

31995L0032

28.7.1995

JURNALUL OFICIAL AL COMUNITĂȚILOR EUROPENE

L 178/20

A ȘASEA DIRECTIVĂ 95/32/CE A COMISIEI
din 7 iulie 1995
privind metodele de analiză necesare pentru controlul compoziției produselor cosmetice
(Text cu relevanță pentru SEE)

COMISIA COMUNITĂȚILOR EUROPENE,

având în vedere Tratatul de instituire a Comunității Economice Europene,

având în vedere Directiva 76/768/CEE a Consiliului din 27 iulie 1976 privind apropierea legislației statelor membre cu privire la produsele cosmetice ⁽¹⁾, modificată ultima dată de Directiva 94/32/CE ⁽²⁾, în special articolul 8 alineatul (1),

întrucât Directiva 76/768/CEE prevede testarea oficială a produselor cosmetice cu scopul constatării îndeplinirii condițiilor stabilite de dispozițiile Comunității privind compoziția produselor cosmetice;

întrucât toate metodele de analiză necesare trebuie să fie stabilite cât mai repede posibil; întrucât anumite metode au fost deja adoptate de Directiva 80/1335/CEE a Comisiei ⁽³⁾, modificată de Directiva 87/143/EEC ⁽⁴⁾, 82/434/CEE ⁽⁵⁾, modificată de Directiva 90/207/CEE ⁽⁶⁾ și de Directivele 83/514/CEE ⁽⁷⁾, 85/490/CEE ⁽⁸⁾ și 93/73/CEE ⁽⁹⁾ ale Comisiei;

întrucât identificarea și determinarea acidului benzoic, acidului 4-hidroxibenzoic, acidului sorbic, acidului salicilic și acidului propionic în produsele cosmetice și identificarea și determinarea hidrochinonei, monometileterului de hidrochinonă, monoetileterului de hidrochinonă și monobenzileterului de hidrochinonă în produsele cosmetice constituie a șasea etapă;

întrucât măsurile prevăzute de prezenta directivă sunt în conformitate cu avizul Comitetului privind adaptarea Directivei 76/768/CEE la progresul tehnic,

ADOPTĂ PREZENTA DIRECTIVĂ:

Articolul 1

Statele membre adoptă toate măsurile necesare pentru a asigura ca în timpul testării oficiale a produselor cosmetice:

- identificarea și determinarea acidului benzoic, a acidului 4-hidroxibenzoic, a acidului sorbic, a acidului salicilic și a acidului propionic,
 - identificarea și determinarea hidrochinonei, monometileterului de hidrochinonă, monoetileterului de hidrochinonă și monobenzileterului de hidrochinonă
- să fie efectuate în conformitate cu metodele descrise în anexă.

Articolul 2

(1) Statele membre pun în aplicare actele cu putere de lege și actele administrative pentru a se conforma prezentei directive până la 30 septembrie 1996. Statele membre informează de îndată Comisia cu privire la aceasta.

Atunci când statele membre adoptă aceste acte, acestea cuprind o trimitere la prezenta directivă sau sunt însoțite de o asemenea trimitere la data publicării lor oficiale. Statele membre stabilesc modalitatea de efectuare a acestei trimiteri.

(2) Comisiei îi sunt comunicate de către statele membre textele dispozițiilor de drept intern pe care le adoptă în domeniul reglementat de prezenta directivă.

Articolul 3

Prezenta directivă intră în vigoare în a douăzecea zi de la data publicării în *Jurnalul Oficial al Comunităților Europene*.

Articolul 4

Prezenta directivă se adresează statelor membre.

Adoptată la Bruxelles, 7 iulie 1995.

Pentru Comisie

Emma BONINO

Membru al Comisiei

⁽¹⁾ JO L 262, 27.9.1976, p. 169.

⁽²⁾ JO L 181, 15.7.1994, p. 31.

⁽³⁾ JO L 383, 31.12.1980, p. 27.

⁽⁴⁾ JO L 57, 27.2.1987, p. 56.

⁽⁵⁾ JO L 185, 30.6.1982, p. 1.

⁽⁶⁾ JO L 108, 28.4.1990, p. 92.

⁽⁷⁾ JO L 291, 24.10.1983, p. 9.

⁽⁸⁾ JO L 295, 7.11.1985, p. 30.

⁽⁹⁾ JO L 231, 14.9.1993, p. 34.

ANEXĂ

1. IDENTIFICAREA ȘI DETERMINAREA ACIDULUI BENZOIC, A ACIDULUI 4-HIDROXIBENZOIC, A ACIDULUI SORBIC, A ACIDULUI SALICILIC ȘI A ACIDULUI PROPIONIC ÎN PRODUSELE COSMETICE**1. Sfera și domeniul de aplicare**

Prezenta metodă este aplicabilă pentru identificarea și determinarea acidului benzoic, a acidului 4-hidroxi benzoic, a acidului sorbic, a acidului salicilic și a acidului propionic în produsele cosmetice. Proceduri separate descriu identificarea acestor conservanți, determinarea acidului propionic și determinarea acidului 4-hidroxi benzoic, a acidului salicilic, a acidului sorbic și a acidului benzoic.

2. Definiție

Cantitățile de acid benzoic, acid 4-hidroxi benzoic, acid sorbic, acid salicilic și acid propionic determinate prin această metodă sunt exprimate ca procente masice de acizi liberi.

A. IDENTIFICARE**1. Principiu**

După extracția acid/bază a conservanților, extractul este analizat prin cromatografie în strat subțire (TLC) folosindu-se derivatizarea. În funcție de rezultate, identificarea este confirmată prin cromatografie de lichid de înaltă performanță (HPLC) sau, în cazul acidului propionic, prin cromatografie de gaz (GC).

2. Reactivi**2.1. Generalități**

Toți reactivii trebuie să fie de puritate analitică. Apa folosită trebuie să fie apă distilată sau apă de puritate cel puțin echivalentă.

2.2. Acetonă**2.3. Dietileter****2.4. Acetonitril****2.5. Toluen****2.6. n-Hexan****2.7. Parafină lichidă****2.8. Acid clorhidric, 4 m****2.9. Soluție de hidroxid de potasiu, 4 m****2.10. Clorură de calciu, CaCl₂·2H₂O****2.11. Carbonat de litiu, Li₂CO₃****2.12. 2-bromo-2'-acetonaftonă****2.13. Acid 4-hidroxi benzoic****2.14. Acid salicilic****2.15. Acid benzoic****2.16. Acid sorbic****2.17. Acid propionic**

- 2.18. Soluții de referință
Se prepară soluții 0,1 % (m/v) (100mg/100ml) în dietilele din fiecare dintre cei cinci conservanți (2.13-2.17).
- 2.19. Reactiv de derivatizare
Soluție de 2-bromo-2'-acetonafonă (2.12) 0,5 % (m/v) în acetonitril (2.4) (50mg/10ml). Această soluție trebuie preparată săptămânal și depozitată într-un frigider.
- 2.20. Soluție de catalizator
Soluție de carbonat de litiu (2.11) 0,3 % (m/v) în apă (300mg/100ml). Această soluție trebuie să fie proaspăt preparată.
- 2.21. Solvent de dezvoltare
Toluen (2.5)/acetonă (2.2) (20:0,5, v/v)
- 2.22. Parafină lichidă (2.7)/n-hexan (2.6) (1:2, v/v)
3. **Aparatură**
Echipament de laborator obișnuit
- 3.1. Baie de apă, capabilă să mențină temperatura la 60 °C
- 3.2. Tanc de dezvoltare
- 3.3. Sursă de lumină UV, 254 și 366 nm
- 3.4. Plăci pentru cromatografie în strat subțire, Kieselgel 60, fără indicator de fluorescență, 20 x 20 cm, grosimea stratului 0,25 mm, cu zonă concentratoare 2,5 x 20 cm (Merck 11845 sau echivalent).
- 3.5. Microseringă de 10 μl
- 3.6. Microseringă de 25 μl
- 3.7. Cuptor, capabil să mențină temperaturi până la 105 °C
- 3.8. Eprubete de sticlă de 50 ml, cu dop filetat
- 3.9. Hârtie de filtru, diametru 90 mm, Schleicher & Schull, Weissband nr. 5892 sau echivalent
- 3.10. Hârtie indicatoare de pH universală, pH 1-11
- 3.11. Fiole pentru probe, din sticlă, 5 ml
- 3.12. Evaporator cu film rotativ (Rotavapor sau echivalent)
- 3.13. Plită încălzită
4. **Procedură**
- 4.1. Pregătirea probei
Într-o eprubetă de sticlă de 50 ml cu dop filetat se cântărește aproximativ 1 g de probă (3.8). Se adaugă patru picături de acid clorhidric 4 m (2.8) și 40 ml acetonă (2.2). Pentru produși puternic bazici, cum ar fi săpunul de toaletă, trebuie adăugate 20 de picături de acid clorhidric 4 m (2.8). Se verifică valoarea pH-ului, care trebuie să fie aproximativ doi, folosind hârtie indicatoare (3.10). Se închide eprubeta și se agită puternic timp de un minut.

 Dacă este necesară facilitarea extracției conservanților în faza de acetonă, se încălzește ușor amestecul la aproximativ 60 °C pentru a topi faza lichidă.

 Se răcește soluția la temperatura camerei și se filtrează prin hârtie de filtru (3.9) într-un pahar conic.

Se transferă 20 ml de filtrat într-un pahar conic de 200 ml, se adaugă 20 ml apă și se amestecă. Se reglează pH-ul amestecului la aproximativ 10 cu hidroxid de potasiu 4 m (2.9), folosind hârtie indicatoare (3.10) pentru măsurarea acestuia.

Se adaugă 1 g clorură de calciu (2.10) și se agită puternic. Se filtrează prin hârtie de filtru (3.9) într-o pâlnie de separare de 250 ml conținând 75 ml dietileter (2.3) și se agită puternic timp de un minut. Se lasă să se separe și se îndepărtează stratul apos într-un pahar conic de 250 ml. Se îndepărtează stratul de eter. Folosind hârtie indicatoare (3.10), se reglează pH-ul soluției apoase la aproximativ doi cu ajutorul acidului clorhidric 4 m (2.8). Se adaugă 10 ml dietileter (2.3), se astupă paharul și se agită puternic conținutul timp de un minut. Se lasă să se separe și se transferă stratul eteric într-un evaporator cu film rotativ (3.12). Se îndepărtează stratul apos.

Se evaporă stratul de eter până aproape de uscare și se dizolvă din nou reziduul într-un 1 ml dietileter (2.3). Se transferă soluția într-o fiolă de probă (3.11).

4.2. Cromatografie în strat subțire

Pentru fiecare dintre soluțiile de referință și probele ce vor fi cromatografiate, se pun cu o seringă (3.5) aproximativ 3 μ l soluție de carbonat de litiu (2.2), la distanțe egale față de linia de start, în zona de concentrare a plăcii TLC (3.4) și se usucă într-un curent de aer rece.

Se transferă placa pentru TLC pe o plită încălzită (3.13) la 40 °C, pentru a menține petele cât mai mici cu putință. Cu o microseringă (3.5) se pun 10 μ l din fiecare dintre soluțiile de referință (2.18) și soluția probă (4.1) pe linia de start a plăcii, exact pe punctele unde a fost aplicată soluția de carbonat de litiu.

La sfârșit se pun aproximativ 15 μ l de reactiv de derivatizare (2.19) (soluție 2-bromo-2'-acetonafonă), din nou exact pe punctele unde au fost aplicate soluțiile de referință/probă și soluția de carbonat de litiu.

Se încălzește placa pentru TLC timp de 45 de minute într-un cuptor la 80 °C. După răcire se dezvoltă placa într-un tanc (3.2) care s-a echilibrat timp de 15 minute (fără hârtie de filtru), utilizându-se solvent de dezvoltare 2.21 (toluen/acetona) până ce frontul de solvent a migrat 15 cm (aceasta durează aproximativ 80 de minute).

Se usucă placa într-un curent de aer rece și se examinează petele obținute în lumină UV (3.3). Pentru a îmbunătăți fluorescența petelor slabe, placa pentru TLC poate fi cufundată în amestec parafină lichidă/n-hexan (2.22).

5. Identificare

Se calculează R_f pentru fiecare pată.

Se compară R_f și comportarea la radiație UV obținută pentru probă cu cea obținută pentru soluțiile de referință.

Se trage o concluzie preliminară privind prezența și identitatea conservanților prezenți. Se realizează procedura prin cromatografie de lichid de înaltă performanță (HPLC) descrisă în secțiunea B sau, când apare ca prezent acidul propionic, procedura prin cromatografie de gaz (GC), descrisă în secțiunea C. Se compară timpii de retenție obținuți cu cei ai soluțiilor de referință.

Se combină rezultatele din TLC și HPLC sau CG și se face identificarea finală a conservanților prezenți în probă pe baza rezultatelor combinate.

B. DETERMINAREA ACIDULUI BENZOIC, A ACIDULUI 4-HIDROXIBENZOIC, A ACIDULUI SORBIC ȘI A ACIDULUI SALICILIC

1. Principiu

După acidificare, proba este extrasă cu un amestec de etanol și apă. După filtrare, conservanții sunt determinați prin cromatografie de lichid de înaltă performanță (HPLC).

2. Reactivi

2.1. Toți reactivii trebuie să fie de puritate analitică și adecvați pentru HPLC, când este cazul. Apa folosită trebuie să fie apă distilată sau apă de cel puțin puritate echivalentă.

2.2. Etanol, absolut

2.3. Acid 4-hidroxibenzoic

- 2.4. Acid salicilic
- 2.5. Acid benzoic
- 2.6. Acid sorbic
- 2.7. Acetat de sodiu ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)
- 2.8. Acid acetic, $(\alpha)_4^{20} = 1,05 \text{ g/ml}$
- 2.9. Acetonitril
- 2.10. Acid sulfuric, 2 m
- 2.11. Soluție de hidroxid de potasiu, 0,2 m
- 2.12. Acid 2-metoxibenzoic
- 2.13. Amestec etanol/apă
Se amestecă nouă volume de etanol (2.2) și un volum de apă (2.1)
- 2.14. Soluție de standard intern
Se prepară o soluție conținând aproximativ 1 g acid 2 metoxibenzoic (2.12) în 500 ml amestec etanol/apă (2.13).
- 2.15. Faza mobilă pentru HPLC
 - 2.15.1. Tampon acetat: la 1 litru de apă se adaugă 6,35 g acetat de sodiu (2.7) și 20,0 ml acid acetic (2.8) și se amestecă.
 - 2.15.2. Se prepară faza mobilă prin amestecarea a nouă volume de tampon acetat (2.15.1) și un volum de acetonitril (2.9).
- 2.16. Soluție stoc de conservant
Într-un balon cotate de 50 ml se cântăresc cu precizie aproximativ 0,05 g acid 4-hidroxibenzoic (2.3), 0,2 g acid salicilic (2.4), 0,2 g acid benzoic (2.5) și 0,05 g acid sorbic și se aduce la semn cu amestec etanol/apă (2.13). Se depozitează această soluție într-un frigider. Soluția este stabilă timp de o săptămână.
- 2.17. Soluții standard de conservanți
Într-o serie de baloane cotate de 20 ml se transferă 8,00, 4,00, 2,00, 1,00 și, respectiv, 0,05 ml soluție stoc (2.16). În fiecare balon cotate se adaugă 10,00 ml soluție de standard intern (2.14) și 0,5 ml acid sulfuric 2 m (2.10). Se aduce la semn cu amestec etanol/apă (2.13). Aceste soluții trebuie să fie proaspăt preparate.
3. **Aparatură**
Echipament de laborator obișnuit și:
 - 3.1. Baie de apă, reglată la 60 °C
 - 3.2. Cromatograf de lichid de înaltă performanță cu detector UV cu lungime de undă variabilă și ciclu de injecție de 10 μl
 - 3.3. Coloană analitică
Oțel inoxidabil, lungime 12,5-25 cm, diametru interior 4,6 mm, umplută cu Nucleosil 5C18 sau echivalent
 - 3.4. Hârtie de filtru, diametru: 90 mm, Schleicher și Schull, Weissband nr. 5892 sau echivalent
 - 3.5. Eprubete de sticlă de 50 ml, cu dop filetat

3.6. Fiole pentru probe, din sticlă, 5 ml

3.7. Granule pentru omogenizarea fierberii, carborundum, dimensiuni de la 2 la 4 mm sau echivalent.

4. Procedură

4.1. Pregătirea probei

4.1.1. Pregătirea probei fără adaos de standard intern

Într-o eprubetă de sticlă de 50 ml cu dop filetat (3.5) se cântărește 1 g din probă. Cu pipeta se pun în eprubetă 1,00 ml acid sulfuric 2 m (2.10) și 40,0 ml amestec etanol/apă (2.13). Se adaugă aproximativ 1 g de granule pentru omogenizarea fierberii (3.7), se închide eprubeta și se agită puternic timp de cel puțin un minut, până la obținerea unei suspensii omogene. Pentru a facilita extracția conservanților în faza de etanol, se pune eprubeta pentru exact cinci minute într-o baie de apă (3.1) menținută la 60 °C.

Se răcește imediat eprubeta într-un curent de apă rece și se depozitează extractul la 5 °C pentru o oră.

Se filtrează extractul prin hârtie de filtru (3.4). Se transferă aproximativ 2 ml de extract într-o fiolă de probă (3.6). Se depozitează extractul la 5 °C și se realizează determinarea HPLC într-un interval de 24 de ore de la preparare.

4.1.2. Pregătirea probei cu adaos de standard intern

Într-o eprubetă de sticlă de 50 ml cu dop filetat (3.5) se cântărește cu precizie de trei zecimale $1 \pm 0,1$ g („a” grame) de probă. Se adaugă cu pipeta 1,00 ml acid sulfuric 2 m (2.10) și 30,0 ml amestec etanol/apă (2.13). Se adaugă aproximativ 1 g de granule pentru omogenizarea fierberii (3.7) și 10,00 ml soluție de standard intern (2.14). Se închide eprubeta și se agită puternic cel puțin un minut, până la obținerea unei suspensii omogene. Pentru a facilita extracția conservanților în faza de etanol, se pune eprubeta pentru exact cinci minute într-o baie de apă (3.1) menținută la 60 °C.

Se răcește imediat eprubeta într-un curent de apă rece și se depozitează extractul la 5 °C pentru o oră.

Se filtrează extractul prin hârtie de filtru (3.4). Se transferă aproximativ 2 ml de extract într-o fiolă de probă (3.6). Se depozitează extractul la 5 °C și se realizează determinarea prin HPLC într-un interval de 24 de ore de la preparare.

4.2. Cromatografie de lichid de înaltă performanță

Faza mobilă: acetonitril/tampon acetat (2.15)

Se reglează debitul fazei mobile prin coloană la $2,0 \pm 0,5$ ml/min. Se reglează lungimea de undă a detectorului la 240 nm.

4.2.1. Etalonare

Se injectează porțiuni de 10 μl din fiecare soluție standard de conservant (2.17) în cromatograful de lichid (3.2). Pentru fiecare soluție se determină raportul dintre înălțimea vârfului corespunzător conservantului analizat și înălțimea vârfului corespunzător standardului intern, obținute din cromatograme. Se trasează un grafic pentru fiecare conservant, punând în relație raportul înălțimii vârfului cu concentrația fiecărei soluții standard.

În procedura de etalonare se asigură pentru soluțiile standard obținerea un răspuns liniar.

4.2.2. Determinare

Se injectează 10 μl de extract de probă (4.1.1) în cromatograful de lichid (3.2) și se înregistrează cromatograma. Se injectează 10 μl soluție de conservant standard (2.17) și se înregistrează cromatograma. Se compară cromatogramele obținute. Dacă în cromatograma extractului de probă (4.1.1) nu apare prezent nici un vârf având aproximativ același timp de retenție ca cel corespunzător acidului 2-metoxibenzoic (standardul intern recomandat), se injectează 10 μl de extract de probă cu adaos de standard intern (4.1.2) în cromatograful de lichid și se înregistrează cromatograma.

Dacă se observă în cromatograma extractului de probă (4.1.1) un vârf ce interferează având același timp de retenție ca cel al acidului 2-metoxibenzoic, trebuie selectat un alt standard intern adecvat. (Dacă unul dintre conservanții investigați este absent din cromatogramă, acest conservant poate fi folosit drept standard intern.)

Se asigură îndeplinirea următoarelor condiții de către cromatogramele obținute pentru o soluție standard și soluția de probă:

— separarea vârfurilor celei mai prost separate perechi trebuie să fie de cel puțin 0,90 (pentru definiția vârfului de separare, vezi figura 1).

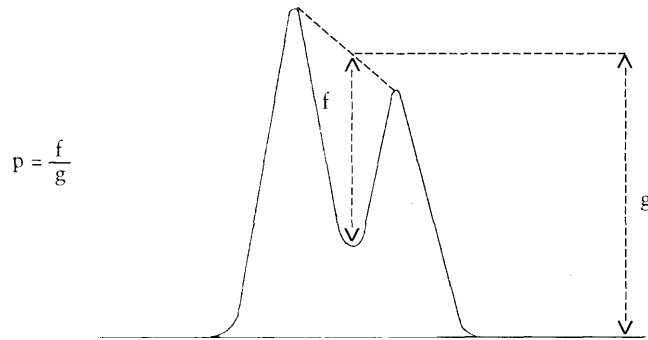


Figura 1: Vârf de separare

Dacă nu se realizează separarea cerută, fie trebuie folosită o coloană mai eficientă, fie trebuie ajustată compoziția fazei mobile până la îndeplinirea cerinței.

- Factorul de asimetrie, A_s , pentru fiecare vârf obținut trebuie să fie cuprins într-un interval de la 0,9 până la 1,5. (Pentru definiția factorului de asimetrie A_s , vezi figura 2). Pentru a înregistra cromatograma pentru determinarea factorului de asimetrie se recomandă o viteză a graficului de cel puțin 2 cm/minut.

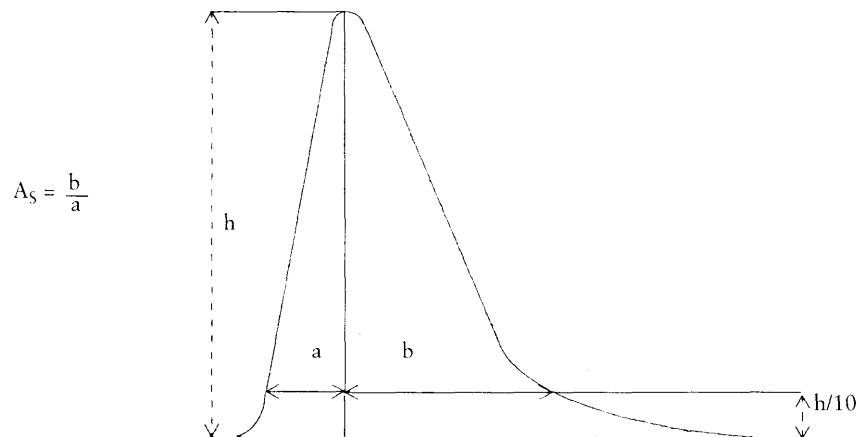


Figura 2: Factor de asimetrie a vârfului

- Trebuie să se obțină o linie de bază continuă.

5. Calcul

Se folosesc rapoartele dintre înălțimile vârfurilor corespunzătoare conservanților analizați și înălțimea vârfului corespunzător acidului 2-metoxibenzoic (standard intern) și graficul de etalonare pentru a calcula concentrația conservanților acizi în soluția probă. Se calculează conținutul de acid benzoic, acid 4-hidroxibenzoic, acid sorbic sau acid salicilic în probă, ca procent masic (x_i), folosind formula:

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

în care:

a = masa (g) a porțiunii analizate (4.1.2),

b = concentrația ($\mu\text{g/ml}$) de conservant în extractul de probă (4.1.2), obținută din graficul de etalonare.

6. Repetabilitate ⁽¹⁾

Pentru un conținut de acid 4-hidroxibenzoic de 0,40 %, diferența dintre rezultatele a două determinări efectuate în paralel pe aceeași probă nu trebuie să depășească o valoare absolută de 0,035 %.

Pentru un conținut de acid benzoic de 0,50 %, diferența dintre rezultatele a două determinări efectuate în paralel pe aceeași probă nu trebuie să depășească o valoare absolută de 0,050 %.

Pentru un conținut de acid salicilic de 0,50 %, diferența dintre rezultatele a două determinări efectuate în paralel pe aceeași probă nu trebuie să depășească o valoare absolută de 0,045 %.

Pentru un conținut de acid sorbic de 0,60 %, diferența dintre rezultatele a două determinări efectuate în paralel pe aceeași probă nu trebuie să depășească o valoare absolută de 0,035 %.

7. Observații

7.1. Rezultatele unui test de robustețe efectuat metodei indică următoarele: cantitatea de acid sulfuric adăugată pentru extragerea acizilor din probă este critică și limitele pentru cantitatea de probă luată în lucru trebuie să fie menținute în granițele prescrise.

7.2. Dacă se dorește, se poate folosi o coloană de siguranță adecvată.

C. DETERMINAREA ACIDULUI PROPIONIC**1. Sfera și domeniul de aplicare**

Prezenta metodă este adecvată pentru determinarea acidului propionic prezent în concentrație maximă 2 % (m/m) în produsele cosmetice.

2. Definiție

Concentrația acidului propionic măsurată prin această metodă este exprimată ca procent masic (% m/m) de produs.

3. Principiu

După extragerea acidului propionic din produs, determinarea se realizează cu ajutorul cromatografiei de gaz cu folosirea acidului 2-metilpropionic ca standard intern.

4. Reactivi

Toți reactivii trebuie să fie de puritate analitică; trebuie să se folosească apă distilată sau apă de calitate echivalentă.

4.1. Etanol 96 % (v/v)

4.2. Acid propionic

4.3. Acid 2-metilpropionic

4.4. Acid ortofosforic, 10 % (m/v)

4.5. Soluție de acid propionic

Într-un balon cotat de 50 ml se cântărește cu precizie aproximativ 1,00 g („p” grame) acid propionic și se aduce la semn cu etanol (4.1).

4.6. Soluție de standard intern

Într-un balon cotat de 50 ml se cântărește cu precizie aproximativ 1,00 g („e” grame) acid 2-metilpropionic și se aduce la semn cu etanol (4.1).

(¹) ISO 5725.

5. Aparatură

- 5.1. Echipament de laborator obișnuit și:
- 5.2. Cromatograf de gaz cu detector cu ionizare cu flacără
- 5.3. Eprubetă de sticlă cu dop filetat (20 x 150 mm)
- 5.4. Baie de apă la 60 °C
- 5.5. Seringă de sticlă de 10 ml cu membrană de filtrare (diametrul porilor: 0,45 μm).

6. Procedură

6.1. Pregătirea probei

6.1.1. Pregătirea probei fără standard intern

Într-o eprubetă de sticlă (5.3) se cântărește aproximativ 1 g de probă. Se adaugă 0,5 ml acid fosforic (4.4) și 9,5 ml etanol (4.1).

Se închide eprubeta și se agită bine. Dacă este necesar, se pune eprubeta într-o baie de apă la 60 °C (5.4) pentru cinci minute, pentru topirea completă a fazei grase. Se răcește rapid în curent de apă. Se filtrează o parte din soluție printr-o membrană de filtrare (5.5). Se cromatografiază filtratul în aceeași zi.

6.1.2. Pregătirea probei cu standard intern

Într-o eprubetă de sticlă se cântăresc cu precizie de trei zecimale 1 g ± 0,1 („a” grame) de probă (5.3.). Se adaugă 0,5 ml acid fosforic (4.4), 0,50 ml soluție de standard intern (4.6) și 9 ml etanol (4.1).

Se închide eprubeta și se agită bine. Dacă este necesar, se pune eprubeta într-o baie de apă la 60 °C (5.4) pentru cinci minute, pentru topirea completă a fazei grase. Se răcește rapid în curent de apă. Se filtrează o parte din soluție printr-o membrană de filtrare (5.5). Se cromatografiază filtratul în aceeași zi.

6.2. Condiții pentru cromatografia de gaz

Se recomandă următoarele condiții de operare:

Coloană

Tip:	Oțel inoxidabil
Lungime:	2m
Diametru:	1/8"
Umplutură:	10 % SP TM 1000 (sau echivalent) + 1 % H ₃ PO ₄ pe Chromosorb WAW 100-120 ochiuri

Temperatură

Injector:	200 °C
Coloană:	120 °C
Detector:	200 °C
Gaz purtător:	azot
Debit de curgere:	25ml/min

6.3. Cromatografie

6.3.1. Etalonare

Într-o serie de baloane cotate de 20 ml se pun cu pipeta 0,25, 0,50, 1,00, 2,00, respectiv 4,00 ml soluție de acid propionic (4.5). În fiecare balon cotate se pune cu pipeta 1,00 ml soluție de standard intern (4.6); se aduce la semn cu etanol (4.1) și se amestecă. Soluțiile preparate în acest mod conțin „e” mg/ml acid 2-metilpropionic ca standard intern (adică 1 mg/ml dacă e = 1 000) și p/4, p/2, p, 2p, 4p mg/ml acid propionic (adică 0,25, 0,50, 1,00, 2,00, 4,00 mg/ml dacă p = 1 000).

Se injectează 1 μl din fiecare dintre aceste soluții și se obține curba de etalonare prin trasarea pe axa X a raportului masic acid propionic/acid 2-metilpropionic, iar pe axa Y a raportului suprafețelor vârfurilor corespunzătoare.

Se efectuează trei injecții din fiecare soluție și se calculează raportul mediu al suprafețelor vârfurilor.

6.3.2. Determinare

Se injectează 1 μ l de filtrat de probă (6.1.1). Se compară cromatograma cu cea a soluțiilor standard (6.3.1). Dacă un vârf are aproximativ același timp de retenție ca cel al acidului 2-metilpropionic, se schimbă standardul intern. Dacă nu se observă nici o interferență, se injectează 1 μ l filtrat de probă 6.1.2 și se măsoară suprafețele vârfurilor corespunzătoare acidului propionic și standardului intern.

Se efectuează trei injecții din fiecare soluție și se calculează raportul mediu al suprafețelor vârfurilor.

7. **Calcul**

7.1. Din curba de etalonare obținută la 6.3.1 se obține raportul masic (K) corespunzător raportului suprafețelor vârfurilor calculat la 6.3.2.

7.2. Din raportul masic astfel obținut se calculează conținutul de acid propionic al probei (x), ca procent masic, folosind următoarea formulă:

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

în care:

K = raportul calculat la 7.1,

e = masa, în grame, a standardului intern cântărită la 4.6,

a = masa, în grame, a probei cântărită la 6.1.2.

Rezultatele se rotunjesc la o zecimală.

8. **Repetabilitate** ⁽¹⁾

Pentru o concentrație de acid propionic de 2 % (m/m), diferența dintre rezultatele a două determinări efectuate în paralel pe aceeași probă nu trebuie să depășească 0,12 %.

II. **IDENTIFICAREA ȘI DETERMINAREA HIDROCHINONEI, A MONOMETILETERULUI DE HIDROCHINONĂ, A MONOETILETERULUI DE HIDROCHINONĂ ȘI A MONOBENZILETERULUI DE HIDROCHINONĂ ÎN PRODUSELE COSMETICE**

A. IDENTIFICARE

1. **Sfera și domeniul de aplicare**

Metoda descrie detectarea și identificarea hidrochinonei, a monometileterului de hidrochinonă, a monoetileterului de hidrochinonă și a monobenzileterului de hidrochinonă (monobenzoninei) în produsele cosmetice pentru calmarea pielii.

2. **Principiu**

Hidrochinona și eterii săi sunt identificați prin cromatografie în strat subțire (TLC).

3. **Reactivi**

Toți reactivii trebuie să fie de calitate analitică.

(1) ISO 5725.

- 3.1. Etanol, 96 % (v/v)
- 3.2. Cloroform
- 3.3. Dietileter
- 3.4. Solvent de dezvoltare
Cloroform/dietileter, 66:33 (v/v)
- 3.5. Amoniac, 25 % (m/m) ($d_4^{20} = 0,91$ g/ml)
- 3.6. Acid ascorbic
- 3.7. Hidrochinonă
- 3.8. Monometileter de hidrochinonă
- 3.9. Monoetileter de hidrochinonă
- 3.10. Monobenzileter de hidrochinonă (monobenzonă)
- 3.11. Soluții de referință
Următoarele soluții de referință trebuie proaspăt preparate și sunt stabile doar o zi:
 - 3.11.1. Într-o eprubetă gradată de 10 ml se cântăresc 0,05 g hidrochinonă (3.7). Se adaugă 0,250 g acid ascorbic (3.6) și 5 ml etanol (3.1). Se adaugă amoniac (3.5) până când pH-ul devine 10 și se aduce la semn cu etanol (3.1).
 - 3.11.2. Într-o eprubetă gradată de 10 ml se cântăresc 0,05 g monometileter de hidrochinonă (3.8). Se adaugă 0,250 g acid ascorbic (3.6) și 5 ml etanol (3.1). Se adaugă amoniac (3.5) până când pH-ul devine 10 și se aduce la semn cu etanol (3.1).
 - 3.11.3. Într-o eprubetă gradată de 10 ml se cântăresc 0,05 g monoetileter de hidrochinonă (3.9). Se adaugă 0,250 g acid ascorbic (3.6) și 5 ml etanol (3.1). Se adaugă amoniac (3.5) până când pH-ul devine 10 și se aduce la semn cu etanol (3.1).
 - 3.11.4. Într-o eprubetă gradată de 10 ml se cântăresc 0,05 g monobenzileter de hidrochinonă (3.10). Se adaugă 0,250 g acid ascorbic (3.6) și 5 ml etanol (3.1). Se adaugă amoniac (3.5) până când pH-ul devine 10 și se aduce la semn cu etanol (3.1).
- 3.12. Azotat de argint
- 3.13. Acid 12-molibdofosforic
- 3.14. Fericianură de potasiu hexahidrată
- 3.15. Clorură ferică hexahidrată
- 3.16. Reactivi de pulverizare
 - 3.16.1. La o soluție apoasă 5 % (m/v) azotat de argint (3.12) se adaugă amoniac (3.5) până la dizolvarea precipitatului care se formează.

Atenție:

În timp, soluția devine instabilă la explozie, deci trebuie aruncată după folosire.

- 3.16.2. Soluție 10 % (m/v) acid 12-molibdofosforic (3.13) în etanol (3.1).

- 3.1.6.3. Se prepară o soluție apoasă 1 % (m/v) de fericianură de potasiu (3.14) și o soluție apoasă 2 % (m/v) de clorură ferică (3.15). Se amestecă părți egale din ambele soluții chiar înainte de folosire.

4. Aparatură

Echiptament de laborator obișnuit și:

- 4.1. Echipament uzual pentru cromatografie în strat subțire TLC
- 4.2. Plăci pentru cromatografie în strat subțire, gata preparate: silicagel GHR/UV₂₅₄; 20 × 20 cm (Machery, Nagel sau echivalent). Grosimea stratului: 0,25 mm.
- 4.3. Baie ultrasonică
- 4.4. Centrifugă
- 4.5. Lampă UV, 254 nm

5. Procedură

5.1. Pregătirea probei

Într-o eprubetă gradată de 10 ml se cântăresc 3 g de probă. Se adaugă 0,250 g acid ascorbic (3.6) și 5 ml etanol (3.1). Se reglează pH-ul soluției la 10, folosind amoniac (3.5). Se aduce la semn cu etanol (3.1). Se închide eprubeta cu un dop și se omogenizează pe o baie ultrasonică timp de 10 minute. Se filtrează prin hârtie de filtru sau se centrifughează la 3 000 rot/min.

5.2. Cromatografie în strat subțire

- 5.2.1. Se saturează un tanc cromatografic cu solvent de dezvoltare (3.4).
- 5.2.2. Se depun pe o placă 2 μl din soluțiile de referință (3.11) și 2 μl din soluția probă (5.1). Se dezvoltă în întuneric la temperatură ambiantă până când frontul de solvent a migrat 15 cm față de start.
- 5.2.3. Se îndepărtează placa și se lasă să se usuce la temperatura camerei.

5.3. Detecție

- 5.3.1. Se observă placa în lumină UV la 254 nm și se marchează poziția petelor.
- 5.3.2. Se pulverizează cu:
- reactiv azotat de argint (3.16.1) sau
 - reactiv acid 12-molibdofosforic (3.16.2); se încălzește la aproximativ 120 °C sau
 - soluție de fericianură de potasiu și soluție de clorură ferică (3.16.3).

6. Identificare

Se calculează valoarea R_f pentru fiecare pată.

Se compară petele obținute pentru soluția probă cu cele pentru soluțiile de referință, din punct de vedere al: valorilor R_f , culorilor petelor la radiație UV și culorilor petelor după vizualizarea cu reactiv pulverizat.

Se realizează analiza prin HPLC conform descrierii din secțiunea (B) și se compară timpii de retenție obținuți pentru vârful (vârful) probei cu cei corespunzători soluțiilor de referință.

Se combină rezultatele obținute prin TLC și HPLC pentru a identifica prezența hidrochinonei și a eterilor săi.

7. Observații

În condițiile descrise au fost observate următoarele valori ale R_f :

hidrochinonă:	0,32
monometileter de hidrochinonă:	0,53
monoetileter de hidrochinonă:	0,55
monobenzileter de hidrochinonă:	0,58

B. DETERMINARE

1. Sfera și domeniul de aplicare

Prezenta metodă specifică o procedură pentru determinarea hidrochinonei, a monometileterului de hidrochinonă, a monoetileterului de hidrochinonă și a monobenzileterului de hidrochinonă în produsele cosmetice pentru calmarea pielii.

2. Principiu

Proba este extrasă cu un amestec de apă/etanol în condiții de încălzire ușoară pentru topirea oricărui material gras. Determinarea substanțelor analizate în soluția rezultată este realizată prin cromatografie de lichid cu fază inversă cu detecție UV.

3. Reactivi

3.1. Toți reactivii trebuie să fie de calitate analitică. Apa folosită trebuie să fie apă distilată sau apă de puritate cel puțin echivalentă.

3.2. Metanol

3.3. Hidrochinonă

3.4. Monometileter de hidrochinonă

3.5. Monoetileter de hidrochinonă

3.6. Monobenzileter de hidrochinonă (monobenzonă)

3.7. Tetrahidrofuran, calitate HPLC

3.8. Amestec apă/metanol 1:1 (v/v). Se amestecă un volum de apă și un volum de metanol (3.2)

3.9. Fază mobilă: amestec tetrahidrofuran/apă 45:55 (v/v). Se amestecă 45 volume de tetrahidrofuran (3.7) și 55 volume de apă.

3.10. Soluție de referință

Într-un balon cotate de 50 ml se cântăresc 0,06 g hidrochinonă (3.3), 0,08 g monometileter de hidrochinonă (3.4), 0,10 g monoetileter de hidrochinonă (3.5) și 0,12 g monobenzileter de hidrochinonă (3.6). Se dizolvă și se aduce la semn cu metanol (3.2). Se prepară soluția de referință prin diluarea a 10,00 ml din această soluție la 50,00 ml cu amestec apă/metanol (3.8). Aceste soluții trebuie să fie proaspăt preparate.

4. Aparatură

Echipament de laborator obișnuit și:

4.1. Baie de apă, capabilă de menținerea temperaturii la 60 °C.

4.2. Cromatograf de lichid de înaltă performanță cu detector UV cu lungime de undă variabilă și ciclu de injecție de 10 μl.

4.3. Coloană analitică:

Coloană cromatografică de oțel inoxidabil, lungime 250 mm, diametru interior 4,6 mm, umplută cu fenil Zorbax (fenetilsilan legat chimic pe Zorbax SIL, la capete cu trimetilclorsilan), dimensiuni

particule 6µm, sau echivalent. Nu se foloseşte o coloană de siguranţă, cu excepţia siguranţei de fenil sau a uneia echivalente.

- 4.4. Hârtie de filtru, diametru 90 mm, Schleicher și Schull, Weissband nr. 5892 sau echivalentă.

5. Procedură

5.1. Pregătirea probei

Într-un balon cotat de 50 ml se cântăresc cu precizie de trei zecimale $1 \pm 0,1$ g („a” grame) de probă. Se dispersează proba în 25 ml de amestec apă/metanol (3.8). Se închide balonul și se agită puternic până la obținerea unei suspensii omogene. Se agită cel puțin un minut. Se pune balonul într-o baie de apă (4.1) și se menține la 60 °C pentru îmbunătățirea extracției. Se răcește balonul și se aduce la semn cu amestec apă/metanol (3.8). Se filtrează extractul folosind hârtie de filtru (4.4). Se realizează determinarea HPLC într-un interval de cel mult 24 de ore de la pregătirea extractului.

5.2. Cromatografie de lichid de înaltă performanță

- 5.2.1. Se reglează debitul de curgere al fazei mobile (3.9) la 1,0 ml/min și lungimea de undă a detectorului la 295 nm.

- 5.2.2. Se injectează 10 µl soluție de probă, obținută conform descrierii din secțiunea 5.1, și se înregistrează cromatograma. Se măsoară suprafețele vârfurilor. Se realizează etalonarea conform descrierii din 5.2.3. Se compară cromatogramele obținute pentru probă și soluțiile de referință. Se folosesc suprafețele vârfurilor și factorii de răspuns (RF) calculați la 5.2.3 pentru a calcula concentrația substanțelor analizate în soluția probă.

5.2.3. Etalonare

Se injectează 10 µl soluție de referință (3.10) și se înregistrează cromatograma. Se injectează de mai multe ori până când se obține o suprafață a vârfului constantă.

Se determină factorul de răspuns RF_i :

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

în care:

P_i = suprafețele vârfurilor pentru hidrochinonă, monometileter de hidrochinonă, monoetileter de hidrochinonă sau monobenzileter de hidrochinonă și

c_i = concentrația (g/50 ml) în soluția de referință (3.10) a hidrochinonei, monometileterului de hidrochinonă, monoetileterului de hidrochinonă sau monobenzileterului de hidrochinonă.

Se asigură îndeplinirea următoarelor cerințe de către cromatogramele obținute pentru o soluție standard și soluția de probă:

- separarea vârfurilor celei mai prost separate perechi trebuie să fie de cel puțin 0,90. (Pentru definiția vârfului de separare, vezi figura 1.)

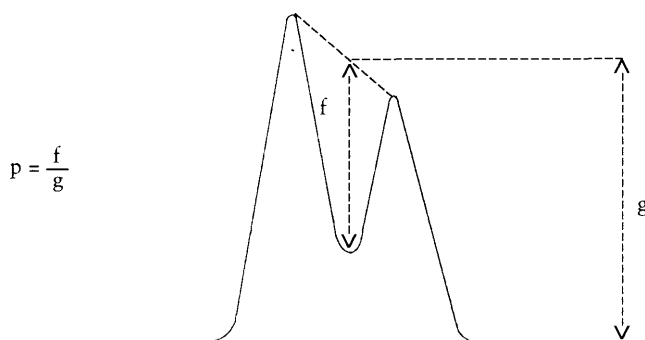


Figura 1: Vârf de separare

Dacă nu se realizează separarea cerută sau trebuie folosită o coloană mai eficientă sau trebuie ajustată compoziția fazei mobile până la îndeplinirea cerinței.

- Factorul de asimetrie, A_s , pentru vârfurile obținute trebuie să fie cuprins într-un interval de la 0,9 până la 1,5. (Pentru definiția factorului de asimetrie A_s , vezi figura 2.). Pentru a înregistra cromatograma pentru determinarea factorului de asimetrie se recomandă o viteză a graficului de cel puțin 2 cm/minut.

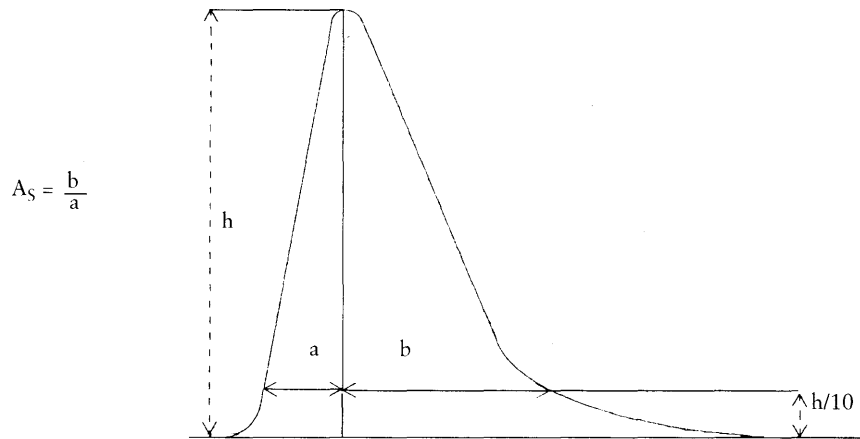


Figura 2: Factor de asimetrie a vârfului

- Trebuie să se obțină o linie de bază continuă.

6. Calcul

Se folosesc suprafețele vârfurilor corespunzătoare substanțelor analizate pentru a calcula concentrațiile acestora în probă. Se calculează concentrația substanțelor analizate în probă, ca procent masic (x_i), folosind următoarea formulă:

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

în care:

a = masa probei, în grame și

b_i = suprafața vârfului corespunzător substanței analizate „i” în probă.

7. Repetabilitate ⁽¹⁾

- 7.1. Pentru un conținut de hidrochinonă de 2,0 %, diferența dintre rezultatele a două determinări efectuate în paralel pe aceeași probă nu trebuie să depășească o valoare absolută de 0,13 %.
- 7.2. Pentru un conținut de monometiler de hidrochinonă de 1,0 %, diferența dintre rezultatele a două determinări efectuate în paralel pe aceeași probă nu trebuie să depășească o valoare absolută de 0,1 %.
- 7.3. Pentru un conținut de monoetiler de hidrochinonă de 1,0 %, diferența dintre rezultatele a două determinări efectuate în paralel pe aceeași probă nu trebuie să depășească o valoare absolută de 0,11 %.
- 7.4. Pentru un conținut de monobenzileter de hidrochinonă de 1,0 %, diferența dintre rezultatele a două determinări efectuate în paralel pe aceeași probă nu trebuie să depășească o valoare absolută de 0,11 %.

8. Reproducibilitate ⁽¹⁾

- 8.1. Pentru un conținut de hidrochinonă de 2,0 %, diferența dintre rezultatele a două determinări efectuate pe aceeași probă, dar în condiții diferite (laboratoare diferite, operatori diferiți, aparatură diferită și moment diferit), nu trebuie să depășească o valoare absolută de 0,37 %.

⁽¹⁾ ISO 5725.

- 8.2. Pentru un conținut de monometileter de hidrochinonă de 1,0 %, diferența dintre rezultatele a două determinări efectuate pe aceeași probă, dar în condiții diferite (laboratoare diferite, operatori diferiți, aparatură diferită și moment diferit), nu trebuie să depășească o valoare absolută de 0,21 %.
- 8.3. Pentru un conținut de monoetileter de hidrochinonă de 1,0 %, diferența dintre rezultatele a două determinări efectuate pe aceeași probă, dar în condiții diferite (laboratoare diferite, operatori diferiți, aparatură diferită și moment diferit), nu trebuie să depășească o valoare absolută de 0,19 %.
- 8.4. Pentru un conținut de monobenzileter de hidrochinonă de 1,0 %, diferența dintre rezultatele a două determinări efectuate pe aceeași probă, dar în condiții diferite (laboratoare diferite, operatori diferiți, aparatură diferită și moment diferit), nu trebuie să depășească o valoare absolută de 0,11 %.

9. Obsevații

- 9.1. Când se determină un conținut de hidrochinonă considerabil mai mare decât 2 % și este necesară o estimare precisă a conținutului, extractul probă (5.1) trebuie să fie diluat la o concentrație similară cu cea care ar fi obținută dintr-o probă conținând 2 % hidrochinonă și determinarea trebuie repetată.

(Pentru unele instrumente, absorbanța poate depăși limitele de detectare pentru concentrații înalte de hidrochinonă.)

9.2. Interferențe

Metoda descrisă mai sus permite determinarea hidrochinonei și a eterilor săi într-un singur ciclu izocratic. Folosirea coloanei de fenil asigură o retenție suficientă pentru hidrochinonă, care nu poate fi garantată când este folosită o coloană C18 cu fază mobilă descrisă.

Oricum, această metodă este predispusă la interferențe din cauza unui număr de derivați parabenzenici. În aceste cazuri, determinarea trebuie repetată cu un sistem diferit fază mobilă/fază staționară. Metode adecvate pot fi găsite în lucrările de referință 1 și 2, și anume:

Coloană: Zorbax ODS, 4,6 mm x 25 mm, sau echivalent:

temperatură: 36 °C

debit: 1,5 ml/min

fază mobilă:

pentru hidrochinonă: metanol/apă 5/95 (V/V)

pentru monometileter de hidrochinonă: metanol/apă 30/70 (V/V)

pentru monobenzileter de hidrochinonă: metanol/apă 80/20 (V/V) ⁽¹⁾.

Coloană: Spherisorb S5-ODS sau echivalent:

fază mobilă: apă/metanol 90/10 (V/V)

debit: 1,5 ml/min

Aceste condiții sunt adecvate pentru hidrochinonă ⁽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.