzenkarboksirūgštis

2.14. Salicilo rūgštis

2.15. Benzenkarboksirūgštis

2.16. Sorbo rūgštis

2.17. Propiono rūgštis

- 2.18. Etaloniniai tirpalai
Paruošiami visų penkių konservantų (2.13–2.17) 0,1 % (m/t) tirpalai (100 mg/100 ml) dietileterijoje.
- 2.19. Derivatizacijos reagentas
2-brom-2'-acetonafono (2.12) 0,5 % (m/t) tirpalas acetonitrile (2.4) (50 mg/100 ml). Šis tirpalas turi būti ruošiamas kas savaitę ir laikomas šaldytuve.
- 2.20. Katalizatoriaus tirpalas
Ličio karbonato (2.11) 0,3 % (m/t) tirpalas vandenyje (300 mg/100 ml). Šis tirpalas turi būti paruoštas prieš pat naudojimą.
- 2.21. Judančiosios fazės tirpalas
Toluenas (2.5)/acetonas (2.2) (20: 0,5, t/t)
- 2.22. Skystas parafinas (2.7)/n-heksanas (2.6) (1: 2, t/t)

3. Priemonės

Įprasta laboratorinė įranga

- 3.1. Vandens vonia, kurioje palaikoma 60 °C temperatūra.
- 3.2. Ryškinimo kamera
- 3.3. Ultravioletinės šviesos šaltinis, 254 ir 366 nm
- 3.4. Plonasluoksnės plokštelės, Kieselgel 60 be fluorescencijos indikatorius, 20 x 20 cm dydžio, 0,25 mm sluoksnio storio su koncentracijos zona 2,5 x 20 cm (Merck 11845 arba jo atitikmuo)
- 3.5. Mikrošvirkštas, 10 µl
- 3.6. Mikrošvirkštas, 25 µl
- 3.7. Džiovinimo spinta, palaikanti iki 105 °C temperatūrą
- 3.8. 50 ml stikliniai mėgintuvėliai su užsukamu dangteliu
- 3.9. Filtravimo popierius, 90 mm skersmens, *Schleicher & Schull*, Weissband No 5892, arba jo atitikmuo
- 3.10. Universalus pH indikatorinis popierius, pH 1-11
- 3.11. 5 ml stikliniai bandinių buteliukai
- 3.12. Sukamasis plėvelės garintuvas (Rotavapor arba jo atitikmuo)
- 3.13. Kaitinamoji plokštė

4. Darbo eiga

- 4.1. Mėginio paruošimas

50 ml stiklo mėgintuvėlyje su užsukamu dangteliu (3.8) pasveriami apie 1 g bandinio. Įlašinami keturi lašai 4 M vandenilio chlorido (2.8) ir 40 ml acetono (2.2). Didelio šarmingumo gaminiams, pavyzdžiui, tualetiniam muilui, reikėtų pridėti 20 lašų 4 M vandenilio chlorido (2.8). Indikatoriniu popieriumi (3.10) tikrinama, kad pH būtų apie 2. Mėgintuvėlis uždaromas ir smarkiai kratomas vieną minutę.

Palengvinti konservantų ekstrahavimui į acetono fazę, mišinys atsargiai šildomas iki 60 °C temperatūros, kol ištirpsta skystoji fazė.

Tirpalas atvėšinamas iki kambario temperatūros ir filtruojamas per filtravimo popierių (3.9) į kūginę kolbą.

Į 200 ml kūginę kolbą įpilama 20 ml filtrato, 20 ml vandens ir išmaišoma. Lašinant 4 M kalio hidroksidą (2.9), mišinio pH nustatomas apie 10, pH tikrinant indikatoriniu popieriumi (3.10).

Pridedama 1 g kalcio chlorido (2.10) ir smarkiai kratoma. Filtruojama per filtravimo popierių (3.9) į 250 ml dalijamąjį piltuvą, kuriame yra 75 ml dietileterio (2.3) ir smarkiai kratoma vieną minutę. Leidžiama atsiskirti sluoksniams ir vandeninis sluoksnis supilamas į 250 ml kūginę kolbą. Eterinis sluoksnis išpilamas. Tikrinant indikatoriniu popieriumi (3.10), lašinant 4 M vandenilio chloridą (2.8), vandeninio tirpalo pH nustatomas apie 2. Įpilama 10 ml dietileterio (2.3), kolba užkemšama ir vieną minutę smarkiai kratoma, leidžiant atsiskirti sluoksniams ir eterinis sluoksnis perpilamas į sukamąjį plėvelės garintuvą (3.12). Vandeninis sluoksnis išpilamas.

Eterinis sluoksnis garinamas beveik iki sausumo, likutis ištirpinamas 1 ml dietileterio (2.3). Tirpalas supilamas į bandinio buteliuką (3.11).

4.2. Plonasluoksnė chromatografija

Kiekvienam chromatografuojamam etalonui ir bandiniui naudojama apytikriai 3 μ l ličio karbonato tirpalo (2.20), kuris švirkštu (3.5) vienodais atstumais užlašinamas ant plonasluoksnės chromatografijos TLC plokštelės (3.4) pradinės linijos koncentracijos zonoje ir džiovinamas šalto oro srovėje.

TLC plokštelė dedama ant įkaitintos iki 40 °C kaitinamosios plokštelės (3.13), kad dėmės būtų kaip galima mažesnės. Mikrošvirkštu (3.5) ant plokštelės pradinės linijos tiksliai tuose taškuose, kur buvo užlašinta ličio karbonato tirpalo, užlašinama po 10 μ l visų etaloninių tirpalų (2.18) ir bandinio tirpalo (4.1).

Tiksliai tuose taškuose, kur buvo užlašinti etaloniniai ir bandinio tirpalai bei ličio karbonato tirpalas, užlašinama apie 15 μ l derivatizacijos reagento (2.19) (2-brom-2'-acetonafono tirpalo).

TLC plokštelė 45 minutes kaitinama 80 °C temperatūros džiovinimo spintoje (3.7). Atvėsinus plokštelę ryškinama kameroje (3.2), kuri buvo balansuojama 15 minučių (nenaudojant filtravimo popieriaus įdėklo), naudojant judančiosios fazės tirpiklį 2.21 (toluenas/acetonas), kol tirpiklio frontas pasislinks 15 cm (tai gali užtrukti apie 80 minučių).

Plokštelė džiovinama šalto oro srovėje, gautos dėmės tikrinamos UV šviesoje (3.3). Kad padidėtų silpnų dėmių fluorescencija, TLC plokštelė gali būti panardinama į skystą parafiną/n-heksaną (2.22).

5. **Atpažinimas**

Apskaičiuojama kiekvienos dėmės R_f .

Gautosios bandinio R_f reikšmės ir charakteristikos UV spinduliuotėje palyginamos su gautosiomis etaloninių tirpalų reikšmėmis.

Daromos preliminarios išvados apie esančių konservantų buvimą ir jų tapatumą. Atliekama didelio slėgio skysčių chromatografija HPLC, aprašyta B skyriuje, o jeigu išaiškėja esant propiono rūgštis, – dujų chromatografija, aprašyta C skyriuje. Gautos sulaikymo trukmės lyginamos su etaloninių tirpalų sulaikymo trukmėmis.

Remiantis TLC, HPLC ar GC analizės metodų rezultatais, sprendžiama apie galutinį bandinyje esančių konservantų atpažinimą.

B. BENZENKARBOKSIRŪGŠTIES, 4-HIDROKSIBENZENKARBOKSI-RŪGŠTIES, SORBO RŪGŠTIES IR SALICILO RŪGŠTIES KIEKIO NUSTATYMAS

1. **Metodo esmė**

Parūgštintas bandinys ekstrahuojamas etanolio ir vandens mišiniu. Konservantų kiekis po filtravimo nustatomas didelio slėgio skysčių chromatografijos (HPLC) būdu.

2. **Reagentai**

2.1. Turi būti naudojami analiziškai grynai reagentai ir jie turi būti tinkami HPLC atlikti. Naudojamas vanduo turi būti distiliuotas arba lygiavertės kokybės.

2.2. Etanolis, absoliutusis

2.3. 4-hidroksibenzenkarboksirūgštis

- 2.4. Salicilo rūgštis
- 2.5. Benzenkarboksirūgštis
- 2.6. Sorbo rūgštis
- 2.7. Natrio acetatas, ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)
- 2.8. Acto rūgštis, ($\alpha_4^{20} = 1,05 \text{ g/ml}$)
- 2.9. Acetonitrilas
- 2.10. Sieros rūgštis, 2 M
- 2.11. Kalio hidroksidas, vandeninis 0,2 M tirpalas
- 2.12. 2-metoksibenzenkarboksirūgštis
- 2.13. Etanolio/vandens mišinys
- Devynios tūrio dalys etanolio (2.2) sumaišomos su viena tūrio dalimi vandens (2.1).
- 2.14. Vidinis etaloninis tirpalas
- Paruošiamas tirpalas, kuriame yra apytikriai 1 g 2-metoksibenzenkarboksirūgšties (2.12) ir 500 ml etanolio/vandens mišinio (2.13).
- 2.15. Judančiosios fazės tirpiklis HPLC atlikti
- 2.15.1. Acetatinis buferis: į 1 l vandens suberiama 6,35 g natrio acetato (2.7), įpilama 20,0 ml acto rūgšties (2.8) ir išmaišoma.
- 2.15.2. Judančiosios fazės tirpiklis paruošiamas sumaišant devynias tūrio dalis acetatinio buferio (2.15.1) ir vieną tūrio dalį acetonitrilo (2.9).
- 2.16. Konservanto pradinis tirpalas
- Tiksliai pasveriami apie 0,05 g 4-hidroksibenzenkarboksirūgšties (2.3), 0,2 g salicilo rūgšties (2.4), 0,2 g benzenkarboksirūgšties (2.5) ir 0,05 g sorbo rūgšties (2.6), ištirpinama 50 ml matavimo kolboje ir pripilama iki žymės etanolio/vandens mišinio (2.13). Šis tirpalas, laikomas šaldytuve, yra stabilus vieną savaitę.
- 2.17. Etaloniniai konservanto tirpalai
- Į 20 ml matavimo kolbas įpilama 8,00, 4,00, 2,00, 1,00 ir 0,50 ml pradinio tirpalo (2.16). Į kiekvieną kolbą pilama po 10,00 ml vidinio etaloninio tirpalo (2.14) ir 0,5 ml 2 M sieros rūgšties (2.10). Iki žymės pripilama etanolio/vandens mišinio (2.13). Šie tirpalai turi būti paruošti prieš pat naudojimą.
3. **Priemonės**
- Įprasta laboratorinė įranga ir:
- 3.1. Vandens vonia, kurioje palaikoma 60 °C temperatūra
- 3.2. Didelio slėgio skysčių chromatografas su keičiamo bangos ilgio UV detektoriumi ir 10 μl inžektoriaus kilpa
- 3.3. Analizinė kolonėlė
- Nerūdijančio plieno kolonėlė, 12,5–25 cm ilgio, 4,6 mm vidinio skersmens, įkrauta Nucleosil 5C18 arba jo atitikmeniu
- 3.4. Filtravimo popierius, 90 mm skersmens, *Schleicher and Schull*, Weissband No 5892 arba jo atitinkmuo
- 3.5. 50 ml stiklo mėgintuvėliai su užsukamais dangteliais

- 3.6. 5 ml stikliniai bandinių buteliukai
- 3.7. Netolygų kunkuliavimą slopinančios granulės: karborundas, 2–4 mm dydžio, arba jų atitikmuo

4. Darbo eiga

- 4.1. Mėginio paruošimas
- 4.1.1. Mėginio paruošimas, nepridedant vidinio etaloninio tirpalo

50 ml stiklo mėgintuvėlyje su užsukamu dangteliu (3.5) pasveriami 1 g bandinio. Į mėgintuvėlį pipete įpilama 1,00 ml 2 M sieros rūgšties (2.10) ir 40,0 ml etanolio/vandens mišinio (2.13). Pridedama apie 1 g netolygų kunkuliavimą slopinančių granulių (3.7), mėgintuvėlis uždaromas ir ne mažiau kaip vieną minutę smarkiai kratomas, kol bus gauta vienalytė suspensija. Kad konservantai būtų lengviau ekstrahuojami į etanolio fazę, mėgintuvėlis lygiai penkioms minutėms dedamas į 60 °C temperatūros vandens vonią (3.1).

Mėgintuvėlis nedelsiant atvėsinaamas šalto vandens srovėje, ekstraktas vieną valandą laikomas 5 °C temperatūroje.

Ekstraktas filtruojamas per filtravimo popierių (3.4). Apie 2 ml ekstrakto įpilama į bandinio buteliuką (3.6). Ekstraktas laikomas 5 °C temperatūroje, analizuojama HPLC metodu per 24 valandas po paruošimo.

- 4.1.2. Mėginio paruošimas, pridedant vidinio etaloninio tirpalo

50 ml stiklo mėgintuvėlyje su užsukamu dangteliu (3.5) vienos tūkstantosios gramo dalies tikslumu pasveriami 1±0,1 g (a gramų) bandinio. Pipete įpilama 1,00 ml 2 M sieros rūgšties (2.10) ir 30,0 ml etanolio/vandens mišinio (2.13). Pridedama apie 1 g netolygų kunkuliavimą slopinančių granulių (3.7) ir 10,00 ml vidinio etaloninio tirpalo (2.14). Mėgintuvėlis užsukamas dangteliu ir smarkiai kratomas ne trumpiau kaip vieną minutę, kol bus gauta vienalytė suspensija. Konservantų ekstrahavimui į etanolio fazę palengvinti mėgintuvėlis lygiai penkioms minutėms dedamas į 60 °C temperatūros vandens vonią (3.1).

Mėgintuvėlis nedelsiant atvėsinaamas šalto vandens srovėje, ekstraktas vieną valandą laikomas 5 °C temperatūroje.

Ekstraktas filtruojamas per filtravimo popierių (3.4). Apie 2 ml filtrato perpilama į bandinio buteliuką (3.6). Ekstraktas laikomas 5 °C temperatūroje, analizuojama HPLC metodu per 24 valandas po paruošimo.

- 4.2. Didelio slėgio skysčių chromatografija

Judančiosios fazės tirpalas: acetonitrilo/acetato buferis (2.15).

Nustatoma, kad judančiosios fazės tirpalo srauto, tekančio per kolonėlę, greitis būtų 2,0±0,5 ml/min, o detektoriaus bangos ilgis – 240 nm.

- 4.2.1. Kalibravimas

Į skysčių chromatografą (3.2) išvirkščinama po 10 µl visų etaloninių konservanto tirpalų (2.17). Iš gautų chromatogramų kiekvienam tirpalui nustatomas tirtų konservantų smailių aukščio ir vidinio etaloninio tirpalo smailės aukščio santykis. Brėžiama kiekvieno konservanto smailių aukščio ir kiekvieno etaloninio tirpalo koncentracijos santykio kreivė.

Įsitikinama, kad kalibravimo metu nustatyta etaloninių tirpalų priklausomybė yra tiesinė.

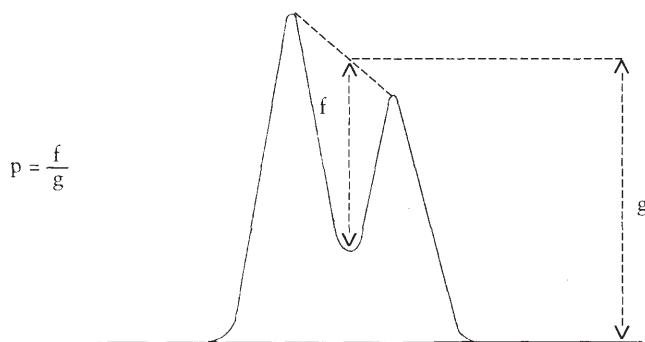
- 4.2.2. Kiekio nustatymas

Į skysčių chromatografą (3.2) išvirkščinama 10 µl mėginio ekstrakto (4.1.1) ir užrašoma chromatograma. Išvirkščinama 10 µl etaloninio konservanto tirpalo (2.17) ir užrašoma chromatograma. Gautos chromatogramos palyginamos. Jeigu mėginio ekstrakto (4.1.1) chromatogramoje nėra smailės, kurios sulaukymo trukmė būtų apytikriai tokia pat kaip 2-metoksibenzenkarboksirūgšties (rekomenduojamas vidinis etaloninis tirpalas), į skysčių chromatografą išvirkščinama 10 µl mėginio ekstrakto, kuriame yra vidinio etaloninio tirpalo (4.1.2), ir užrašoma chromatograma.

Jeigu mėginio ekstrakto (4.1.1), kurio sulaukymo trukmė tokia pat kaip 2-metoksibenzenkarboksirūgšties, chromatogramoje yra matoma trukdžių smailė, turi būti parenkamas kitas tinkamas vidinis etaloninis tirpalas. (Jeigu chromatogramoje nėra nors vieno iš tiriamųjų konservantų, šis konservantas gali būti naudojamas kaip vidinis etaloninis tirpalas.)

Įsitikinama, ar etaloninio tirpalo ir mėginio tirpalo chromatogramos atitinka šiuos reikalavimus:

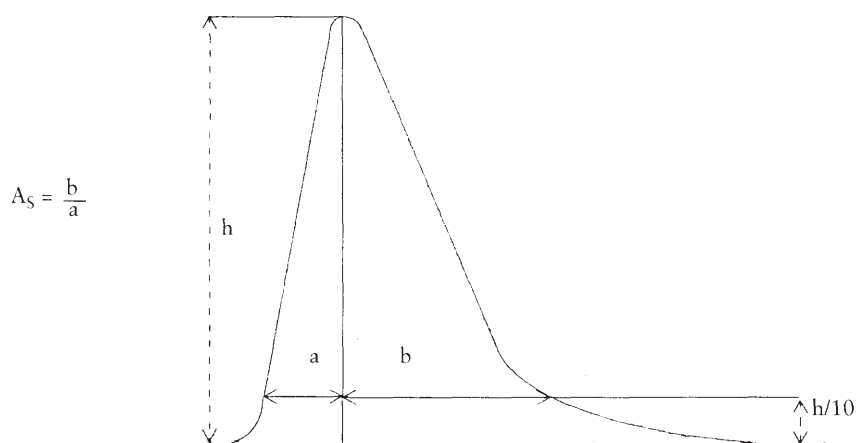
— mažiausiai atskirtos poros smailių atskyrimas yra ne mažesnis kaip 0,90. (Smailių atskyrimas nustatomas taip, kaip pavaizduota 1 pav.)



1 pav. Smailių atskyrimas

Jeigu neįvyksta reikalingas smailių atskyrimas, turi būti naudojama labiau tinkanti kolonėlė, arba judančios fazės tirpalo sudėtis turėtų būti derinama, kol atitiks reikalavimus.

- Visų gautų smailių asimetrijos koeficientas A_s svyruoja nuo 0,9 iki 1,5. (Smailių asimetrijos koeficientas nustatomas taip, kaip pavaizduota 2 pav.) Rekomenduojamas savirašio greitis, užrašant chromarogramą asimetrijos koeficientui nustatyti, – ne mažesnis kaip 2 cm per minutę.



2 pav. Smailių asimetrijos koeficientas

- Turi būti gaunama nekintama pagrindinė linija.

5. Apskaičiavimas

Tiriamųjų konservantų smailių santykis su 2-metoksibenzenkarboksirūgšties (vidinė etaloninė medžiaga) smaile ir kalibracinė keivė naudojami rūgštinių konservantų koncentracijai bandinio tirpale apskaičiuoti. Benzenkarboksirūgšties, 4-hidrogenbenzenkarboksirūgšties, sorbo rūgšties arba salicilo rūgšties kiekis bandinyje apskaičiuojamas masės procentais (x_i) pagal formulę:

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

čia:

a – = mėginio (4.1.2) masė gramais,

b – = konservanto koncentracija mėginio ekstrakto (4.1.2), nustatyta iš kalibracinės kreivės, ($\mu\text{g/ml}$).

6. Pasikartojamumas ⁽¹⁾

Jeigu 4-hidroksibenzenkarboksirūgštis kiekis sudaro 0,40 %, dviejų lygiagrečių to paties mėginio nustatymų rezultatų skirtumas turi neviršyti absoliučios 0,035 % vertės.

Jeigu benzenkarboksirūgštis kiekis sudaro 0,50 %, dviejų lygiagrečių to paties mėginio nustatymų rezultatų skirtumas turi neviršyti absoliučios 0,050 % vertės.

Jeigu salicilo rūgštis kiekis sudaro 0,50 %, dviejų lygiagrečių to paties mėginio nustatymų rezultatų skirtumas turi neviršyti absoliučios 0,045 % vertės.

Jeigu sorbo rūgštis kiekis sudaro 0,60 %, dviejų lygiagrečių to paties mėginio nustatymų rezultatų skirtumas turi neviršyti absoliučios 0,035 % vertės.

7. Pastabos

7.1. Metodo rezultatų pastovumo tyrimo rezultatai parodė, kad sieros rūgštis, pridėtos rūgštims iš mėginio ekstrahuoti, kiekis yra labai svarbus, o tiriamo mėginio kiekis turi atitikti nustatytas ribas.

7.2. Jeigu reikia, gali būti naudojama tinkama apsauginė kolonėlė.

C. PROPIONO RŪGŠTIES KIEKIO NUSTATYMAS**1. Apimtis ir taikymo sritis**

Šis metodas tinka propiono rūgštis kiekiui nustatyti, kai jos maksimali koncentracija kosmetikos gaminiuose yra 2 % (m/m).

2. Apibrėžimas

Propiono rūgštis koncentracija, nustatyta šiuo metodu, išreiškiama gaminio masės procentais (% m/m).

3. Metodo esmė

Ekstrahavus propiono rūgštį iš gaminio, jos kiekis nustatomas dujų chromatografijos metodu, kaip vidinę etaloninę medžiagą naudojant 2-metilpropiono rūgštį.

4. Reagentai

Turi būti naudojami analiziškai grynai reagentai; naudojamas vanduo turi būti distiliuotas arba lygiavertės kokybės.

4.1. Etanolis, 96 % (t/t)

4.2. Propiono rūgštis

4.3. 2-metilpropiono rūgštis

4.4. Ortofosfato rūgštis, 10 % (m/t)

4.5. Propiono rūgštis tirpalas

50 ml matavimo kolboje tiksliai pasveriami apie 1,00 g (p gramų) propiono rūgštis ir iki žymės pripilama etanolio (4.1).

4.6. Vidinis etaloninis tirpalas

50 ml matavimo kolboje tiksliai pasveriami apie 1,00 g (e gramų) 2-metilpropiono rūgštis ir iki žymės pripilama etanolio (4.1).

⁽¹⁾ ISO 5725.

5. **Priemonės**

- 5.1. Įprasta laboratorinė įranga ir:
- 5.2. Dujų chromatografas su liepsnos jonizacijos detektoriumi
- 5.3. Stiklo mėgintuvėlis (20 x 150 mm) su užsukamu dangteliu
- 5.4. 60 °C temperatūros vandens vonia
- 5.5. 10 ml stiklo švirkštas su filtro membrana (porų skersmuo: 0,45 μm)

6. **Darbo eiga**

- 6.1. Mėginio paruošimas
- 6.1.1. Mėginio paruošimas be vidinio etaloninio tirpalo

Stiklo mėgintuvelyje (5.3) pasveriamas apie 1 g bandinio. Įpilama 0,5 ml fosforo rūgšties (4.4) ir 9,5 ml etanolio (4.1).

Mėgintuvėlis uždaromas ir smarkiai kratomas. Jeigu reikia, mėgintuvėlis penkioms minutėms dedamas į pašildytą iki 60 °C temperatūros (5.4) vandens vonią, kad lipidų fazė iki galo iširptų. Greitai atvėsinama vandens srovėje. Dalis tirpalo filtruojama per membraniinį filtrą (5.5). Filtratas chromatografuojamas tą pačią dieną.

- 6.1.2. Mėginio paruošimas su vidiniu etaloniniu tirpalu

Stiklo mėgintuvelyje (5.3) vienos tūkstantosios gramo dalies tikslumu pasveriamas $1 \pm 0,1$ g (a gramų) bandinio. Įpilama 0,5 ml ortofosfato rūgšties (4.4), 0,50 ml vidinio etaloninio tirpalo (4.6) ir 9 ml etanolio (4.1).

Mėgintuvėlis uždaromas ir smarkiai kratomas. Jeigu reikia, mėgintuvėlis dedamas penkioms minutėms į 60 °C temperatūros vandens vonią (5.4), kad iširptų lipidų fazė. Greitai atvėsinama vandens srovėje. Dalis tirpalo filtruojama per membraniinį filtrą (5.5). Filtratas chromatografuojamas tą pačią dieną.

- 6.2. Dujų chromatografijos sąlygos

Rekomenduojamos tokios darbo sąlygos:

Kolonėlė

Tipas	nerūdijantis plienas
Ilgis	2 m
Skersmuo	1/8 "
Įkrova	10 % <i>SP</i> TM 1000 (arba jo atitinkmuo) + 1 % H ₃ PO ₄ ant Chromosorb WAW 100–120 mešų.

Temperatūra

Inžektoriaus	200 °C
Kolonėlės	120 °C
Detektoriaus	200 °C
Stumiančiosios dujos	azotas
Srauto greitis	25 ml/min

- 6.3. Chromatografija

- 6.3.1. Kalibravimas

Į 20 ml matavimo kolbas pipete pilama 0,25, 0,50, 1,00, 2,00 ir 4,00 ml propiono rūgšties tirpalo (4.5). Į kiekvieną matavimo kolbą pipete pilama 1,00 ml vidinio etaloninio tirpalo (4.6); pripilama iki žymės etanolio (4.1) ir išmaišoma. Taip paruoštuose tirpaluose yra e mg/ml 2-metilpropiono rūgšties – vidinės etaloninės medžiagos (tai yra, 1 mg/ml, jeigu e = 1 000) ir p/4, p/2, p, 2p, 4p mg/ml propiono rūgšties (tai yra, 0,25, 0,50, 1,00, 2,00, 4,00 mg/ml, jeigu p = 1 000).

Įšvirkščinama 1 μl kiekvieno tirpalo ir kalibracinė kreivė brėžiama ant x ašies atidedant propiono rūgšties/2-metilpropiono rūgšties masių santykį, ant y ašies – atitinkamų smailių plotų santykį.

Kiekvieno skysčio išvirkščiami tris kartus ir apskaičiuojamas vidutinis smailių plotų santykis.

6.3.2. Kiekio nustatymas

Išvirkščiami 1 µl mėginio filtrato 6.1.1. Chromatograma palyginama su etaloninių tirpalų (6.3.1) chromatogramomis. Jeigu smailės sulaikymo trukmė yra beveik tokia pati kaip 2-metilpropiono rūgšties, pakeičiama vidinė etaloninė medžiaga. Jeigu trukdžių nėra, išvirkščiami 1 µl mėginio filtrato 6.1.2, matuojami propiono rūgšties ir vidinės etaloninės medžiagos smailės plotai.

Kiekvieno skysčio išvirkščiami tris kartus ir apskaičiuojamas vidutinis smailių plotų santykis.

7. Apskaičiavimai

7.1. Iš kalibracinės kreivės, gautos 6.3.1, nustatomas masių santykis (K), atitinkantis 6.3.2 apskaičiuotą smailės plotų santykį.

7.2. Nustačius masių santykį, propiono rūgšties kiekis bandinyje (X) masės procentais apskaičiuojamas pagal formulę:

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

čia:

K – = 7.1 punkte apskaičiuotas masių santykis,

e – = vidinės etaloninės medžiagos, pasvertos pagal 4.6, masė gramais,

a – = mėginio, pasvarto pagal 6.1.2, masė gramais.

Duomenys apvalinami iki vienos dešimtosios.

8. Pasikartojamumas ⁽¹⁾

Jeigu propiono rūgšties kiekis sudaro 2 % (m/m), dviejų lygiagrečių to paties mėginio nustatymų rezultatų skirtumas turi neviršyti 0,12 %.

II. HIDROCHINONO, HIDROCHINONO MONOMETILETERIO, HIDROCHINONO MONOETILETERIO IR HIDROCHINONO MONOBENZILETERIO ATPAŽINIMAS IR KIEKIO NUSTATYMAS KOSMETIKOS GAMINIUIOSE

A. ATPAŽINIMAS

1. Apimtis ir taikymo sritis

Šiuo metodu aptinkami ir atpažįstami hidrochinonas, hidrochinono monometileris, hidrochinono monoetileris ir hidrochinono monobenzileris (monobenzonas) odos šviesinimui skirtuose kosmetikos gaminiuose.

2. Metodo esmė

Hidrochinonas ir jo eteriai atpažįstami plonasluoksnės chromatografijos (TLC) metodu.

3. Reagentai

Turi būti naudojami analiziškai grynai reagentai.

⁽¹⁾ ISO 5725.

- 3.1. Etanolis, 96 % (t/t)
- 3.2. Chloroformas
- 3.3. Dietileteris
- 3.4. Judančiosios fazės tirpiklis:
Chloroformas/dietileteris, 66: 33 (t/t)
- 3.5. Amoniakas, 25 % (m/m) ($d_4^{20} = 0,91$ g/ml)
- 3.6. Askorbo rūgštis
- 3.7. Hidrochinonas
- 3.8. Hidrochinono monometileteris
- 3.9. Hidrochinono monoetileteris
- 3.10. Hidrochinono monobenzileteris (monobenzonas)
- 3.11. Etaloniniai tirpalai
Toliau išvardyti etaloniniai tirpalai turi būti paruošti prieš pat naudojimą ir yra patvarūs vieną dieną.
 - 3.11.1. 10 ml graduotame mėgintuvėlyje pasveriami 0,05 g hidrochinono (3.7). Pridedama 0,250 g askorbo rūgšties (3.6) ir 5 ml etanolio (3.1). Lašinamas amoniakas (3.5), kol pH pasieks 10, ir pripilama iki 10 ml tūrio etanolio (3.1).
 - 3.11.2. 10 ml graduotame mėgintuvėlyje pasveriami 0,05 g hidrochinono monometileterio (3.8). Pridedama 0,250 g askorbo rūgšties (3.6) ir 5 ml etanolio (3.1). Lašinamas amoniakas (3.5), kol pH pasieks 10, ir pripilama iki 10 ml tūrio etanolio (3.1).
 - 3.11.3. 10 ml graduotame mėgintuvėlyje pasveriami 0,05 g hidrochinono monoetileterio (3.9). Pridedama 0,250 g askorbo rūgšties (3.6) ir 5 ml etanolio (3.1). Lašinamas amoniakas (3.5), kol pH pasieks 10, ir pripilama iki 10 ml tūrio etanolio (3.1).
 - 3.11.4. 10 ml graduotame mėgintuvėlyje pasveriami 0,05 g hidrochinono monobenzileterio (3.10). Pridedama 0,250 g askorbo rūgšties (3.6) ir 5 ml etanolio (3.1). Lašinamas amoniakas (3.5), kol pH pasieks 10, ir pripilama iki 10 ml tūrio etanolio (3.1).
- 3.12. Sidabro nitratas
- 3.13. 12-molibdofosforo rūgštis
- 3.14. Kalio heksacianoferatas (III), heksahidratas
- 3.15. Geležies chloridas, heksahidratas
- 3.16. Purškiamieji reagentai
 - 3.16.1. Į 5 % (m/t) vandeninį sidabro nitrato tirpalą (3.12) lašinamas amoniakas (3.5), kol susidarančios nuosėdos ištirpa.
Svarbu:
Laikomas tirpalas pasidaro nepatvarus, gali sprogti, todėl panaudotas turėtų būti išpilamas.
 - 3.16.2. 10 % (m/t) 12-molibdofosforo rūgšties (3.13) tirpalas etanolyje (3.1).

- 3.16.3. Paruošiamas 1 % (m/t) vandeninis kalio heksacianoferato (3.14) tirpalas ir 2 % (m/t) vandeninis geležies chlorido (3.15) tirpalas. Abu tirpalai sumaišomi lygiomis dalimis prieš pat vartojimą.

4. Priemonės

Įprasta laboratorinė įranga ir:

- 4.1. Įprasta plonasluoksnės chromatografijos (TLC) įranga
- 4.2. TLC plokštelės, paruoštos naudojimui: silikagelis GHR/UV₂₅₄; 20 x 20 cm (*Machery, Nagel* arba jų atitikmuo). Sluoksnio storis – 0,25 mm
- 4.3. Ultragarso vonia
- 4.4. Centrifuga
- 4.5. UV lempa, 254 nm

5. Darbo eiga

- 5.1. Mėginio paruošimas

10 ml graduotame mėgintuvėlyje pasveriami 3,0 g bandinio. Pridedama 0,250 g askorbo rūgšties (3.6) ir 5 ml etanolio (3.1). Lašinamas amoniakas (3.5), kol pH pasieks 10. Pripilama iki 10 ml tūrio etanolio (3.1). Mėgintuvėlis užkemšamas kamščiu ir homogenizuojama ultragarso vonioje 10 minučių. Filtruojama per filtravimo popierių arba centrifuguojama, esant 3 000 aps./min.

- 5.2. Plonasluoksnė chromatografija TLC

- 5.2.1. Chromatografo kamera prisotinama judančiosios fazės tirpiklio (3.4).

- 5.2.2. Ant plokštelės užlašinama po 2 μl etaloninių tirpalų (3.11) ir 2 μl bandinio tirpalo (5.1). Ryškinama tamsoje, kambario temperatūroje, kol tirpiklio frontas pasislinks 15 cm nuo pradinės linijos.

- 5.2.3. Plokštelė išimama ir džiovinama kambario temperatūroje.

- 5.3. Aptikimas

- 5.3.1. Plokštelė stebima UV šviesoje esant 254 nm bangos ilgiui, pažymimos dėmių vietos.

- 5.3.2. Plokštelė apipurškiamas:

- sidabro nitrato reagentu (3.16.1), arba
- 12-molibdofosforo rūgšties reagentu (3.16.2); kaitinama iki apytikriai 120 °C, arba
- kalio heksacianoferato tirpalu ir geležies chlorido tirpalu (3.16.3).

6. Atpažinimas

Apskaičiuojama kiekvienos dėmės R_f vertė.

Gautos bandinio tirpalo dėmės palyginamos su etaloninių tirpalų dėmėmis, palyginant: jų R_f vertes, dėmių spalvą, jas veikiant UV spinduliuote, ir dėmių spalvą, atsiradusią apipurškus purškiamuoju reagentu.

Atliekama didelio slėgio skysčių chromatografija, aprašyta tolesniame B skirsnyje, ir gautosios mėginio smailės (-ių) sulaikymo trukmės palyginamos su etaloninių tirpalų sulaikymo trukmėmis.

Remiantis plonasluoksnės chromatografijos TLC ir didelio slėgio skysčių chromatografijos HPLC rezultatais, galima atpažinti hidrochinoną ir (arba) jo eterius.

7. Pastabos

Esant aprašytoms sąlygoms, buvo gautos tokios R_f vertės:

hidrochinonas:	0,32
hidrochinono monometileteris:	0,53
hidrochinono monoetileteris:	0,55
hidrochinono monobenzileteris:	0,58

B. KIEKIO NUSTATYMAS

1. Apimtis ir taikymo sritis

Šiuo metodu nustatomas hidrochinono, hidrochinono monometileterio, hidrochinono monoetileterio ir hidrochinono monobenzileterio kiekis odos šviesinimui skirtuose kosmetikos gaminiuose.

2. Metodo esmė

Bandinys ekstrahuojamas vandens/metanolio mišiniu atsargiai šildant, kad ištirptų visos lipidinės medžiagos. Gautame tirpale analitės kiekis nustatomas atvirkštinių fazių skysčių chromatografijos būdu, naudojant UV detektorių.

3. Reagentai

- 3.1. Turi būti naudojami analiziškai gryni reagentai. Naudojamas vanduo turi būti distiliuotas arba lygiavertės kokybės.
- 3.2. Metanolis
- 3.3. Hidrochinonas
- 3.4. Hidrochinono monometileteris
- 3.5. Hidrochinono monoetileteris
- 3.6. Hidrochinono monobenzileteris (monobenzonas)
- 3.7. Tetrahidrofuranas, tinkantis didelio slėgio skysčių chromatografijai HPLC
- 3.8. Vandens/metanolio mišinys 1: 1 (t/t). Sumaišoma viena tūrio dalis vandens ir viena tūrio dalis metanolio (3.2).
- 3.9. Judančiosios fazės tirpiklis: tetrahidrofurano/vandens mišinys 45: 55 (t/t). Sumaišomos 45 tūrio dalys tetrahidrofurano (3.7) ir 55 tūrio dalys vandens.
- 3.10. Etaloninis tirpalas

50 ml matavimo kolboje pasveriami 0,06 g hidrochinono (3.3), 0,08 g hidrochinono monometileterio (3.4), 0,10 g hidrochinono monoetileterio (3.5) ir 0,12 g hidrochinono monobenzileterio (3.6). Ištirpinama ir praskiedžiama metanolio (3.2) iki žymės. Etaloninis tirpalas paruošiamas taip: 10,00 ml šio tirpalo iki 50,00 ml praskiedžiama vandens/metanolio mišiniu (3.8). Šie tirpalai turi būti paruošti prieš pat naudojimą.

4. Priemonės

Įprasta laboratorinė įranga ir:

- 4.1. Vandens vonia, kurioje palaikoma 60 °C temperatūra
- 4.2. Didelio slėgio skysčių chromatografas su keičiamo bangos ilgio UV detektoriumi ir 10 µl įšvirkštimo kilpa
- 4.3. Analizinė kolonėlė:

Nerūdijančio plieno chromatografinė kolonėlė, 250 mm ilgio, 4,6 mm vidinio skersmens, įkrauta *Zorbax phenyl* (chemiškai surištas fenetilsilanas ant *Zorbax SIL*, padengtas trimetilchlorosilanu), dalelių dydis – 6 µm, arba jo atitikmuo. Apsauginė kolonėlė nenaudojama, išskyrus fenilo kolonėlę arba jos atitikmenį.

4.4. Filtravimo popierius, 90 mm skersmens, Schleicher and Scull, Weissband No 5892 arba jo atitinkmuo.

5. Darbo eiga

5.1. Mėginio paruošimas

Vienos tūkstantosios gramo dalies tikslumu 50 ml matavimo kolboje pasverama $1 \pm 0,1$ g (a gramų) mėginio. Bandinys disperguojamas 25 ml vandens/metanolio mišinio (3.8). Kolba užkemšama ir smarkiai kratoma, kol susidarys vienalytė suspensija. Kratoma ne trumpiau kaip vieną minutę. Ekstrahavimui sustiprinti kolba dedama į $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūros vandens vonią (4.1). Kolba atvėsinama ir pripilama iki žymės vandens/metanolio mišinio (3.8). Ekstraktas filtruojamas per filtravimo popierių (4.4). Analizuojama didelio slėgio skystųjų chromatografijos metodu HPLC per 24 valandas po ekstrakto paruošimo.

5.2. Didelio slėgio skystųjų chromatografija

5.2.1. Judančiosios fazės tirpiklio (3.9) srauto greitis nustatomas 1,0 ml/min, detektoriaus bangos ilgis – 295 nm.

5.2.2. Įšvirkščinama 10 μl bandinio tirpalo, gauto pagal 5.1, ir užrašoma chromatograma. Matuojami smailių plotai. Kalibravimas atliekamas pagal 5.2.3 punkto aprašymą. Palyginamos gautos mėginio ir etaloninių tirpalų chromatogramos. Smailių plotai ir reaktiškumo koeficientai (RF), gauti pagal 5.2.3, naudojami mėginio analizių koncentracijoms apskaičiuoti.

5.2.3. Kalibravimas

Įšvirkščinama 10 μl etaloninio tirpalo (3.10) ir užrašoma chromatograma. Švirkščinama keletą kartų, kol bus gaunami pastovūs smailių plotai.

Nustatomas reaktiškumo koeficientas RF_i :

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

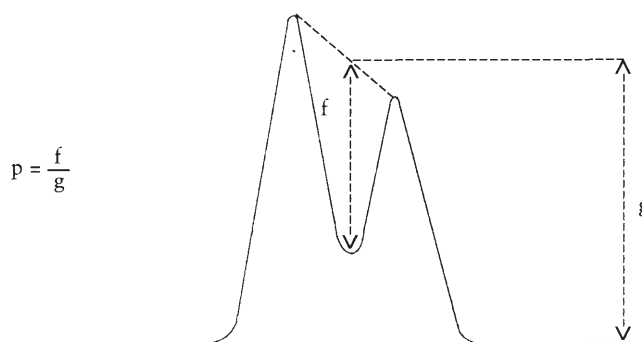
čia:

p_i – = hidrochinono, hidrochinono monometileterio, hidrochinono monoetileterio arba hidrochinono monobenzileterio smailės plotas,

c_i – = hidrochinono, hidrochinono monometileterio, hidrochinono monoetileterio arba hidrochinono monobenzileterio koncentracija (g/50 ml) etaloniniame tirpale (3.10).

Patikrinama, ar gautos etaloninio tirpalo ir mėginio tirpalo chromatogramos atitinka šiuos reikalavimus:

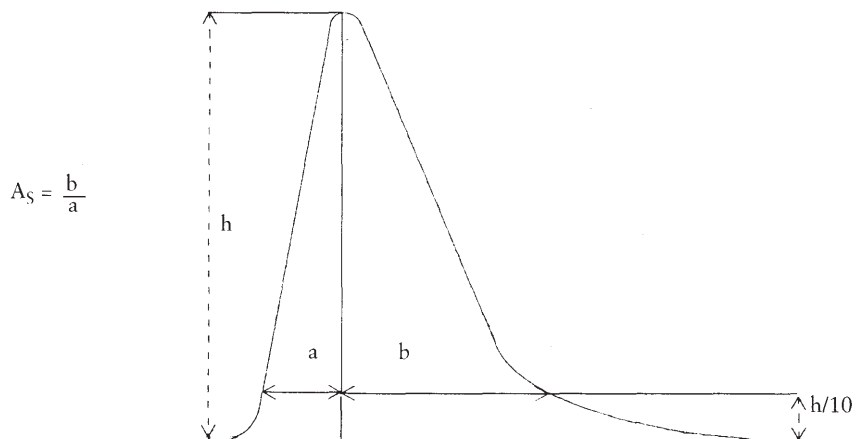
— mažiausiai atskirtos poros smailės atskyrimas yra ne mažesnis kaip 0,90. (Smailės atskyrimas parodytas 1 pav.)



1 pav. Smailės atskyrimas

Jeigu reikalingas atskyrimas nepasiekiamas, turi būti naudojama labiau tinkanti kolonėlė arba judančiosios fazės tirpiklio sudėtis turėtų būti derinama, kol ji atitiks reikalavimus.

- Visų gautų smailių asimetrijos koeficientas A_s svyruoja tarp 0,9–1,5. (Smailių asimetrijos koeficientas nustatomas taip, kaip pavaizduota 2 pav.) Užrašant asimetrijos koeficiento nustatymo chromatogramą, rekomenduojamas ne mažesnis kaip 2 cm/min savirašio greitis.



2 pav. **Smailių asimetrijos koeficientas**

- Turi būti gaunama nekintama pagrindinė linija.

6. Apskaičiavimas

Analizių smailių plotai naudojami analitės (-čių) koncentracijai (-oms) mėginyje apskaičiuoti. Analitės koncentracija mėginyje yra apskaičiuojama masės procentais (x_i) pagal formulę:

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

čia:

a – = mėginio masė gramais,

b_i – = i analitės mėginyje smailės plotas.

7. Pasikartojamumas ⁽¹⁾

- 7.1. Jeigu hidrochinono kiekis sudaro 2,0 %, dviejų lygiagrečių to paties mėginio nustatymų rezultatų skirtumas turi neviršyti 0,13 % absoliučios vertės.
- 7.2. Jeigu hidrochinono monometileterio kiekis sudaro 1,0 %, dviejų lygiagrečių to paties mėginio nustatymų rezultatų skirtumas turi neviršyti 0,1 % absoliučios vertės.
- 7.3. Jeigu hidrochinono monoetileterio kiekis sudaro 1,0 %, dviejų lygiagrečių to paties mėginio nustatymų rezultatų skirtumas turi neviršyti 0,11 % absoliučios vertės.
- 7.4. Jeigu hidrochinono monobenzileterio kiekis sudaro 1,0 %, dviejų lygiagrečių to paties mėginio nustatymų rezultatų skirtumas turi neviršyti 0,11 % absoliučios vertės.

8. Rezultatų atitikimas ⁽¹⁾

- 8.1. Jeigu hidrochinono kiekis sudaro 2,0 %, dviejų lygiagrečių to paties mėginio nustatymų, atliktų skirtingomis sąlygomis (skirtingos laboratorijos, skirtingi operatoriai, skirtingos priemonės ir (arba) skirtingas laikas) rezultatų skirtumas turi neviršyti 0,37 % absoliučios vertės.

⁽¹⁾ ISO 5725.

- 8.2. Jeigu hidrochinono monometileterio kiekis sudaro 1,0 %, dviejų lygiagrečių to paties mėginio nustatymų, atliktų skirtingomis sąlygomis (skirtingos laboratorijos, skirtingi operatoriai, skirtingos priemonės ir (arba) skirtingas laikas) rezultatų skirtumas turi neviršyti 0,21 % absoliučios vertės.
- 8.3. Jeigu hidrochinono monoetileterio kiekis sudaro 1,0 %, dviejų lygiagrečių to paties mėginio nustatymų, atliktų skirtingomis sąlygomis (skirtingos laboratorijos, skirtingi operatoriai, skirtingos priemonės ir (arba) skirtingas laikas) rezultatų skirtumas turi neviršyti 0,19 % absoliučios vertės.
- 8.4. Jeigu hidrochinono monobenzileterio kiekis sudaro 1,0 %, dviejų lygiagrečių to paties mėginio nustatymų, atliktų skirtingomis sąlygomis (skirtingos laboratorijos, skirtingi operatoriai, skirtingos priemonės ir (arba) skirtingas laikas) rezultatų skirtumas turi neviršyti 0,11 % absoliučios vertės.

9. Pastabos

- 9.1. Jeigu nustatoma, kad hidrochinono kiekis yra daug didesnis negu 2 % ir reikia tiksliai nustatyti jo kiekį, bandinio ekstraktas (5.1) turi būti skiedžiamas iki tokios koncentracijos, kokia būtų gauta iš bandinio, turinčio 2 % hidrochinono, o kiekio nustatymas turėtų būti pakartojamas.

(Esant didelei hidrochinono koncentracijai, kai kuriuose prietaisuose absorbcija gali būti už detektoriaus tiesinio intervalo ribų.)

- 9.2. Trukdžiai

Ankščiau aprašytu metodu galima nustatyti hidrochinoną ir jo eterius paprastos izokratinės chromatografijos būdu. Fenilo kolonėlės naudojimas užtikrina pakankamą hidrochinono sulaukymą, kurio negalima garantuoti naudojant C18 kolonėlę su apibūdintuoju judančiosios fazės tirpalu.

Tačiau šiame metode dažnai susiduriama su trukdžiais, kuriuos sukelia parabenai. Tokiais atvejais nustatymas turėtų būti pakartojamas, naudojant kitokią judančiosios fazės/nuostoviosios fazės sistemą. Tinkamus metodus galima rasti 1 ir 2 nuorodoje, būtent:

Kolonėlė: Zorbax ODS, 4,6 mm x 25 mm arba jos atitikmuo:

temperatūra: 36 °C

srautas: 1,5 ml/min

judančiosios fazės tirpikliai:

hidrochinonui: metanolis/vanduo 5/95 (t/t)

hidrochinono monometileteriui: metanolis/vanduo 30/70 (t/t)

hidrochinono monobenzileteriui: metanolis/vanduo 80/20 (t/t) ⁽¹⁾

Kolonėlė: Spherisorb S5-ODS arba jos atitikmuo:

– judančiosios fazės tirpiklis: metanolis/vanduo 90/10 (t/t),

– srautas: 1,5 ml/min.

Šios sąlygos tinka hidrochinonui ⁽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), 111, p. 129.