

31995L0032

L 178/20

DZIENNIK URZĘDOWY WSPÓLNOT EUROPEJSKICH

28.7.1995

SZÓSTA DYREKTYWA KOMISJI
z dnia 7 lipca 1995 r.
odnosząca się do metod analizy niezbędnych do kontroli składu produktów kosmetycznych
(95/32/WE)
(Tekst mający znaczenie dla EOG)

KOMISJA WSPÓLNOT EUROPEJSKICH,

uwzględniając Traktat ustanawiający Wspólnotę Europejską,

uwzględniając dyrektywę Rady 76/768/EWG z dnia 27 lipca 1976 r. w sprawie zbliżenia ustawodawstw Państw Członkowskich odnoszących się do produktów kosmetycznych⁽¹⁾, ostatnio zmienioną dyrektywą Komisji 94/32/WE⁽²⁾, w szczególności jej art. 8 ust. 1,

a także mając na uwadze, co następuje:

dyrektywa 76/768/EWG ustanawia urzędowe badania produktów kosmetycznych mające na celu zapewnienie, że przestrzegane są warunki ustanowione przez przepisy wspólnotowe dotyczące składu produktów kosmetycznych;

najszybciej jak to możliwe należy ustanowić wszelkie niezbędne metody analizy; niektóre metody zostały już przyjęte w drodze dyrektywy Komisji 80/1335/EWG⁽³⁾, ostatnio zmienionej dyrektywą 87/143/EWG⁽⁴⁾, 82/434/EWG⁽⁵⁾, ostatnio zmienionej dyrektywą 90/207/EWG⁽⁶⁾, 83/514/EWG⁽⁷⁾, 85/490/EWG⁽⁸⁾ oraz 93/73/EWG⁽⁹⁾;

identyfikowanie i oznaczanie kwasu benzooesowego, kwasu 4-hydroksybenzooesowego, kwasu sorbinowego, kwasu salicylowego i kwasu propionowego w produktach kosmetycznych oraz identyfikowanie i oznaczanie hydrochinonu, eteru monometyloвого hydrochinonu, eteru monoetyloвого hydrochinonu i eteru monobenzylowego hydrochinonu w produktach kosmetycznych stanowią szósty krok na tej drodze;

środki przewidziane w niniejszej dyrektywie są zgodne z opinią Komitetu ds. Dostosowania do Postępu Technicznego Dyrektywy 76/768/EWG,

PRZYJMUJE NINIEJSZĄ DYREKTYWĘ:

Artykuł 1

Państwa Członkowskie podejmą wszelkie niezbędne kroki, aby podczas urzędowych badań produktów kosmetycznych:

- w zakresie identyfikowania i oznaczania kwasu benzooesowego, kwasu 4-hydroksybenzooesowego, kwasu sorbinowego, kwasu salicylowego i kwasu propionowego,
 - identyfikowania i oznaczania hydrochinonu, eteru monometyloвого hydrochinonu, eteru monoetyloвого hydrochinonu i eteru monobenzylowego hydrochinonu,
- odbywało się zgodnie z metodami opisanymi w Załączniku.

Artykuł 2

1. Państwa Członkowskie wprowadzą w życie przepisy ustawowe, wykonawcze i administracyjne niezbędne do wykonania niniejszej dyrektywy nie później niż do dnia 30 września 1996 r., o czym niezwłocznie poinformują Komisję.

Gdy Państwa Członkowskie przyjmują te przepisy, zawierają one odniesienie do niniejszej dyrektywy lub są zaopatrzone w takie odniesienie w czasie ich urzędowej publikacji. Metody dokonywania takiego odniesienia określone są przez Państwa Członkowskie.

2. Państwa Członkowskie prześlą Komisji teksty przepisów prawa krajowego, przyjętych w zakresie objętym niniejszą dyrektywą.

Artykuł 3

Niniejsza dyrektywa wchodzi w życie dwudziestego dnia po jej opublikowaniu w *Dzienniku Urzędowym Wspólnot Europejskich*.

Artykuł 4

Niniejsza dyrektywa skierowana jest do Państw Członkowskich.

Sporządzono w Brukseli, dnia 7 lipca 1995 r.

W imieniu Komisji

Emma BONINO

Członek Komisji

⁽¹⁾ Dz.U. L 262 z 27.9.1976, str. 169.

⁽²⁾ Dz.U. L 181 z 15.7.1994, str. 31.

⁽³⁾ Dz.U. L 383 z 31.12.1980, str. 27.

⁽⁴⁾ Dz.U. L 57 z 27.2.1987, str. 56.

⁽⁵⁾ Dz.U. L 185 z 30.6.1982, str. 1.

⁽⁶⁾ Dz.U. L 108 z 28.4.1990, str. 92.

⁽⁷⁾ Dz.U. L 291 z 24.10.1983, str. 9.

⁽⁸⁾ Dz.U. L 295 z 7.11.1985, str. 30.

⁽⁹⁾ Dz.U. L 231 z 14.9.1993, str. 34.

ZAŁĄCZNIK

I. IDENTYFIKOWANIE I OZNACZANIE KWASU BENZOESOWEGO, KWASU 4-HYDROKSYBENZOESOWEGO, KWASU SORBINOWEGO, KWASU SALICYLOWEGO I KWASU PROPIONOWEGO W PRODUKTACH KOSMETYCZNYCH

1. **Cel i zakres zastosowania**

Metoda jest stosowana do identyfikowania i oznaczania kwasu benzoesowego, kwasu 4-hydroksybenzoesowego, kwasu sorbinowego, kwasu salicylowego i kwasu propionowego w produktach kosmetycznych. Oddzielne procedury dotyczą identyfikowania tych środków konserwujących; a w części B podano procedury oznaczania kwasu propionowego i oznaczanie kwasu 4-hydroksybenzoesowego, kwasu salicylowego, kwasu sorbinowego i kwasu benzoesowego.

2. **Definicja**

Ilości kwasu benzoesowego, kwasu 4-hydroksybenzoesowego, kwasu salicylowego, kwasu sorbinowego i kwasu propionowego oznaczone tą metodą są wyrażone w procentach masowych wolnych kwasów.

A. IDENTYFIKOWANIE

1. **Zasada**

Ekstrakt otrzymany przez kwasową/zasadową ekstrakcję środków konserwujących analizuje się metodą chromatografii cienkowarstwowej (TLC) w ciągu jednego dnia po otrzymaniu pochodnej. Zależnie od wyników identyfikacja zostaje potwierdzona metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) lub w przypadku kwasu propionowego – metodą chromatografii gazowej (GC).

2. **Odczynniki**

2.1. Zasada ogólna

Wszystkie odczynniki muszą być czystości analitycznej. Używana woda musi być wodą destylowaną lub wodą co najmniej równoważnej czystości

2.2. Aceton

2.3. Eter dietylowy

2.4. Acetonitryl

2.5. Toluen

2.6. n-Heksan

2.7. Ciekła parafina

2.8. Kwas solny, 4M roztwór

2.9. Wodorotlenek potasu, 4M roztwór wodny

2.10. 2-hydrat chlorku wapnia, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2.11. Węglan litu, Li_2CO_3

2.12. 2-acetylo-7-bromonaftalen

2.13. Kwas 4-hydroksybenzoesowy

2.14. Kwas salicylowy

2.15. Kwas benzoesowy

2.16. Kwas sorbinowy

2.17. Kwas propionowy

- 2.18. Roztwory odniesienia
- Przygotować 0,1-procentowe (m/v) roztwory (100 mg/100 ml) wszystkich pięciu środków konserwujących (2.13 do 2.17) w eterze dietylowym
- 2.19. Odczynnik do otrzymywania pochodnych
- 0,5-procentowy (m/v) roztwór 2-acetylo-7-bromonaftalenu (2.12) w acetonitrylu (2.4) (50 mg/10 ml). Roztwór ten powinien być przygotowywany co tydzień i przechowywany w lodówce
- 2.20. Roztwór katalizatora
- 0,3-procentowy (m/v) roztwór węglanu litu (2.11) w wodzie (300 mg/100 ml). Roztwór powinien być świeżo przygotowany
- 2.21. Rozpuszczalnik rozwijający
- Toluen (2.5)/aceton (2.2) (20:0,5, v/v)
- 2.22. Ciekła parafina (2.7)/n-heksan (2.6) (1:2, v/v)

3. Aparatura

Zwykły sprzęt laboratoryjny

- 3.1. Łaźnia wodna, z możliwością utrzymania temperatury 60 °C
- 3.2. Komora do rozwijania chromatogramu
- 3.3. Źródło światła ultrafioletowego, 254 i 366 nm
- 3.4. Płytki cienkowarstwowe, Kieselgel 60, bez wskaźnika fluorescencji, 20 x 20 cm, grubość warstwy 0,25 mm ze strefą nanoszenia 2,5 x 20 cm (Merck 11845 lub równoważne)
- 3.5. Mikrostrzykawką, 10 µl
- 3.6. Mikrostrzykawką, 25 µl
- 3.7. Suszarka z możliwością utrzymania temperatury do 105 °C
- 3.8. 50-mililitrowe szklane rurki z gwintowanym korkiem
- 3.9. Bibuła filtracyjna, średnica 90 mm (Schleicher & Schull, Weissband nr 5892 lub równoważna)
- 3.10. Uniwersalny papierek wskaźnikowy pH = 1–11
- 3.11. 5-mililitrowe szklane fiołki na próbki
- 3.12. Rotacyjna wyparka cienkowarstwowa (Rotavapor lub równoważna)
- 3.13. Ogrzewana płytka

4. Procedura

- 4.1. Przygotowanie próbki

W 50-mililitrowej szklanej rurce z gwintowanym korkiem (3.8) odważyć około 1 g próbki. Dodać cztery krople 4M kwasu solnego (2.8) i 40 ml acetonu (2.2). Dla silnie alkalicznych wyrobów, takich jak mydło toaletowe, należy dodać 20 kropli 4M kwasu solnego. Papierkiem wskaźnikowym (3.10) sprawdzić, czy pH wynosi około 2. Zamknąć rurkę i wytrząsać energicznie w ciągu jednej minuty.

Jeśli konieczne jest ułatwienie ekstrakcji środka konserwującego do fazy acetonowej, należy ogrzewać łagodnie mieszaninę do około 60 °C do stopienia fazy ciekłej.

Schłodzić roztwór do temperatury pokojowej i przesączyć przez bibułę filtracyjną (3.9) do kolby stożkowej.

Przenieść 20 ml przesącza do 200-mililitrowej kolby stożkowej, dodać 20 ml wody i wymieszać. Dostosować odczyn mieszaniny do pH około 10 wodorotlenkiem potasu 4M (2.9), używając papierka wskaźnikowego (3.10) do oznaczenia pH.

Dodać 1 g chlorku wapnia (2.10) i energicznie wytrząsnąć. Przesączyć przez bibułę filtracyjną (3.9) do 250-mililitrowego lejka rozdzielającego zawierającego 75 ml eteru dietylowego (2.3) i wytrząsać energicznie w ciągu jednej minuty. Pozostawić do rozdzielenia i przenieść warstwę wodną do 250-mililitrowej kolby stożkowej. Odrzucić warstwę eterową. Używając papierka wskaźnikowego (3.10), doprowadzić odczyn do pH około 2 kwasem solnym 4M (2.8). Dodać 10 ml eteru dietylowego (2.3), zamknąć kolbę i wytrząsać energicznie w ciągu jednej minuty, pozostawić do rozdzielenia i przenieść warstwę eterową do rotacyjnej wyparki filmowej (3.12). Odrzucić warstwę wodną.

Odparować warstwę eterową prawie do sucha i ponownie rozpuścić pozostałość w 1 ml eteru dietylowego (2.3). Przenieść roztwór do fiołki na próbkę (3.11).

4.2. Chromatografia cienkowarstwowa

Dla wszystkich roztworów odniesienia i próbek analizowanych chromatograficznie nanieść strzykawką (3.5) po około 3 μ l węglanu litu (2.20) w równych odległościach na linii początkowej w strefie nanoszenia płytki do chromatografii cienkowarstwowej (3.4) i wysuszyć w strumieniu zimnego powietrza.

Umieścić płytkę cienkowarstwową na ogrzewanej płytce (3.13) podgrzanej do 40 °C dla otrzymania możliwie najmniejszych plam. Nanieść mikrostrzykawką (3.5) po 10 μ l wszystkich roztworów odniesienia (2.18) i roztworu próbki (4.1) na linii początkowej płytki, dokładnie w miejscach plam, w których naniesiono roztwór węglanu litu.

Nanieść ponownie po około 15 μ l odczynnika do otrzymywania pochodnych (2.19) (roztworu 2-acetylo-7-bromonaftalenu), dokładnie w miejscach plam, w których naniesiono były roztwory odniesienia i próbki oraz roztwór węglanu litu.

Ogrzewać płytkę do chromatografii cienkowarstwowej w suszarce (3.7) w 80 °C w ciągu 45 minut. Po schłodzeniu rozwijać płytkę w komorze (3.2), którą doprowadzono do stanu równowagi w ciągu 15 minut (bez wyłożenia wnętrza bibułą filtracyjną), używając rozpuszczalnika rozwijającego 2.21 (toluen/acetone), aż do osiągnięcia przez czoło rozpuszczalnika odległości 15 cm (może trwać około 80 minut).

Wysuszyć płytkę w strumieniu zimnego powietrza i oceniać otrzymane plamy w świetle UV (3.3). Dla wzmocnienia fluorescencji słabo widocznych plam można zamoczyć płytkę do chromatografii cienkowarstwowej w mieszaninie ciekła parafina/n-heksan (2.22).

5. Identyfikacja

Obliczyć współczynnik R_f dla wszystkich plam.

Porównać wartość R_f i zachowanie próbki pod wpływem promieniowania UV z wartościami otrzymanymi dla roztworów odniesienia.

Sformułować wstępny wniosek o obecności i zidentyfikowaniu środka konserwującego znajdującego się w próbce. Przeprowadzić analizę metodą HPLC opisaną w części B lub, jeśli podejrzewana jest obecność kwasu propionowego w próbce, analizę metodą GC opisaną w części C. Porównać czasy retencji z czasami otrzymanymi dla roztworów odniesienia.

Podsumować wyniki otrzymane metodami TLC i HPLC lub GC oraz potwierdzić ostateczną identyfikację środków konserwujących znajdujących się w próbce na podstawie otrzymanych wyników.

B. OZNACZANIE KWASU BENZOESOWEGO, KWASU 4-HYDROKSYBENZOESOWEGO, KWASU SORBINOWEGO I KWASU SALICYLOWEGO

1. Zasada

Próbkę po zakwaszeniu ekstrahuje się mieszaniną alkoholu etylowego i wody. Po przesączeniu środki konserwujące oznacza się metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).

2. Odczynniki

2.1. Wszystkie odczynniki muszą być czystości analitycznej i jeśli potrzeba - odpowiednie do HPLC. Używana woda musi być wodą destylowaną lub co najmniej równoważnej czystości

2.2. Alkohol etylowy, absolutny

2.3. Kwas 4-hydroksybenzoesowy

- 2.4. Kwas salicylowy
 - 2.5. Kwas benzoesowy
 - 2.6. Kwas sorbinowy
 - 2.7. Octan sodu ($\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$)
 - 2.8. Kwas octowy, $(\alpha)_{20}^4 = 1,05 \text{ g/ml}$
 - 2.9. Acetonitryl
 - 2.10. Kwas siarkowy (VI), 2M
 - 2.11. Wodorotlenek potasu, 0,2M roztwór wodny
 - 2.12. Kwas 2-metoksybenzoesowy
 - 2.13. Mieszanina alkohol etylowy/woda
Zmieszać dziewięć objętości alkoholu etylowego (2.2) i jedną objętość wody (2.1)
 - 2.14. Roztwór wewnętrznego standardu
Przygotować roztwór zawierający w przybliżeniu 1 g kwasu 2-metoksybenzoesowego (2.12) w 500 ml mieszaniny alkohol etylowy/woda (2.13)
 - 2.15. Faza ruchoma do HPLC
 - 2.15.1. Bufor octanowy: do 1 l wody dodać 6,35 g octanu sodu (2.7) i 20,0 ml kwasu octowego (2.8) i wymieszać
 - 2.15.2. Przygotować fazę ruchomą przez zmieszanie dziewięciu objętości buforu octanowego (2.15.1) i jednej objętości acetonitrylu (2.9)
 - 2.16. Bazowy roztwór środków konserwujących
Odważyć dokładnie około 0,05 g kwasu 4-hydroksybenzoesowego (2.3), 0,2 g kwasu salicylowego (2.4), 0,2 g kwasu benzoesowego (2.5) i 0,05 g kwasu sorbinowego (2.6) w 50-mililitrowej kolbie miarowej i uzupełnić objętość do kreski mieszaniną alkohol etylowy/woda (2.13). Przechowywać przyrządzony roztwór w lodówce. Roztwór jest trwały w ciągu jednego tygodnia
 - 2.17. Mianowane roztwory środków konserwujących
Do serii 20-mililitrowych kolb miarowych przenieść odpowiednio: 8,00, 4,00, 2,00, 1,00 i 0,50 ml bazowego roztworu środków konserwujących (2.16). Do wszystkich kolb dodać po 10,00 ml roztworu wewnętrznego standardu (2.14) i 0,5 ml 2M kwasu siarkowego (VI) (2.10). Uzupełnić objętość do kreski mieszaniną alkohol etylowy/woda (2.13). Roztwory te muszą być świeżo przygotowane
3. **Aparatura**
- Zwykły sprzęt laboratoryjny
- 3.1. Łaźnia wodna nastawiona na 60 °C
 - 3.2. Wysokosprawny chromatograf cieczowy z detektorem o zmiennej długości fali UV i pętlą 10 μl dla wprowadzenia próbki
 - 3.3. Kolumna analityczna
Stal kwasoodporna, długość 12,5 do 25 cm, średnica wewnętrzna 4,6 mm, z wypełnieniem Nucleosil 5C18 lub równoważnym
 - 3.4. Bibuła filtracyjna, średnica 90 mm, Schleicher and Schull, Weissband nr 5892 lub równoważna
 - 3.5. 50-mililitrowe rurki szklane z gwintowanym korkiem

- 3.6. 5-mililitrowe szklane fiołki na próbki
- 3.7. Kamyczki wrzenne, o wymiarach od 2 do 4 mm z karborundu (węgliku krzemu) lub równoważne

4. Procedura

4.1. Przygotowanie próbki

4.1.1. Przygotowanie próbki bez dodawania wewnętrznego standardu

Odważyć 1 g próbki w 50-mililitrowej szklanej rurce z gwintowanym korkiem (3.5). Dodać pipetą do rurki 1,00 ml 2M kwasu siarkowego (VI) (2.10) i 40 ml mieszaniny alkohol etylowy/woda (2.13). Dodać około 1 g kamyczków wrzennych (3.7), zamknąć rurkę i wytrząsać energicznie w ciągu co najmniej jednej minuty aż do otrzymania zawiesiny jednorodnej. Dla ułatwienia ekstrakcji środków konserwujących do fazy etanolowej należy umieścić rurkę w łaźni wodnej (3.1), utrzymywanej w 60 °C, na okres dokładnie pięciu minut.

Natychmiast schłodzić rurkę w strumieniu zimnej wody i przechować ekstrakt w 5 °C przez jedną godzinę. Przesączyć ekstrakt przez bibułę filtracyjną (3.4).

Przenieść około 2 ml ekstraktu do fiołki na próbkę (3.6). Przechowywać ekstrakt w 5 °C i wykonać oznaczenie metodą HPLC w ciągu 24 godzin od przygotowania.

4.1.2. Przygotowanie próbki z dodawaniem wewnętrznego standardu

Odważyć z dokładnością do trzeciego miejsca $1 \pm 0,1$ g (a gramów) próbki w 50-mililitrowej rurce szklanej z gwintowanym korkiem (3.5). Dodać pipetą 1,00 ml 2 M kwasu siarkowego (VI) (2.10) i 30 ml mieszaniny alkohol etylowy/woda (2.13). Dodać około 1 g kamyczków wrzennych (3.7) i 10,00 ml roztworu standardu wewnętrznego (2.14). Zamknąć rurkę i wytrząsać energicznie w ciągu co najmniej jednej minuty do otrzymania zawiesiny jednorodnej. Dla ułatwienia ekstrakcji środków konserwujących do fazy etanolowej należy umieścić rurkę w łaźni wodnej (3.1), utrzymywanej w 60 °C, na okres dokładnie pięciu minut.

Schłodzić natychmiast rurkę w strumieniu zimnej wody i przechowywać ekstrakt w 5 °C przez jedną godzinę.

Przesączyć ekstrakt przez bibułę filtracyjną (3.4). Przenieść około 2 ml przesączu do fiołki na próbkę (3.6). Przechowywać przesącz w 5 °C i wykonać oznaczenie metodą HPLC w ciągu 24 godzin od przygotowania.

4.2. Wysokosprawna chromatografia cieczowa

Faza ruchoma: acetonitryl/bufor octanowy (2.15).

Nastawić szybkość przepływu fazy ruchomej przez kolumnę na $2,0 \pm 0,5$ ml/minutę. Ustawić długość fali w detektorze na 240 nm.

4.2.1. Kalibrowanie

Wprowadzić strzykawką 10-mikrolitrowe porcje kolejno wszystkich roztworów mianowanych środków konserwujących (2.17) do chromatografu cieczowego (3.2). Dla wszystkich roztworów oznaczyć stosunki wysokości pików analizowanych środków konserwujących do wysokości pików wewnętrznego standardu otrzymane z chromatogramów. Sporządzić dla wszystkich środków konserwujących wykres zależności stosunku wysokości pików od stężenia.

Upewnić się, że podczas kalibrowania otrzymuje się liniową zależność dla mianowanych roztworów.

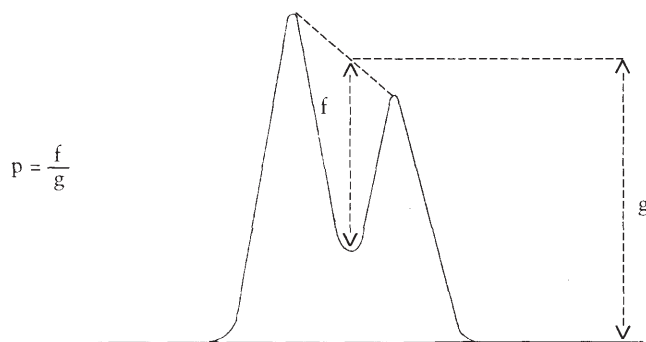
4.2.2. Oznaczanie

Do chromatografu cieczowego (3.2) wprowadzić strzykawką 10 µl ekstraktu próbki (4.1.1) i zarejestrować chromatogram. Wprowadzić strzykawką 10 µl roztworu środków konserwujących i zarejestrować chromatogram. Porównać otrzymane chromatogramy. Jeśli na chromatogramie ekstraktu próbki (4.1.1) nie występuje pik mający w przybliżeniu ten sam czas retencji co kwas 2-metoksybenzoowy (polecany jako standard wewnętrzny), wprowadzić strzykawką 10 µl ekstraktu próbki z dodanym standardem wewnętrznym (4.1.2) do chromatografu cieczowego i zarejestrować chromatogram.

Jeśli obserwuje się na chromatogramie ekstraktu próbki (4.1.1) pik przeszkadzający o takim samym czasie retencji jak kwas 2-metoksybenzoowy, należy wybrać inny odpowiedni standard wewnętrzny. (Jeśli jeden z badanych środków konserwujących nie występuje na chromatogramie, ten środek może być używany jako wewnętrzny standard).

Upewnić się, czy chromatogramy otrzymane dla roztworu wewnętrznego standardu i roztworu próbki odpowiadają następującym wymaganiom:

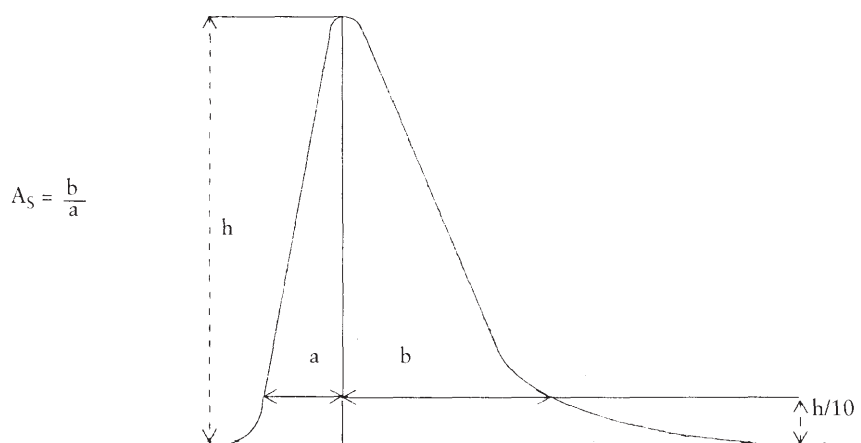
- Rozdział pików w najgorzej rozdzielonej parze wynosi najmniej 0,90 (definicje rozdziału pików przedstawiono na rysunku 1).



Rysunek 1. Rozdział pików

Jeśli nie uzyskano wymaganego rozdziału pików, powinno się zastosować kolumnę o większej zdolności rozdzielczej lub poprawić skład fazy ruchomej aż do spełnienia wymagań.

- Współczynnik asymetrii A_s wszystkich otrzymanych pików znajduje się w zakresie między 0,9 i 1,5. (Definicję współczynników asymetrii pików przedstawiono na rysunku 2). Do zarejestrowania chromatogramu w celu oznaczenia współczynnika asymetrii polecana jest szybkość przesuwu papieru w rejestratorze co najmniej 2 cm/minutę.



Rysunek 2. Współczynnik asymetrii pików

- Otrzymuje się stałą linię bazową.

5. Obliczenie

Do obliczenia stężenia kwasowych środków konserwujących w roztworze próbki należy stosować stosunki wysokości pików badanych środków konserwujących do wysokości pików kwasu 2-metoksybenzoesowego (wewnętrzny standard) i wykres kalibracyjny. Zawartość w próbce kwasu benzoowego, kwasu 4-hydroksybenzoesowego, kwasu sorbinowego lub kwasu salicylowego obliczyć w procentach masowych (x_i), stosując wzór:

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

w którym:

a = masa w gramach próbki pobranej do analizy (4.1.2),

b = stężenie środka konserwującego ($\mu\text{g/ml}$) w ekstrakcie próbki (4.1.2) otrzymane z wykresu kalibracyjnego.

6. Powtarzalność⁽¹⁾

Dla zawartości kwasu 4-hydroksybenzoesowego 0,40 % różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać absolutnej wartości 0,035 %.

Dla zawartości kwasu benzoowego 0,50 % różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać absolutnej wartości 0,050 %.

Dla zawartości kwasu salicylowego 0,50 % różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać absolutnej wartości 0,045 %.

Dla zawartości kwasu sorbinowego 0,60 % różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać absolutnej wartości 0,035 %.

7. Uwagi

7.1. Wyniki testu odchyień wykonane dla tej metody wykazały, że ilość kwasu siarkowego (VI) dodanego do ekstraktu kwasów z próbki jest krytyczna i ustalone ograniczone ilości próbki powinny być utrzymane w zalecanych granicach.

7.2. Jeśli potrzeba, można stosować odpowiednią kolumnę zabezpieczającą.

C. OZNACZANIE KWASU PROPIONOWEGO**1. Cel i zakres**

Metoda jest odpowiednia do oznaczania kwasu propionowego o maksymalnym stężeniu 2 % (m/m) w produktach kosmetycznych.

2. Definicja

Stężenie kwasu propionowego określone tą metodą jest wyrażone w procentach masowych (% m/m) wyrobu.

3. Zasada

Po ekstrakcji kwasu propionowego z wyrobu oznaczenie przeprowadza się metodą chromatografii gazowej z użyciem kwasu 2-metylopropionowego jako wewnętrznego standardu.

4. Odczynniki

Wszystkie odczynniki muszą być czystości analitycznej; musi być używana woda destylowana lub woda o równoważnej jakości.

4.1. Alkohol etylowy 96 % (v/v)

4.2. Kwas propionowy

4.3. Kwas 2-metylopropionowy

4.4. Kwas ortofosforowy (VI), 10 % (m/v)

4.5. Roztwór kwasu propionowego

Odważyć dokładnie około 1,00 g (p gramów) kwasu propionowego w 50-mililitrowej kolbie miarowej i uzupełnić objętość alkoholem etylowym (4.1)

4.6. Roztwór wewnętrznego standardu

Odważyć dokładnie około 1,00 (e gramów) kwasu 2-metylopropionowego w 50-mililitrowej kolbie miarowej i uzupełnić objętość alkoholem etylowym (4.1).

⁽¹⁾ ISO 5725.

5. Aparatura

- 5.1. Zwykły sprzęt laboratoryjny
- 5.2. Chromatograf gazowy z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym
- 5.3. Szklana rurka (20x150 mm) z korkiem gwintowanym
- 5.4. Łaźnia wodna o temperaturze 60 °C
- 5.5. 10-mililitrowa szklana strzykawka z membraną filtracyjną o średnicy porów 0,45 µm

6. Procedura**6.1. Przygotowanie próbki****6.1.1. Przygotowanie próbki bez wewnętrznego standardu**

W szklanej rurce (5.3) odważyć około 1 g próbki. Dodać 0,5 ml kwasu fosforowego (V) (4.4) i 9,5 ml alkoholu etylowego (4.1).

Zamknąć rurkę i energicznie wytrząsnąć. Jeśli to konieczne, umieścić rurkę w łaźni wodnej ogrzewanej do 60 °C (5.4) na okres pięciu minut w celu całkowitego rozpuszczenia fazy lipidowej. Schłodzić szybko pod strumieniem bieżącej wody. Przesączyć część roztworu przez filtr membranowy (5.5). Zanalizować chromatograficznie przesącz w ciągu tego samego dnia.

6.1.2. Przygotowanie próbki z wewnętrznym standardem

Odważyć z dokładnością do trzeciego miejsca $1 \pm 0,1$ g (a gramów) próbki do szklanej rurki (5.3). Dodać 0,5 ml kwasu ortofosforowego (V) (4.4), 0,50 ml roztworu wewnętrznego standardu (4.6) i 9 ml alkoholu etylowego (4.1).

Zamknąć rurkę i energicznie wytrząsnąć. Jeśli to konieczne, umieścić rurkę w łaźni wodnej ogrzewanej do 60 °C (5.4) na okres pięciu minut w celu rozpuszczenia fazy lipidowej. Schłodzić szybko pod strumieniem bieżącej wody. Przesączyć część roztworu przez filtr membranowy (5.5). Zanalizować chromatograficznie przesącz tego samego dnia.

6.2. Warunki chromatografii gazowej

Poleca się następujące warunki operacyjne.

Kolumna:

typ	stal kwasoodporna
długość	2 m
średnica	1/8 "
wypełnienie	10 % SPT TM 1000 (lub równoważne) + 1 % H ₃ PO ₄ na Chromosorbie WAW 100 do 120 mesh

Temperatury:

dozownik	200 °C
kolumna	120 °C
detektor	200 °C
Gaz nośny	azot
Szybkość przepływu	25 ml/min

6.3. Analiza chromatograficzna**6.3.1. Kalibrowanie**

Przenieść pipetą odpowiednio: 0,25, 0,50, 1,00, 2,00 i 4,00 ml roztworu kwasu propionowego (4.5) do serii 20-mililitrowych kolb miarowych. Do wszystkich kolb miarowych przenieść pipetą po 1,00 ml roztworu wewnętrznego standardu (4.6), uzupełnić objętość alkoholem etylowym (4.1) i wymieszać. Roztwory przygotowane w ten sposób zawierają e mg/ml kwasu 2-metylopropionowego jako wewnętrznego standardu (co oznacza 1 mg/ml jeśli e = 1000) i p/4, p/2, p; 2p; 4p mg/ml kwasu propionowego (co oznacza: 0,25, 0,50, 1,00, 2,00, 4,00 mg/ml jeśli p = 1000).

Wprowadzić po 1 µl wszystkich tych roztworów i sporządzić krzywą odwzorowania przez wykreślenie stosunku mas kwas propionowy/kwas metylopropionowy na osi odciętych i stosunek odpowiednich powierzchni pików na osi rzędnych.

Trzykrotnie wprowadzić na kolumnę kolejno wszystkie roztwory i obliczyć średni stosunek pików.

6.3.2. Oznaczenie

Wprowadzić strzykawką 1 µl przesącza próbki 6.1.1. Porównać chromatogram z chromatogramem jednego z roztworów mianowanych (6.3.1). Jeśli pik ma w przybliżeniu ten sam czas retencji jak kwas 2-metylopropionowy, należy zmienić wewnętrzny standard. Jeśli nie obserwuje się żadnego nakładania się pików, wprowadzić 1 µl przesącza próbki 6.1.2. i zmierzyć powierzchnie pików kwasu propionowego i pików wewnętrznego standardu.

Trzykrotnie wprowadzić na kolumnę kolejno wszystkie roztwory i obliczyć średni stosunek pików.

7. Obliczenia

7.1. Z krzywej kalibracyjnej otrzymanej w pkt 6.3.1. wyznaczyć stosunek mas (K) odpowiadający stosunkowi powierzchni pików obliczonej w pkt 6.3.2.

7.2. Z tak wyznaczonego stosunku mas obliczyć zawartość kwasu propionowego w próbce (X) jako procent masowy, stosując wzór:

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

w którym:

K = stosunek obliczony w pkt 7.1,

e = masa w gramach wewnętrznego standardu odważona w pkt 4.6,

a = masa w gramach próbki odważonej w pkt 6.1.2.

Zaokrąglić wyniki do jednego miejsca dziesiątego.

8. Powtarzalność ⁽¹⁾

Dla zawartości kwasu propionowego 2 % (m/m) różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać 0,12 %.

II. IDENTYFIKOWANIE I OZNACZENIE hydrochinonu, eteru monometylowego hydrochinonu, eteru monoetylowego hydrochinonu i eteru monobenzylowego hydrochinonu w produktach kosmetycznych

A. IDENTYFIKOWANIE

1. Cel i zakres

Metoda opisuje wykrywanie i identyfikowanie hydrochinonu, eteru monometylowego hydrochinonu, eteru monoetylowego hydrochinonu i eteru monobenzylowego hydrochinonu.

2. Zasada

Hydrochinon i jego etery identyfikuje się metodą chromatografii cienkowarstwowej (TLC).

3. Odczynniki

Wszystkie odczynniki muszą być czystości analitycznej

⁽¹⁾ ISO 5725.

- 3.1. Alkohol etylowy, 96 % (v/v)
- 3.2. Chloroform
- 3.3. Eter dietylowy
- 3.4. Rozpuszczalnik rozwijający:
chloroform/eter dietylowy 66:33 (v/v)
- 3.5. Amoniak, 25 % (m/m), $d_{4}^{20} = 0,91$ g/ml
- 3.6. Kwas askorbinowy
- 3.7. Hydrochinon
- 3.8. Monometylowy eter hydrochinonu
- 3.9. Monoetylowy eter hydrochinonu
- 3.10. Monobenzylowy eter hydrochinonu
- 3.11. Roztwory odniesienia

Poniższe roztwory odniesienia powinny być świeżo przygotowane i są trwałe jeden dzień.

- 3.11.1. Odważyć 0,05 g hydrochinonu (3.7) w 10-mililitrowej kalibrowanej probówce. Dodać 0,250 g kwasu askorbinowego (3.6) i 5 ml alkoholu etylowego (3.1). Dodawać amoniak (3.5) do uzyskania pH 10 i uzupełnić objętość do 10 ml alkoholem etylowym (3.1).
- 3.11.2. Odważyć 0,05 g eteru monometylowego hydrochinonu (3.9) w 10-mililitrowej kalibrowanej probówce. Dodać 0,250 g kwasu askorbinowego (3.6) i 5 ml alkoholu etylowego (3.1). Dodawać amoniak (3.5) do uzyskania pH 10 i uzupełnić objętość do 10 ml alkoholem etylowym (3.1).
- 3.11.3. Odważyć 0,05 g eteru monoetylowego hydrochinonu (3.8) w 10-mililitrowej kalibrowanej probówce. Dodać 0,250 g kwasu askorbinowego (3.6) i 5 ml alkoholu etylowego (3.1). Dodawać amoniak (3.5) do uzyskania pH 10 i uzupełnić objętość do 10 ml alkoholem etylowym (3.1).
- 3.11.4. Odważyć 0,05 g eteru monobenzylowego hydrochinonu (3.10) w 10-mililitrowej kalibrowanej probówce. Dodać 0,250 g kwasu askorbinowego (3.6) i 5 ml alkoholu etylowego (3.1). Dodawać amoniak (3.5) do uzyskania pH 10 i uzupełnić objętość do 10 ml alkoholem etylowym (3.1).
- 3.12. Azotan (V) srebra
- 3.13. Kwas dodekamolibdenianofosforowy (V)
- 3.14. 6'-hydrat heksacyjanożelazianu (III) potasu
- 3.15. 6'-hydrat chlorku żelaza (III)
- 3.16. Odczynniki wywołujące
- 3.16.1. Do 5 % (m/v) wodnego roztworu azotanu srebra (3.12) dodawać amoniak (3.5), aż powstający osad się rozpuści

Ostrzeżenie:

Roztwór staje się nietrwały i grozi wybuchem przy przechowywaniu i powinien być odrzucony po użyciu.

- 3.16.2. 10 % (m/v) roztwór kwasu dodekamolibdenianofosforowego (V) (3.13) w alkoholu etylowym (3.1).

- 3.16.3. Przygotować 1-procentowy (m/v) wodny roztwór heksacyjanożelazianu (III) potasu (3.14) i 2-procentowy (m/v) wodny roztwór chlorku żelaza (III) (3.15). Wymieszać równe części obu roztworów bezpośrednio przed użyciem.

4. Aparatura

Zwykły sprzęt laboratoryjny

- 4.1. Typowy sprzęt do chromatografii cienkowarstwowej (TLC)
- 4.2. Płytki TLC, przygotowane fabrycznie: żel krzemionkowy GHR/UV₂₅₄; 20 x 20 cm (Machery, Nagel lub równoważne). Grubość warstwy 0,25 mm
- 4.3. Łaźnia ultradźwiękowa
- 4.4. Wirówka
- 4.5. Lampa UV, długość fali 254 nm

5. Procedura

- 5.1. Przygotowanie próbki

Odważyć 3,0 g próbki w 10-mililitrowej kalibrowanej rurce. Dodać 0,250 g kwasu askorbinowego (3.6) i 5 ml alkoholu etylowego (3.1). Doprowadzić odczyn roztworu do pH 10 dodając amoniak (3.5). Uzupełnić objętość do 10 ml alkoholem etylowym (3.1). Zamknąć rurkę korkiem i homogenizować roztwór w łaźni ultradźwiękowej w ciągu 10 minut. Przesączyć przez bibułę filtracyjną lub odwirować przy 3000 obrotach/-minutę.

- 5.2. TLC

- 5.2.1. Wysycić komorę chromatograficzną rozpuszczalnikiem rozwijającym (3.4).

- 5.2.2. Nanieść na płytkę po 2 μ l roztworów odniesienia (3.11) i 2 μ l roztworu próbki (5.1.). Chromatogram rozwijać w ciemności w temperaturze otoczenia aż do osiągnięcia przez czoło rozpuszczalnika wysokości 15 cm od linii początkowej.

- 5.2.3. Wyjąć płytkę i wysuszyć w temperaturze pokojowej.

- 5.3. Wykrywanie

- 5.3.1. Obserwować płytkę w świetle UV przy 254 nm i zaznaczyć położenie plam.

- 5.3.2. Spryskać płytkę:

- odczynnikiem azotanu (V) srebra (3.16.1), lub
- odczynnikiem kwasu dodekamolibdenianofosforowego (V) (3.16.2); ogrzewać do około 120 °C, lub
- roztworem heksacyjanożelazianu (III) potasu i roztworu chlorku żelaza (III) (3.16.3).

6. Identyfikowanie

Obliczyć wartość R_f dla wszystkich plam.

Porównać plamy otrzymane dla roztworu próbki z plamami otrzymanymi dla roztworów odniesienia pod względem ich wartości R_f kolorów plam w świetle UV i kolorów plam po ich wywołaniu odczynnikiem do spryskiwania.

Wykonać analizę metodą HPLC opisaną w następnej części B i porównać czasy retencji otrzymane dla pików (pików) próbki z czasami dla pików roztworów odniesienia.

Wykorzystać wyniki z analizy metodą TLC i HPLC w celu zidentyfikowania obecności hydrochinonu i/lub jego eterów.

7. Uwagi

W opisanych warunkach otrzymano następujące wartości R_f :

hydrochinon	0,32
eter monometylowy hydrochinonu	0,53
eter monoetylowy hydrochinonu	0,55
eter monobenzylowy hydrochinonu	0,58

B. OZNACZANIE

1. Cel i zakres

Przedstawiono szczegółowo procedurę oznaczania hydrochinonu, eteru monometylowego hydrochinonu, eteru monoetylowego hydrochinonu i eteru monobenzylowego hydrochinonu w produktach kosmetycznych do rozjaśniania skóry.

2. Zasada

Próbkę ekstrahuje się mieszaniną woda/metanol podczas łagodnego ogrzewania w celu stopienia wszystkich ciekłych materiałów. Oznaczanie analizowanych substancji w powstałym roztworze wykonuje się metodą chromatografii cieczowej z zastosowaniem fazy odwróconej z detekcją w zakresie promieniowania UV.

3. Odczynniki

- 3.1. Wszystkie odczynniki powinny być jakości analitycznej. Stosowana woda musi być wodą destylowaną lub wodą o co najmniej równoważnej czystości.
- 3.2. Metanol
- 3.3. Hydrochinon
- 3.4. Eter monometylowy hydrochinonu
- 3.5. Eter monoetylowy hydrochinonu
- 3.6. Eter monobenzylowy hydrochinonu (monobenzon)
- 3.7. Tetrahydrofuran o jakości odpowiedniej dla HPLC
- 3.8. Mieszanina woda/metanol 1:1 (v/v). Zmieszać jedną objętość wody z jedną objętością metanolu (3.2)
- 3.9. Faza ruchoma: mieszanina tetrahydrofuran/woda 45:55 (v/v). Zmieszać 45 objętości tetrahydrofuranu (3.7) i 55 objętości wody
- 3.10. Roztwór odniesienia

Odważyć 0,06 g hydrochinonu (3.3), 0,08 g eteru monometylowego hydrochinonu (3.4), 0,10 g eteru monoetylowego hydrochinonu (3.5) i 0,12 g eteru monobenzylowego hydrochinonu (3.6) w 50-mililitrowej kolbie miarowej. Rozpuścić i uzupełnić objętość metanolem (3.2). Przygotować roztwór odniesienia przez rozcieńczenie 10,00 ml tego roztworu do 50 ml mieszaniną woda/metanol (3.8). Roztwory te muszą być świeżo przygotowane.

4. Aparatura

Zwykły sprzęt laboratoryjny i:

- 4.1. Łaźnia wodna, z możliwością utrzymania temperatury 60 °C
- 4.2. Wysokosprawny chromatograf cieczowy z detektorem UV o zmiennej długości fali i 10 µl pętlą do wprowadzania próbki
- 4.3. Kolumna analityczna:

Kolumna ze stali kwasoodpornej, długość 250 mm, średnica wewnętrzna 4,6 mm z wypełnieniem fenylowym Zorbax (chemicznie związany fenyloetylosilan osadzony na nośniku Zorbax SIL, na końcu osłonięty trimetylochlorosilanem), rozmiar cząsteczek 6 µm, lub równoważnym. Nie należy używać kolumny zabezpieczającej (ochronnej), z wyjątkiem ochrony fenylovej lub równoważnej

- 4.4. Krążki bibuły filtracyjnej o średnicy 90 mm (Schleicher and Schull, Weissband nr 5892 lub równoważna)

5. Procedura

5.1. Przygotowanie próbki

Odważyć z dokładnością do trzeciego miejsca $1 \pm 0,1$ g (a gramów) próbki w 50-mililitrowej kolbie miarowej. Dyspergować próbkę w 25 ml mieszaniny woda/metanol (3.8). Zamknąć kolbę i wytrząsać energicznie do uzyskania jednorodnej zawiesiny. Wytrząsać w ciągu co najmniej jednej minuty. Umieścić kolbę w łaźni wodnej (4.1) utrzymywanej w temperaturze 60 °C w celu poprawienia ekstrakcji. Schłodzić kolbę i uzupełnić objętość mieszaniną woda/metanol (3.8). Przesączyć ekstrakt, używając krążków bibuły filtracyjnej (4.4). Wykonać oznaczenie metodą HPLC w ciągu 24 godzin od przygotowania ekstraktu.

5.2. Wysokosprawna chromatografia cieczowa

- 5.2.1. Uregulować szybkość przepływu fazy ruchomej (3.9) na 1,0 ml/min i nastawić długość fali detektora na 295 nm.

- 5.2.2. Wprowadzić strzykawką 10 µl roztworu próbki otrzymanego jak opisano w ppkt 5.1 i zarejestrować chromatogram. Zmierzyć powierzchnie pików. Przeprowadzić kalibrowanie według opisu w ppkt 5.2.3. Porównać chromatogramy otrzymane dla roztworów próbki i roztworu mianowanego. Powierzchnie pików i współczynniki kalibracyjne RF obliczone w ppkt 5.2.3 zastosować do obliczenia stężeń analizowanych substancji w roztworze próbki.

5.2.3. Kalibrowanie

Wprowadzić strzykawką 10 µl roztworu odniesienia (3.10) i zarejestrować chromatogram. Wprowadzać próbkę kilkakrotnie aż do otrzymania stałej powierzchni pików.

Oznaczyć współczynnik kalibracji RF:

$$RF_i = \frac{P_i}{C_i}$$

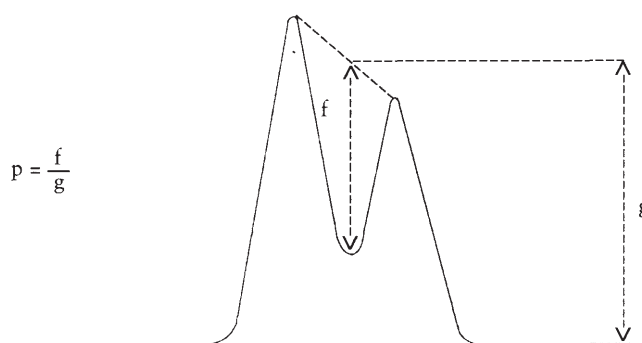
w którym

P_i = powierzchnia pików dla hydrochinonu, eteru monometylowego hydrochinonu, eteru monoetylowego hydrochinonu lub eteru monobenzylowego hydrochinonu oraz

C_i = stężenie (g/50 ml) w roztworze odniesienia (3.10) hydrochinonu, eteru monometylowego hydrochinonu, eteru monoetylowego hydrochinonu lub eteru monobenzylowego hydrochinonu.

Należy upewnić się, czy chromatogramy otrzymane dla roztworu mianowanego i roztworu próbki odpowiadają następującym wymaganiom:

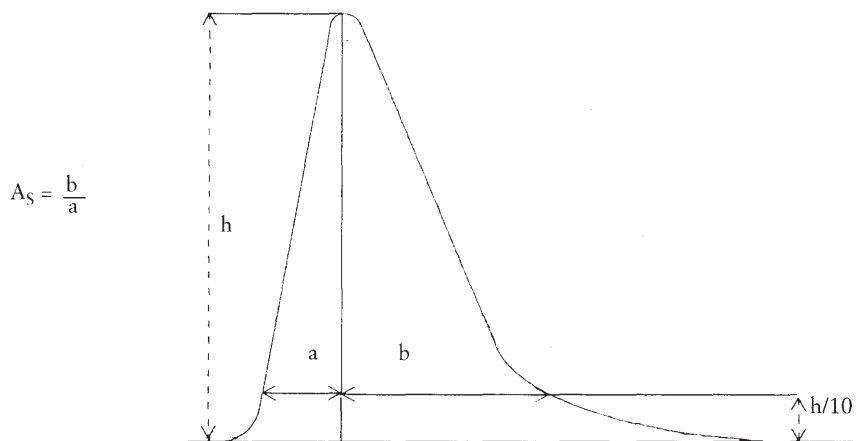
- Rozdział pików w najgorzej rozdzielonej parze powinien wynosić co najmniej 0,90. (Definicję rozdziału pików przedstawiono na rysunku 1).



Rysunek 1. Rozdział pików

Jeśli nie uzyskano wymaganego rozdziału pików, należy zastosować kolumnę o większej rozdzielczości lub poprawiać skład fazy ruchomej aż do spełnienia wymagań).

- Współczynnik asymetrii A_s wszystkich otrzymanych pików powinien znajdować się w zakresie od 0,9 do 1,5. (Definicję współczynnika asymetrii pików przedstawiono na rysunku 2). Do zarejestrowania chromatogramu w celu oznaczenia współczynnika asymetrii polecana jest szybkość przesuwu papieru co najmniej 2 cm/min.



Rysunek 2. Współczynnik asymetrii pików

- otrzymuje się stałą linię podstawową.

6. Obliczenie

Powierzchnie pików analizowanych substancji stosuje się do obliczenia stężenia (stężeń) tej (tych) substancji w próbce. Obliczyć stężenie analizowanej substancji w próbce w procentach masowych (x_i) stosując wzór:

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

w którym:

- a = masa analizowanej próbki w gramach,
- b. = powierzchnia pików substancji analizowanej „i” w próbce.

7. Powtarzalność ⁽¹⁾

- 7.1. Dla zawartości hydrochinonu 2,0 % różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać absolutnej wartości 0,13 %.
- 7.2. Dla zawartości eteru monometylowego hydrochinonu 1,0 % różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać absolutnej wartości 0,1 %.
- 7.3. Dla zawartości eteru monoetylowego hydrochinonu 1,0 % różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać absolutnej wartości 0,11 %.
- 7.4. Dla zawartości eteru monobenzylowego hydrochinonu 1,0 % różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać absolutnej wartości 0,11 %.

8. Odtwarzalność ⁽¹⁾

- 8.1. Dla zawartości hydrochinonu 2,0 % różnica między wynikami dwóch oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki w różnych warunkach (inne laboratoria, inni wykonawcy, inna aparatura i/lub inny czas) nie powinna przekraczać absolutnej wartości 0,37 %.

⁽¹⁾ ISO 5725.

- 8.2. Dla zawartości eteru monometylowego hydrochinonu 1,0 % różnica między wynikami dwóch oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki w różnych warunkach (inne laboratoria, inni wykonawcy, inna aparatura i/lub inny czas) nie powinna przekraczać absolutnej wartości 0,21 %.
- 8.3. Dla zawartości eteru monoetylowego hydrochinonu 1,0 % różnica między wynikami dwóch oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki w różnych warunkach (inne laboratoria, inni wykonawcy, inna aparatura i/lub inny czas) nie powinna przekraczać absolutnej wartości 0,19 %.
- 8.4. Dla zawartości eteru monobenzylowego hydrochinonu 1,0 % różnica między wynikami dwóch oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki w różnych warunkach (inne laboratoria, inni wykonawcy, inna aparatura i/lub inny czas) nie powinna przekraczać absolutnej wartości 0,11 %.

9. **Uwagi**

- 9.1. Jeśli stwierdzono zawartość hydrochinonu znacznie ponad 2 %, a wymagana jest dokładna ocena zawartości, ekstrakt próbki (5.1) powinno się rozcieńczyć do stężenia podobnego do tego, jakie można by otrzymać z próbki zawierającej 2 % hydrochinonu i powtórzyć oznaczenie.

(Dla wysokich stężeń hydrochinonu w niektórych przyrządach absorbancja może znaleźć się poza liniowym zakresem wskazań detektora).

9.2. **Zakłócenia**

Opisana powyżej metoda pozwala na oznaczenie hydrochinonu i jego eterów w jednym izokratycznym przebiegu. Zastosowanie kolumny fenylowej zapewnia wystarczającą zdolność zatrzymywania hydrochinonu, czego nie można zagwarantować przy zastosowaniu kolumny C18 z użyciem podanej fazy ruchomej.

Jednakże metoda ta jest podatna na zakłócenia przez szereg parabenów (estrów kwasu 4-hydroksybenzoesowego). W takich przypadkach należy powtórzyć oznaczenie z różnymi układami faza ruchoma/faza stacjonarna. Odpowiednie metody można znaleźć w przypisach 1 i 2:

Kolumna: Zorbax ODS, 4,6 mm x 25 mm lub równoważna:

temperatura: 36 °C,

szybkość przepływu: 1,5 ml/min

faza ruchoma:

dla hydrochinonu: metanol/woda 5/95 (v/v)

dla eteru monometylowego hydrochinonu: metanol/woda 30/70 (v/v)

dla eteru monobenzylowego hydrochinonu: metanol/woda 80/20 (v/v) ⁽¹⁾,

Kolumna: Spherisorb S5-ODS lub równoważna:

faza ruchoma: woda/metanol 90/10 (v/v),

szybkość przepływu: 1,5 ml/min.

Te warunki są odpowiednie dla hydrochinonu ⁽²⁾.

⁽¹⁾ M. Herpol-Boiremans, 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, I. Rix, Determination of hydroquinone in skin toning creams, Analyst (1986), 111, str. 129.