

31995L0032

L 178/20

ÚRADNÝ VESTNÍK EURÓPSKÝCH SPOLOČENSTIEV

28.7.1995

ŠIESTA SMERNICA KOMISIE 95/32/ES

zo 7. júla 1995

o metódach analýzy potrebných na kontrolu zloženia kozmetických výrobkov

(Text s významom pre EHP)

KOMISIA EURÓPSKÝCH SPOLOČENSTIEV,

so zreteľom na Zmluvu o založení Európskeho spoločenstva,

so zreteľom na smernicu Rady 76/768/EHS z 27. júla 1976 o aproximácii právnych predpisov členských krajín týkajúcich sa kozmetických výrobkov⁽¹⁾, naposledy zmenenú a doplnenú smernicou Komisie 94/32/ES⁽²⁾, a najmä jej článok 8 odsek 1,

keďže smernica 76/768/EHS ustanovuje úradné testovanie kozmetických výrobkov s cieľom zabezpečiť, že budú vyhovovať podmienkam ustanoveným opatreniami Komisie týkajúcimi sa zloženia kozmetických výrobkov;

keďže všetky metódy analýzy majú byť čím skôr ustanovené; keďže niektoré metódy analýzy už boli prijaté smernicou Komisie 80/1335/EHS⁽³⁾, zmenenou a doplnenou smernicami 87/143/EHS⁽⁴⁾ a 82/434/EHS⁽⁵⁾, ktorá bola zmenená a doplnená smernicami 90/207/EHS⁽⁶⁾, 83/514/EHS⁽⁷⁾, 85/490/EHS⁽⁸⁾ a 93/73/EHS⁽⁹⁾;

keďže dôkaz a stanovenie kyseliny benzoovej, kyseliny 4-hydroxybenzoovej, kyseliny sorbovej, kyseliny salicylovej a kyseliny propiónovej v kozmetických výrobkoch a dôkaz a stanovenie hydrochinónu, monometyléteru hydrochinónu, monoetyléteru hydrochinónu a monobenzyléteru hydrochinónu v kozmetických výrobkoch predstavuje šiesty krok;

keďže opatrenia ustanovené touto smernicou sú v súlade so stanoviskom Výboru pre prispôsobenie smernice 76/768/EHS technickému pokroku,

PRIJALA TÚTO SMERNICU:

Článok 1

Členské štáty podniknú všetky opatrenia nevyhnutné na zabezpečenie toho, že počas úradného testovania kozmetických výrobkov:

- dôkaz a stanovenie kyseliny benzoovej, kyseliny 4-hydroxybenzoovej, kyseliny sorbovej, kyseliny salicylovej a kyseliny propiónovej,
 - dôkaz a stanovenie hydrochinónu, monometyléteru hydrochinónu, monoetyléteru hydrochinónu a monobenzyléteru hydrochinónu,
- sa budú získavať v súlade s metódami opísanými v prílohe.

Článok 2

1. Členské štáty prijímú zákony, iné právne predpisy a správne opatrenia potrebné na dosiahnutie súladu s touto smernicou do 30. septembra 1996. Bezodkladne o tom budú informovať Komisiu.

Členské štáty uvedú priamo v prijatých ustanoveniach alebo pri ich úradnom uverejnení odkaz na túto smernicu. Podrobnosti o odkaze upravia členské štáty.

2. Členské štáty oznámia Komisii znenie hlavných ustanovení vnútroštátnych právnych predpisov, ktoré prijímú v oblasti pôsobnosti tejto smernice.

Článok 3

Táto smernica nadobúda účinnosť dvadsiaty deň po jej uverejnení v Úradnom vestníku Európskych spoločenstiev.

Článok 4

Táto smernica je adresovaná členským štátom.

V Bruseli 7. júla 1995

Za Komisiu

Emma BONINO

členka Komisie

⁽¹⁾ Ú. v. ES L 262, 27.9.1976, s. 169.

⁽²⁾ Ú. v. ES L 181, 15.7.1994, s. 31.

⁽³⁾ Ú. v. ES L 383, 31.12.1980, s. 27.

⁽⁴⁾ Ú. v. ES L 57, 27.2.1987, s. 56.

⁽⁵⁾ Ú. v. ES L 185, 30.6.1982, s. 1.

⁽⁶⁾ Ú. v. ES L 108, 28.4.1990, s. 92.

⁽⁷⁾ Ú. v. ES L 291, 24.10.1983, s. 9.

⁽⁸⁾ Ú. v. ES L 295, 7.11.1985, s. 30.

⁽⁹⁾ Ú. v. ES L 231, 14.9.1993, s. 34.

PRÍLOHA

I. DÔKAZ A STANOVENIE KYSELINY BENZOOVEJ, KYSELINY 4-HYDROXYBENZOOVEJ, KYSELINY SORBOVEJ, KYSELINY SALICYLOVEJ A KYSELINY PROPIÓNOVEJ V KOZMETICKÝCH VÝROBKOCH

1. Rozsah a oblasť použitia

Táto metóda je použiteľná na dôkaz a stanovenie kyseliny benzoovej, kyseliny 4-hydroxybenzoovej, kyseliny sorbovej, kyseliny salicylovej a kyseliny propiónovej v kozmetických výrobkoch. Samostatné postupy opisujú dôkaz týchto konzervačných látok: stanovenie kyseliny propiónovej; a stanovenie kyseliny 4-hydroxybenzoovej, kyseliny salicylovej, kyseliny sorbovej a kyseliny benzoovej.

2. Definícia

Množstvá kyseliny benzoovej, kyseliny 4-hydroxybenzoovej, kyseliny salicylovej, kyseliny sorbovej a kyseliny propánovej stanovené touto metódou sa vyjadrujú ako hmotnostné percentá voľných kyselín.

A. DÔKAZ

1. Princíp

Po acidobázickej extrakcii konzervačných látok sa extrakt následne analyzuje tenkovrstvovou chromatografiou (TLC) a reakčnou chromatografiou („derivatizácia na platni“). Podľa výsledkov sa identifikácia potvrdí vysoko účinnou kvapalinovou chromatografiou (HPLC) alebo v prípade kyseliny propiónovej plynovou chromatografiou (GC).

2. Činidlá

2.1. Všeobecné informácie

Všetky činidlá musia byť analyticky čisté. Použitá voda musí byť destilovaná alebo minimálne voda rovnocennej čistoty.

2.2. Acetón

2.3. Dietyléter

2.4. Acetonitril

2.5. Toluén

2.6. *n*-Hexán

2.7. Parafrínový olej

2.8. Kyselina chlorovodíková, 4 M

2.9. Hydroxid draselný, vodný roztok, 4 M

2.10. Chlorid vápenatý, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.11. Uhličitan lítny, Li_2CO_3

2.12. 2-Bróm-2'-acetonafón

2.13. Kyselina 4-hydroxybenzoová

2.14. Kyselina salicylová

2.15. Kyselina benzoová

2.16. Kyselina sorbová

2.17. Kyselina propiónová

2.18. Referenčné roztoky

Pripravujú sa 0,1 % (m/V) roztoky (100 mg/100 ml) každej z piatich konzervačných látok (2.13 až 2.17) v dietyléteri.

2.19. Derivatizačné činidlo

0,5 % (m/V) roztok 2-bróm-2'-acetonafónu (2.12) v acetonitrile (2.4) (50 mg/10 ml). Tento roztok sa má pripravovať každý týždeň čerstvý a má sa uskladňovať v chladničke.

2.20. Roztok katalyzátora

0,3 % (m/V) roztok uhličitanu lítneho (2.11) vo vode (300 mg/100 ml). Tento roztok sa má vždy pripravovať čerstvý.

2.21. Vytvárací roztok

Toluén (2.5)/acetón (2.2), 20:0,5 (obj. diely)

2.22. Kvapalný parafín (2.7)/n-hexán (2.6), 1:2 (obj. diely)

3. **Prístroje a pomôcky**

Bežné laboratórne pomôcky

3.1. Vodný kúpeľ, s možnosťou nastavenia teploty na 60 °C

3.2. Vytváracia komora

3.3. Zdroj ultrafialového svetla, 254 a 366 nm.

3.4. Platne na tenkovrstvovú chromatografiu (TLC), potiahnuté silikagélom 60 bez fluorescenčného indikátora, 20 × 20 cm, hrúbka vrstvy 0,25 mm s koncentračnou zónou 2,5 × 20 cm (Merck 11845 alebo ich ekvivalent)

3.5. Mikrostriekačka, 10 µl

3.6. Mikrostriekačka, 25 µl

3.7. Sušiareň, s možnosťou nastavenia teploty do 105 °C

3.8. 50-ml sklené skúmavky so skrutkovacím uzáverom

3.9. Filtračný papier s priemerom 90 mm, Schleicher & Schull, Weissband č. 5892 alebo jeho ekvivalent

3.10. Univerzálny pH indikátorový papier, pH 1-11

3.11. 5 ml sklené vzorkovnice

3.12. Rotačná vákuová odparka (Rotavapor alebo ekvivalent)

3.13. Vyhrievacia platňa (varič)

4. **Postup**

4.1. Príprava vzorky

Do 50 ml skúmavky so skrutkovacím uzáverom (3.8) sa naváži približne 1 g vzorky. Pridajú sa štyri kvapky 4 M roztoku kyseliny chlorovodíkovej (2.8) a 40 ml acetónu (2.2). V prípade veľmi zásaditých výrobkov, ako napr. toaletné mydlo, by sa malo pridať 20 kvapiek 4 M roztoku kyseliny chlorovodíkovej (2.8). Indikátorovým papierikom (3.10) sa skontroluje, či pH je približne dva. Skúmavka sa uzavrie a jednu minútu sa intenzívne pretrepáva.

Ak je potrebné uľahčiť extrakciu konzervačných látok do acetónovej fázy, vzorka sa mierne zahrieva na asi 60 °C do roztopenia kvapalnej fázy.

Roztok sa ochladí na laboratórnu teplotu a cez filtračný papier (3.9) sa prefiltruje do kužeľovitej banky.

20 ml filtrátu sa preniesie do 200 ml kužeľovitej banky, pridá sa 20 ml vody a premieša sa. pH zmesi sa so 4 M roztokom hydroxidu draselného (2.9) upraví na približne 10, na meranie pH sa použije indikátorový papierik (3.10).

Pridá sa 1 g chloridu vápenatého (2.10) a intenzívne sa pretrepe. Cez filtračný papier (3.9) sa prefiltruje do 250 ml oddeľovacieho lievika obsahujúceho 75 ml dietyléru (2.3) a jednu minútu sa intenzívne pretrepáva. Nechajú sa oddeliť vrstvy a vodná vrstva sa vypustí do 250 ml kužeľovitej banky. Éterická vrstva sa vyleje. Pomocou indikátorového papiera (3.10) sa so 4 M roztokom kyseliny chlorovodíkovej (2.8) upraví pH vodného roztoku na približne dva. Pridá sa 10 ml dietyléru (2.3), banka sa uzavrie a jednu minútu intenzívne pretrepáva, nechajú sa oddeliť vrstvy a éterická vrstva sa preniesie do odparovacieho zariadenia (3.12). Vodná vrstva sa vyleje.

Éterická vrstva sa odparí takmer do sucha a zvyšok sa znova rozpustí v 1 ml dietyléru (2.3). Roztok sa preniesie do sklenej vzorkovnice (3.11).

4.2. Tenkovrstvová chromatografia

Pre každý štandard a vzorku, ktoré majú byť nanesené na tenkovrstvovú platňu, sa v rovnakej vzdialenosti na štartovaciu čiaru v koncentračnej zóne TLC platne (3.4) striekačkou (3.5) nanesú približne 3 µl roztoku uhličitanu lítneho (2.20) a platnička sa vysuší v prúde studeného vzduchu.

TLC platňa sa preniesie na vyhrievaciu platňu (3.13) vyhriatu na 40 °C, aby sa škvrny pri nanášaní udržali čo najmenšie. Mikrostriekačkou (3.5) sa na štartovaciu čiaru platne nanesie 10 µl každého roztoku štandardu (2.18) a roztoku vzorky (4.1), presne na miesta, kde boli nanesené škvrny roztoku uhličitanu lítneho.

Nakoniec sa nanesie približne 15 µl derivatizačného činidla (2.19) (roztoku 2-bróm-2'-acetonafónu), opäť presne na miesta, kde boli nanesené škvrny roztokov štandardov/vzorky a roztoku uhličitanu lítneho.

TLC platňa sa zahrieva v sušiarňi (3.7) na 80 °C 45 minút. Po ochladení sa platňa vyvíja vo vyvíjacej komore (3.2), nasycovanej počas 15 minút (bez použitia vložky z filtračného papiera), vyvíjacím rozpúšťadlom 2.21 (toluén/acetón), kým čelo rozpúšťadla nedosiahne vzdialenosť 15 cm od štartu (to môže trvať približne 80 minút).

Platňa sa vysuší v prúde studeného vzduchu a získané škvrny sa vyšetrí pod UV svetlom (3.3). Na zvýšenie fluorescencie slabých škvŕn sa TLC platňa môže ponoriť do zmesi kvapalného parafínu a *n*-hexánu (2.22).

5. Dôkaz

Vypočítajú sa hodnoty R_f pre každú škvrnu.

Porovnávajú sa hodnoty R_f a správanie sa pri ožiarení UV svetlom pozorované pri škvŕnách získaných zo vzorky so škvŕnami získanými z roztokov štandardov.

Vyvodí sa predbežné závery o prítomnosti a identite prítomných konzervačných látok. Uskutoční sa identifikácia pomocou HPLC opísaná v oddieli B, alebo, ak sa ukazuje, že je prítomná kyselina propiónová, pomocou GC opísaná v oddieli C. Získané retenčné časy sa porovnávajú s časmi získanými pri roztokoch štandardov.

Výsledky TLC a HPLC alebo GC sa spoja a konečný dôkaz prítomnosti konzervačných látok vo vzorke vychádza z kombinácie výsledkov.

B. STANOVENIE KYSELINY BENZOOVEJ, KYSELINY 4-HYDROXYBENZOOVEJ, KYSELINY SORBOVEJ A KYSELINY SALICYLOVEJ

1. Princíp

Po okyslení sa vzorka extrahuje zmesou etanolu a vody. Po filtrácii sa konzervačné látky následne stanovia vysoko účinnou kvapalinovou chromatografiou (HPLC).

2. Činidlá

2.1. Všetky činidlá musia byť analyticky čisté a ak je to potrebné, vhodné na HPLC. Použitá voda musí byť destilovaná alebo minimálne voda rovnocennej čistoty

2.2. Etanol, absolútny

2.3. Kyselina 4-hydroxybenzoová

- 2.4. Kyselina salicylová
- 2.5. Kyselina benzoová
- 2.6. Kyselina sorbová
- 2.7. Octan sodný, $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$
- 2.8. Kyselina octová, $(\alpha)_4^{20} = 1,05 \text{ g/ml}$
- 2.9. Acetonitril
- 2.10. Kyselina sírová, 2 M
- 2.11. Hydroxid draselný, vodný roztok, 0,2 M
- 2.12. Kyselina 2-metoxybenzoová
- 2.13. Zmes etanol/voda.
- Zmieša sa deväť objemových dielov etanolu (2.2) a jeden objemový diel vody (2.1)
- 2.14. Rostok vnútorného štandardu
- Pripraví sa roztok obsahujúci približne 1 g kyseliny 2-metoxybenzoovej (2.12) v 500 ml zmesi etanol/voda (2.13)
- 2.15. Mobilná fáza na HPLC
- 2.15.1. Octanový tlmivý roztok: 6,35 g octanu sodného (2.7) a 20,0 ml kyseliny octovej (2.8) sa pridá k 1 l vody a premieša sa
- 2.15.2. Mobilná fáza sa pripraví zmiešaním deviatich objemových dielov octanového tlmivého roztoku (2.15.1) a jedného objemového dielu acetonitrilu (2.9)
- 2.16. Zásobný roztok konzervačných látok
- Do 50 ml odmernej banky sa presne naváži približne 0,05 g kyseliny 4-hydroxybenzoovej (2.3), 0,2 g kyseliny salicylovej (2.4), 0,2 g kyseliny benzoovej (2.5) a 0,05 g kyseliny sorbovej (2.6) a doplní sa po značku zmesou etanol/voda (2.13). Rostok sa uskladňuje v chladničke. Rostok je stály jeden týždeň.
- 2.17. Štandardné roztoky konzervačných látok
- Do série 20 ml odmerných baniek sa preniesie jednotlivo 8,00, 4,00, 2,00, 1,00 a 0,50 ml zásobného roztoku (2.16). Do každej banky sa pridá po 10,00 ml roztoku vnútorného štandardu (2.14) a 0,5 ml 2 M roztoku kyseliny sírovej (2.10). Doplní sa po značku zmesou etanol/voda (2.13). Tieto roztoky sa musia pripravovať čerstvé.
3. **Prístroje a pomôcky**
- Ak nie je inak uvedené, bežné laboratórne vybavenie a:
- 3.1. Vodný kúpeľ, nastavený na 60 °C
- 3.2. Vysoko účinný kvapalinový chromatograf s nastaviteľným UV detektorom a 10 µl dávkovacou slučkou
- 3.3. Analytická kolóna
- Z nehrdzavejúcej ocele, dlhá 12,5 až 25 cm, s vnútorným priemerom 4,6 mm, s náplňou Nucleosil 5C18 alebo ekvivalentnou
- 3.4. Filtračný papier s priemerom 90 mm, Schleicher & Schull, Weissband č. 5892 alebo jeho ekvivalent
- 3.5. 50-ml sklené skúmavky so skrutkovacím uzáverom.

3.6. 5 ml sklenené vzorkovnice.

3.7. Varné kamienky, karborundové, s rozmerom 2 až 4 mm alebo ich ekvivalent

4. Postup

4.1. Príprava vzorky

4.1.1. Príprava vzorky bez prídavku vnútorného štandardu

Do 50 ml skúmavky so skrutkovacím uzáverom (3.5) sa naváži 1 g vzorky. Do skúmavky sa pipetou pridá 1,00 ml 2 M roztoku kyseliny sírovej (2.10) a 40,0 ml zmesi etanol/voda (2.13). Pridá sa približne 1 g varných kamienkov (3.7), skúmavka sa uzavrie a intenzívne sa pretrepáva aspoň jednu minútu, kým sa nezíska homogénna suspenzia. Na uľahčenie extrakcie konzervačných látok do etanolickej fázy sa skúmavka umiestni presne na päť minút do vodného kúpeľa (3.1) udržiavaného na 60 °C.

Skúmavka sa ihneď ochladí pod prúdom studenej vody a extrakt sa uskladní na jednu hodinu pri teplote 5 °C.

Extrakt sa prefiltruje cez filtračný papier (3.4). Približne 2 ml extraktu sa prenese do sklenenej vzorkovnice (3.6). Extrakt sa uschováva pri teplote 5 °C a HPLC stanovenie sa uskutoční do 24 hodín od jeho prípravy.

4.1.2. Príprava vzorky s prídavkom vnútorného štandardu

Do 50 ml skúmavky so skrutkovacím uzáverom (3.5) sa naváži s presnosťou na tri desatinné miesta $1 \pm 0,1$ g (a gramov) vzorky. Pipetou sa pridá 1,00 ml 2 M roztoku kyseliny sírovej (2.10) a 30,0 ml zmesi etanol/voda (2.13). Pridá sa približne 1 g varných kamienkov (3.7) a 10,00 ml roztoku vnútorného štandardu (2.14). Skúmavka sa uzavrie a intenzívne sa pretrepáva aspoň jednu minútu, kým sa nezíska homogénna suspenzia. Na uľahčenie extrakcie konzervačných látok do etanolickej fázy sa skúmavka umiestni presne na päť minút do vodného kúpeľa (3.1) udržiavaného na 60 °C.

Skúmavka sa ihneď ochladí pod prúdom studenej vody a extrakt sa uskladní na jednu hodinu pri teplote 5 °C.

Extrakt sa prefiltruje cez filtračný papier (3.4). Približne 2 ml extraktu sa prenese do sklenenej vzorkovnice (3.6). Extrakt sa uschováva pri teplote 5 °C a HPLC stanovenie sa uskutoční do 24 hodín od jeho prípravy.

4.2. Vysoko účinná kvapalinová chromatografia

Mobilná fáza: acetonitril/octanový tlmivý roztok (2.15).

Prietoková rýchlosť mobilnej fázy cez kolónu sa nastaví na $2,0 \pm 0,5$ ml/minútu. Detektor sa nastaví na vlnovú dĺžku 240 nm.

4.2.1. Kalibrácia

Do kvapalinového chromatografu (3.2) sa vstreknú 10 µl dávky každého zo štandardných roztokov konzervačných látok (2.17). Pre každý roztok sa stanoví pomer výšky píku skúmanej konzervačnej látky k výške píku vnútorného štandardu získaných z chromatogramov. Pre každú konzervačnú látku sa zostrojí graf závislosti výšky píku od koncentrácie každého štandardného roztoku.

Overí sa, či sa pre štandardné roztoky postupom pre kalibráciu získala lineárna závislosť.

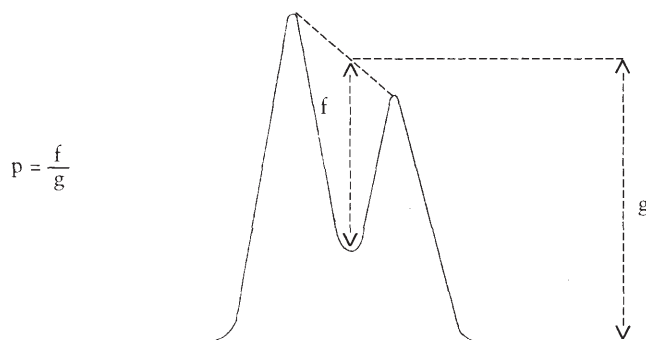
4.2.2. Stanovenie

Do kvapalinového chromatografu (3.2) sa nadávkuje 10 µl extraktu vzorky (4.1.1) a zaznamená sa chromatogram. Nadávkuje sa 10 µl štandardného roztoku konzervačnej látky (2.17) a zaznamená sa chromatogram. Získané chromatogramy sa porovnávajú. Ak sa na chromatograme extraktu vzorky (4.1.1) neobjaví žiadny pík s približne rovnakým retenčným časom, ako má kyselina 2-metoxybenzoová (odporúčaný vnútorný štandard), nadávkuje sa 10 µl extraktu vzorky s prídavkom vnútorného štandardu (4.1.2) a zaznamená sa chromatogram.

Ak sa v chromatograme extraktu vzorky (4.1.1) pozoruje rušiaci pík s rovnakým retenčným časom ako má kyselina 2-metoxybenzoová, vyberie sa iný vhodný vnútorný štandard. (Ak sa pík pre jednu zo skúmaných konzervačných látok nenachádza v chromatograme, táto konzervačná látka sa použije ako vnútorný štandard.)

Overí sa, či chromatogramy získané pre roztok štandardu a roztok vzorky spĺňajú nasledovné požiadavky:

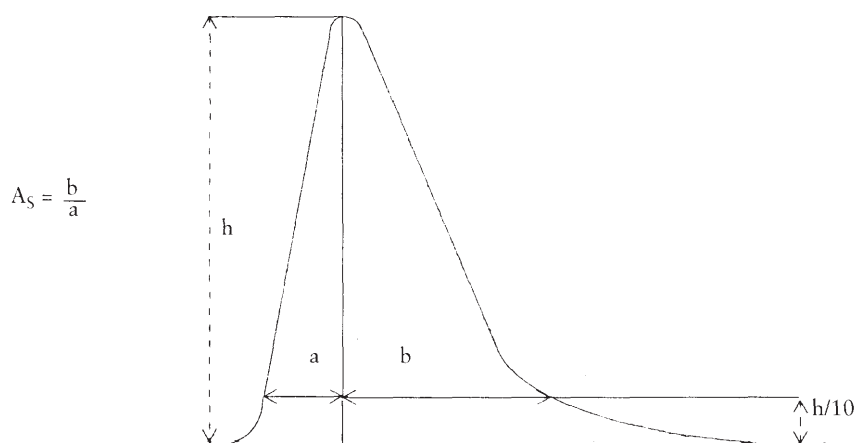
— rozlíšenie píkovo najhoršie oddeleného páru má byť aspoň 0,9. (Definíciu rozlíšenia píkovo pozri na obr. 1.)



Obr. 1: rozlíšenie pík

Ak sa nedosiahne požadované oddelenie pík, buď by sa mala použiť účinnejšia kolóna alebo by sa malo upravovať zloženie mobilnej fázy, až kým sa nesplní táto požiadavka.

- Koeficient asymetrie A všetkých získaných pík sa má pohybovať medzi 0,9 až 1,5. (Pre definíciu koeficienta asymetrie pozri obr. 2). Na zaznamenanie chromatogramu pre stanovenie koeficienta asymetrie sa odporúča rýchlosť zapisovacia aspoň 2 cm/minútu.



Obr. 2: koeficient asymetrie píku

- Má sa získať vyrovnaná základná čiara (base line).

5. Výpočet

Na výpočet koncentrácie kyslých konzervačných látok v roztoku vzorky sa použijú pomery výšok pík skúmaných konzervačných látok k výške píku kyseliny 2-metoxybenzoovej (vnútorného štandardu) a kalibračnej krivky. Obsah kyseliny benzoovej, 4-hydroxybenzoovej, kyseliny sorbovej alebo kyseliny salicylovej vo vzorke sa v hmotnostných percentách (x_i) vypočíta pomocou vzorca:

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

kde:

a = hmotnosť (g) skúšobnej vzorky (4.1.2),

b = koncentrácia (µg/ml) konzervačnej látky v extrakte vzorky (4.1.2) získaná z kalibračnej krivky.

6. Opakovateľnosť⁽¹⁾

Pri obsahu kyseliny 4-hydroxybenzoovej 0,40 % nemá rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelne uskutočnených stanovení na tej istej vzorke presiahnuť v absolútnej hodnote 0,035 %.

Pri obsahu kyseliny benzoovej 0,50 % nemá rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelne uskutočnených stanovení na tej istej vzorke presiahnuť v absolútnej hodnote 0,050 %.

Pri obsahu kyseliny salicylovej 0,50 % nemá rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelne uskutočnených stanovení na tej istej vzorke presiahnuť v absolútnej hodnote 0,045 %.

Pri obsahu kyseliny sorbovej 0,60 % nemá rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelne uskutočnených stanovení na tej istej vzorke presiahnuť v absolútnej hodnote 0,035 %.

7. Poznámky

7.1. Výsledky testu nehomogenity uskutočneného na tejto metóde ukazujú, že množstvo kyseliny sírovej pridanej do extraktu kyselín zo vzorky je kritické a ohraničenia pre množstvo spracovanej vzorky sa majú udržať v predpísaných medziach.

7.2. Ak je to žiaduce, použije sa primeraná predkolóna.

C. STANOVENIE KYSELINY PROPIÓNOVEJ**1. Rozsah a oblasť použitia**

Táto metóda je vhodná na stanovenie kyseliny propiónovej s maximálnou koncentráciou 2 % (hmotn.) v kozmetických výrobkoch.

2. Definícia

Koncentrácia kyseliny propiónovej stanovená touto metódou sa vyjadrí v hmotnostných percentách (% hmotn.) výrobku.

3. Princíp

Stanovenie kyseliny propiónovej sa po extrakcii z výrobku následne uskutoční prostredníctvom plynovej chromatografie s využitím kyseliny 2-metylpropánovej ako vnútorného štandardu.

4. Činidlá

Všetky činidlá musia byť analyticky čisté; musí byť použitá destilovaná voda alebo minimálne voda rovnocennej čistoty.

4.1. Etanol, 96 % (obj.).

4.2. Kyselina propiónová

4.3. Kyselina 2-metylpropánová

4.4. Kyselina trihydrogenfosforečná, 10 % (hmotn.).

4.5. Roztok kyseliny propiónovej

Do 50 ml odmernej banky sa presne naváži približne 1,00 g (p gramov) kyseliny propiónovej a doplní sa etanolom (4.1) po značku.

4.6. Roztok vnútorného štandardu

Do 50 ml odmernej banky sa presne naváži približne 1,00 g (e gramov) kyseliny 2-metylpropánovej a doplní sa etanolom (4.1) po značku.

⁽¹⁾ ISO 5725.

5. **Prístroje a pomôcky**

- 5.1. Bežné laboratórne vybavenie a:
- 5.2. Plynový chromatograf s plameňovo-ionizačným detektorom.
- 5.3. Sklená skúmavka (20 × 150 mm) so skrutkovacím uzáverom.
- 5.4. Vodný kúpeľ pri 60 °C
- 5.5. 10 ml sklená striekačka s membránovým filtrom (priemer pórov: 0,45 µm).

6. **Postup**6.1. **Príprava vzorky**6.1.1. **Príprava vzorky bez vnútorného štandardu**

Do sklenej skúmavky (5.3) sa naváži približne 1 g vzorky. Pridá sa 0,5 ml roztoku kyseliny fosforečnej (4.4) a 9,5 ml etanolu (4.1).

Skúmavka sa uzavrie a intenzívne sa pretrepe. Ak je to potrebné, skúmavka sa umiestni do vodného kúpeľa zahriateho na 60 °C (5.4) na päť minút, aby sa úplne rozpustila tuková vrstva. Rýchlo sa ochladí pod tečúcou vodou. Časť roztoku sa prefiltruje cez membránový filter (5.5). Filtrát sa chromatografuje v ten istý deň.

6.1.2. **Príprava vzorky s vnútorným štandardom**

Do sklenej skúmavky (5.3) sa naváži s presnosťou na tri desatinné miesta $1 \pm 0,1$ g (a gramov) vzorky. Pridá sa 0,5 ml roztoku kyseliny fosforečnej (4.4), 0,5 ml roztoku vnútorného štandardu (4.5) a 9 ml etanolu (4.1).

Skúmavka sa uzavrie a intenzívne sa pretrepe. Ak je to potrebné, skúmavka sa umiestni do vodného kúpeľa zahriateho na 60 °C (5.4) na päť minút, aby sa rozpustila tuková vrstva. Rýchlo sa ochladí pod tečúcou vodou. Časť roztoku sa prefiltruje cez membránový filter (5.5). Filtrát sa chromatografuje v ten istý deň.

6.2. **Podmienky pre plynovú chromatografiu**

Odporúčané sú nasledovné podmienky pre meranie:

Kolóna

typ	nehrdzavejúca oceľ
dĺžka	2 m
priemer	1/8"
náplň	10 % SP TM 1000 (alebo ekvivalent) + 1 % H ₃ PO ₄ na Chromosorb-e WAW 100 až 120 meš

Teplota

dávkovač	200 °C
kolóna	120 °C
detektor	200 °C
nosný plyn	dusík
prietoková rýchlosť	25 ml/min

6.3. **Chromatografia**6.3.1. **Kalibrácia**

Do série 20 ml odmerných baniek sa pipetou preniesie jednotlivo 0,25, 0,50, 1,00, 2,00 a 4,00 ml roztoku kyseliny propiónovej (4.5). Do každej odmernej banky sa pipetou preniesie po 1,00 ml roztoku vnútorného štandardu (4.6); doplní sa etanolom (4.1) po značku a premieša sa. Takto pripravené roztoky obsahujú e mg/ml kyseliny 2-metylpropánovej ako vnútorného štandardu (čo predstavuje 1 mg/ml, ak e = 1 000) a p/4, p/2, p, 2p a 4p mg/ml kyseliny propánovej (čo predstavuje 0,25, 0,50, 1,00, 2,00 a 4,00 mg/ml, ak p = 1 000).

Nadávkuje sa 1 µl každého z týchto roztokov a nanosením pomeru hmotnosti kyseliny propiónovej/kyseliny 2-metylpropánovej na os x a pomer zodpovedajúcich plôch pík na os y sa získa kalibračná krivka. Spravia sa tri vstreknutia každého roztoku a vypočíta sa pomer priemernej plochy píku.

Každý roztok sa nadáva trikrát a vypočíta sa priemerný pomer plochy píku.

6.3.2. Stanovenie

Nadávkuje sa 1 µl filtrátu vzorky 6.1.1. Chromatogram sa porovná s chromatogramom jedného zo štandardných roztokov (6.3.1).

Ak má pík približne rovnaký retenčný čas ako kyselina 2-metylpropánová, použije sa iný vnútorný štandard. Ak sa nepozoruje pík rušiaci stanovenie, nadáva sa 1 µl filtrátu vzorky 6.1.2 a zmerajú sa plochy píku kyseliny propiónovej a píku vnútorného štandardu.

7. Výpočty

7.1. Z kalibračnej krivky získanej v 6.3.1 sa získa pomer hmotnosti (K) zodpovedajúci ploche píkov, vypočítaný v 6.3.2.

7.2. Z takto získaného pomeru hmotnosti sa vypočíta obsah kyseliny propiónovej vo vzorke (x) ako hmotnostné percento pomocou vzorca:

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

kde:

K = pomer vypočítaný v 7.1,

e = hmotnosť vnútorného štandardu v gramoch, naváženého v 4.6.,

a = hmotnosť vzorky v gramoch, naváženej v 6.1.2.

Výsledky sa zaokrúhľia na jedno desatinné miesto.

8. Opakovateľnosť ⁽¹⁾

Pri obsahu kyseliny propiónovej 2 % (hmotn.) nemá rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelne uskutočnených stanovení na tej istej vzorke presiahnuť 0,12 %.

II. DÔKAZ A STANOVENIE HYDROCHINÓNU, MONOMETYLÉTERU HYDROCHINÓNU, MONOETYLÉTERU HYDROCHINÓNU A MONOBENZYLÉTERU HYDROCHINÓNU V KOZMETICKÝCH VÝROBKOCH

A. DÔKAZ

1. Rozsah a oblasť použitia

Metóda opisuje detekciu a dôkaz hydrochinónu, monometyléteru hydrochinónu, monoetyléteru hydrochinónu a monobenzyléteru hydrochinónu (monobenzónu) v kozmetických výrobkoch na zosvetľovanie pokožky.

2. Princíp

Hydrochinón a jeho étery sa dokážu tenkovrstvovou chromatografiou (TLC).

3. Činidlá

Všetky činidlá musia byť analyticky čisté.

⁽¹⁾ ISO 5725.

- 3.1. Etanol, 96 % (obj.).
- 3.2. Chloroform.
- 3.3. Dietyléter.
- 3.4. Vytvára rozpušťačová zmes:
chloroform/dietyléter, 66:33 (obj. diely).
- 3.5. Amoniak, 25 % vodný roztok (hmotn.) ($d_{4}^{20} = 0,91$ g/ml).
- 3.6. Kyselina askorbová
- 3.7. Hydrochinón
- 3.8. Monometyléter hydrochinónu
- 3.9. Monoetyléter hydrochinónu
- 3.10. Monobenzyléter hydrochinónu (monobenzón)
- 3.11. Referenčné roztoky
- Majú byť čerstvo pripravené nasledovné referenčné roztoky; sú stále jeden deň.
- 3.11.1. Do delenej 10 ml skúmavky sa naváži 0,05 g hydrochinónu (3.7). Pridá sa 0,250 g kyseliny askorbovej (3.6) a 5 ml etanolu (3.1). Pridáva sa roztok amoniaku (3.5), kým pH nie je 10 a doplní sa do objemu 10 ml etanolom (3.1).
- 3.11.2. Do delenej 10 ml skúmavky sa naváži 0,05 g monometyléru hydrochinónu (3.8). Pridá sa 0,250 g kyseliny askorbovej (3.6) a 5 ml etanolu (3.1). Pridáva sa roztok amoniaku (3.5), kým pH nie je 10 a doplní sa do objemu 10 ml etanolom (3.1).
- 3.11.3. Do delenej 10 ml skúmavky sa naváži 0,05 g monoetyléru hydrochinónu (3.9). Pridá sa 0,250 g kyseliny askorbovej (3.6) a 5 ml etanolu (3.1). Pridáva sa roztok amoniaku (3.5), kým pH nie je 10 a doplní sa do objemu 10 ml etanolom (3.1).
- 3.11.4. Do delenej 10 ml skúmavky sa naváži 0,05 g monobenzyléru hydrochinónu (3.10). Pridá sa 0,250 g kyseliny askorbovej (3.6) a 5 ml etanolu (3.1). Pridáva sa roztok amoniaku (3.5), kým pH nie je 10 a doplní sa do objemu 10 ml etanolom (3.1).
- 3.12. Dusičnan strieborný
- 3.13. Kyselina fosforečnano-dodekamolybdénová
- 3.14. Hexahydrát hexakyno-železitanu draselného
- 3.15. Hexahydrát chloridu železitého
- 3.16. Činidlá na postriekanie chromatogramu
- 3.16.1. Do 5 % (hmotn.) vodného roztoku dusičnanu strieborného (3.12) sa pridá roztok amoniaku (3.5), kým sa vytvorená zrazenina nerozpustí.
- Upozornenie:
- tento roztok sa stávaním stáva explozívne nestabilný a má sa po použití vyliať.
- 3.16.2. 10 % (hmotn.) roztok kyseliny fosforečnano-dodekamolybdénovej (3.13) v etanole (3.1).

- 3.16.3. Pripraví sa 1 % (hmotn.) vodný roztok hexakynoželezitanu draselného (3.14) a 2 % (hmotn.) vodný roztok chloridu železitého (3.15). Tesne pred použitím sa zmiešajú rovnaké diely oboch roztokov.

4. Prístroje a pomôcky

Bežné laboratórne vybavenie a:

- 4.1. Bežné vybavenie na TLC
- 4.2. Hotové TLC platne: silikagél GHR/UV₂₅₄; 20 × 20 cm (Machery, Nagel alebo ich ekvivalent). Hrúbka vrstvy 0,25 mm.
- 4.3. Ultrazvukový kúpeľ
- 4.4. Centrifúga
- 4.5. UV lampa, 254 nm

5. Postup

5.1. Príprava vzorky

Do 10 ml delenej skúmavky sa navážia 3,0 g vzorky. Pridá sa 0,250 g kyseliny askorbovej (3.6) a 5 ml etanolu (3.1). S použitím roztoku amoniaku (3.5) sa pH upraví na 10. Etanolom (3.1) sa doplní do objemu 10 ml. Skúmavka sa uzavrie zátkou a 10 minút sa homogenizuje v ultrazvukovom kúpeli. Prefiltruje sa cez filtračný papier alebo odstredí na centrifúge pri 3 000 ot./min.

5.2. TLC

5.2.1. Chromatografická komora sa nasýti parami vyvíjacej rozpúšťadlovej zmesi (3.4).

5.2.2. Na platňu sa nanesú po 2 µl referenčných roztokov (3.11) a 2 µl roztoku vzorky (5.1). Vyvíja sa v tme pri laboratórnej teplote, kým čelo rozpúšťadlovej zmesi nevystúpi do vzdialenosti 15 cm od štartu.

5.2.3. Platňa sa vyberie a nechá sa vysušiť pri laboratórnej teplote.

5.3. Detekcia

5.3.1. Platňa sa pozoruje pod UV svetlom pri 254 nm a označia sa polohy škvrn.

5.3.2. Platňa sa postrieka:

— činidlom s dusičnanom strieborným (3.16.1) alebo

— činidlom s kyselinou fosforečnano-dodekamolybdénovou (3.16.2) a zahreje sa na 120 °C alebo

— roztokom hexakynoželezitanu draselného a roztokom chloridu železitého (3.16.3).

6. Dôkaz

Vypočítajú sa *R_f* hodnoty pre každú škvrnu.

Porovnávajú sa škvrny získané pre roztok vzorky so škvrnami referenčných roztokov so zreteľom na: ich *R_f* hodnoty; farbu škvrn pod UV svetlom; a farbu škvrn po ich vizualizácii postriekaním činidlom.

Ukutoční sa HPLC opísaná v nasledujúcom oddiele (B) a porovnávajú sa retenčné časy zistené pre píky vzorky s retenčnými časmi píkov referenčných roztokov.

Výsledky TLC a HPLC na dôkaz prítomnosti hydrochinónu a/alebo jeho esterov sa skombinujú.

7. Poznámky

Za opísaných podmienok boli pozorované nasledovné *R_f* hodnoty:

hydrochinón:	0,32
monometyléter hydrochinónu:	0,53
monoetyléter hydrochinónu:	0,55
monobenzyléter hydrochinónu:	0,58

B. STANOVENIE

1. Rozsah a oblasť použitia

Táto metóda bližšie určuje postup na stanovenie hydrochinónu, monometyléru hydrochinónu, monoetyléru hydrochinónu a monobenzyléru hydrochinónu v kozmetických výrobkoch na zosvetľovanie pokožky.

2. Princíp

Za mierneho zahrievania, pri ktorom sa roztopí všetok tukový materiál, sa vzorka extrahuje zmesou voda/etanol. Stanovenie analytov vo výslednom roztoku sa uskutoční kvapalinovou chromatografiou s obrátenou fázou s UV detekciou.

3. Činidlá

3.1. Všetky činidlá musia byť analyticky čisté. Použitá voda musí byť destilovaná alebo minimálne voda rovnocennej čistoty.

3.2. Metanol

3.3. Hydrochinón

3.4. Monometyléter hydrochinónu

3.5. Monoetyléter hydrochinónu

3.6. Monobenzyléter hydrochinónu (monobenzón)

3.7. Tetrahydrofurán kvality pre HPLC

3.8. Zmes metanol/voda 1:1 (obj. diely). Zmieša sa jeden objemový diel vody a jeden objemový diel metanolu (3.2).

3.9. Mobilná fáza: zmes tetrahydrofurán/voda 45:55 (obj. diely). Zmieša sa 45 objemových dielov tetrahydrofuránu (3.7) a 55 objemových dielov vody.

3.10. Referenčný roztok

Do 50 ml odmernej banky sa naváži 0,06 g hydrochinónu (3.3), 0,08 g monometyléru hydrochinónu (3.4), 0,10 g monoetyléru hydrochinónu (3.5) a 0,12 g monobenzyléru hydrochinónu (3.6). Rozpustí sa v metanole (3.2.) a doplní sa ním po značku. Referenčný roztok sa pripraví zriedením 10,00 ml tohto roztoku doplnením do 50,00 ml zmesou voda/metanol (3.8). Tieto roztoky musia byť čerstvo pripravené.

4. Prístroje a pomôcky

Bežné laboratórne vybavenie a:

4.1. Vodný kúpeľ, s možnosťou dosiahnuť teplotu 60 °C

4.2. Vysoko účinný kvapalinový chromatograf s nastaviteľným UV detektorom a 10 µl dávkovacou slučkou

4.3. Analytická kolóna

Chromatografická kolóna z nehrdzavejúcej ocele, dlhá 250 mm, s vnútorným priemerom 4,6 mm, naplnená fenyl-Zorbaxom (fenetylsilánom chemicky naviazaným na Zorbax SIL, na koncoch ukončeným chlórtrimetylsilánom), s veľkosťou častíc 6 µm alebo ekvivalentná kolóna. Nepoužíva sa predkolóna, okrem fenylovej predkolóny alebo jej ekvivalentu.

- 4.4. Filtračný papier s priemerom 90 mm, Schleicher and Schull, Weissband č. 5892 alebo jeho ekvivalent

5. Postup

5.1. Príprava vzorky

Do 50 ml odmernej banky sa naváži s presnosťou na tri desatinné miesta $1 \pm 0,1$ g (a gramov) vzorky. Vzorka sa disperguje v 25 ml zmesi voda/metanol (3.8). Banka sa uzavrie a intenzívne sa pretrepáva, kým sa nezíska homogénna suspenzia. Pretrepáva sa aspoň jednu minútu. Banka sa umiestni do vodného kúpeľa (4.1) zahriateho na 60°C na uľahčenie extrakcie. Banka sa ochladí a doplní sa po značku zmesou voda/metanol (3.8). Extrakt sa prefiltruje cez filtračný papier (4.4). HPLC stanovenie sa uskutoční do 24 hodín od prípravy extraktu.

5.2. Vysoko účinná kvapalinová chromatografia.

- 5.2.1. Prietoková rýchlosť mobilnej fázy (3.9) sa nastaví na 1,0 ml/min a detektor sa nastaví na vlnovú dĺžku 295 nm.

- 5.2.2. Nadávkuje sa 10 μl roztoku vzorky získanej, ako je opísané v bode 5.1 a zaznamenaná sa chromatogram. Merajú sa plochy pík. Uskutoční sa kalibrácia, ako je opísané v 5.2.3. Porovnajú sa chromatogramy získané pre vzorku a roztoky štandardov. Na výpočet koncentrácie analytov v roztoku vzorky sa použije plocha pík a odozvové faktory (RF) vypočítané v 5.2.3.

5.2.3. Kalibrácia

Nadávkuje sa 10 μl referenčného roztoku (3.10) a zaznamenaná sa chromatogram. Dávkuje sa niekoľkokrát, kým sa nedosiahne konštantná plocha píku.

Stanoví sa odozvový faktor RF_i :

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

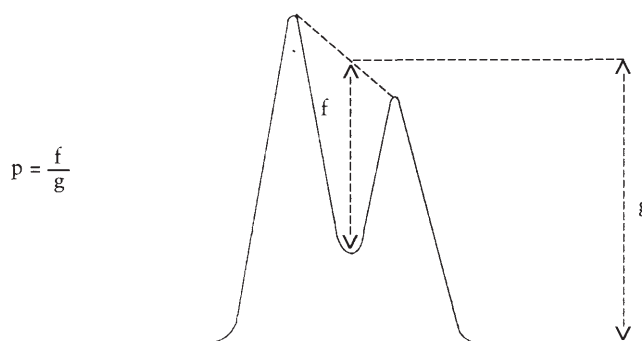
kde:

P_i = plocha píku hydrochinónu, monometyléteru hydrochinónu, monoetyléteru hydrochinónu alebo monobenzyléteru hydrochinónu a

C_i = koncentrácia (g/50ml) referenčného roztoku (3.10) hydrochinónu, monometyléteru hydrochinónu, monoetyléteru hydrochinónu alebo monobenzyléteru hydrochinónu.

Overí sa, či chromatogramy získané pre roztok štandardu a roztok vzorky spĺňajú nasledovné požiadavky:

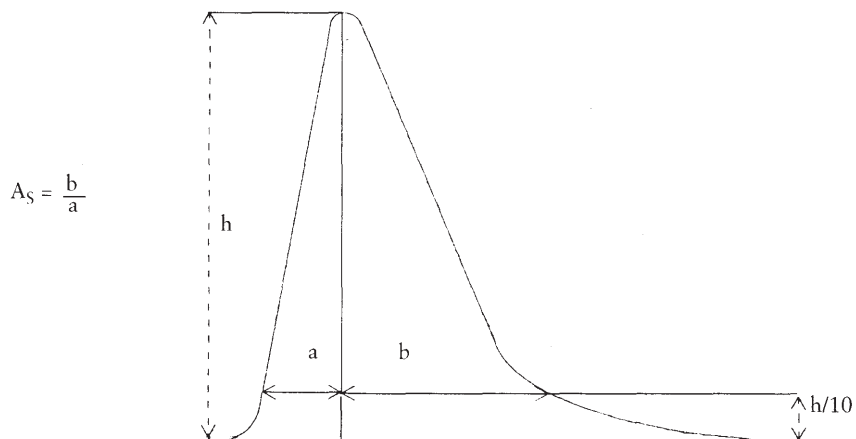
— rozlíšenie pík najhoršie oddeleného páru má byť aspoň 0,9. (Pre definíciu rozlíšenia pík pozri obr. 1.)



Obr. 1: rozlíšenie pík

Ak sa nedosiahne požadované oddelenie pík, buď by sa mala použiť účinnejšia kolóna alebo by sa malo upravovať zloženie mobilnej fázy, až kým sa nesplní táto požiadavka.

- Koeficient asymetrie A_s všetkých získaných pík sa má pohybovať medzi 0,9 až 1,5. (Definíciu koeficientu asymetrie pozri na obr. 2). Na zaznamenanie chromatogramu na stanovenie koeficientu asymetrie sa odporúča rýchlosť zapisovača aspoň 2 cm/minútu.



Obr. 2: koeficient asymetrie píku

- Má sa získať vyrovnaná základná čiara (base line).

6. Výpočet

Na výpočet koncentrácie analytu (analytov) vo vzorke sa použijú plochy pík analytov. Koncentrácia analytov vo vzorke sa vypočíta ako hmotnostné percento (x_i) pomocou vzorca:

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

kde:

a = hmotnosť vzorky v gramoch

b_i = plocha píku analytu i vo vzorke.

7. Opakovateľnosť ⁽¹⁾

- 7.1. Pri obsahu hydrochinónu 2,0 % nemá rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelne uskutočnených stanovení na tej istej vzorke presiahnuť v absolútnej hodnote 0,13 %.
- 7.2. Pri obsahu monometyléteru hydrochinónu 1,0 % nemá rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelne uskutočnených stanovení na tej istej vzorke presiahnuť v absolútnej hodnote 0,1 %.
- 7.3. Pri obsahu monoetyléteru hydrochinónu 1,0 % nemá rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelne uskutočnených stanovení na tej istej vzorke presiahnuť v absolútnej hodnote 0,11 %.
- 7.4. Pri obsahu monobenzyléteru hydrochinónu 1,0 % nemá rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelne uskutočnených stanovení na tej istej vzorke presiahnuť v absolútnej hodnote 0,11 %.

8. Reprodukovateľnosť ⁽¹⁾

- 8.1. Pri obsahu hydrochinónu 2,0 % nemá rozdiel medzi výsledkami dvoch stanovení uskutočnených s tou istou vzorkou za rozdielnych podmienok (rôzne laboratória, rôzni pracovníci, rozdielne prístroje a/alebo rozdielny čas) presiahnuť v absolútnej hodnote 0,37 %.

⁽¹⁾ ISO 5725.

- 8.2. Pri obsahu monometyléteru hydrochinónu 1,0 % nemá rozdiel medzi výsledkami dvoch stanovení uskutočnených s tou istou vzorkou za rozdielnych podmienok (rôzne laboratória, rôzni pracovníci, rozdielne prístroje a/alebo rozdielny čas) presiahnuť v absolútnej hodnote 0,21 %.
- 8.3. Pri obsahu monoetyléteru hydrochinónu 1,0 % nemá rozdiel medzi výsledkami dvoch stanovení uskutočnených s tou istou vzorkou za rozdielnych podmienok (rôzne laboratória, rôzni pracovníci, rozdielne prístroje a/alebo rozdielny čas) presiahnuť v absolútnej hodnote 0,19 %.
- 8.4. Pri obsahu monobenzyléteru hydrochinónu 1,0 % nemá rozdiel medzi výsledkami dvoch stanovení uskutočnených s tou istou vzorkou za rozdielnych podmienok (rôzne laboratória, rôzni pracovníci, rozdielne prístroje a/alebo rozdielny čas) presiahnuť v absolútnej hodnote 0,11 %.

9. Poznámky

- 9.1. Ak sa zistí, že obsah hydrochinónu je podstatne vyšší ako 2 % a vyžaduje sa presné predbežné ohodnotenie jeho obsahu, extrakt vzorky (5.1) sa zriedi na koncentráciu blízku koncentrácii, aká zodpovedá vzorke obsahujúcej 2 % hydrochinónu a stanovenie sa zopakuje.

(Na niektorých prístrojoch môže byť pri vyšších koncentráciách hydrochinónu absorbanca mimo lineárnej oblasti detektora.)

9.2. Interferencie

Opísaná metóda umožňuje stanovenie hydrochinónu a jeho éterov v jednoduchom izokratickom prevedení. Použitie fenylovej kolóny zabezpečuje dostatočnú retenciu hydrochinónu, ktorá nemôže byť zaručená pri použití C18 kolóny a opísanej mobilnej fáze.

Táto metóda je predsa len citlivá na rušiacie prímеси mnohých parabénov. V takýchto prípadoch by sa stanovenie malo zopakovať s použitím sústavy inej mobilnej fázy a stacionárnej fázy. Vhodné metódy sa dajú nájsť v odkazoch 1 a 2, najmä:

Kolóna: Zorbax ODS, 4,6 mm × 25 mm alebo jej ekvivalent:

teplota: 36 °C

prietoková rýchlosť: 1,5 ml/min

mobilná fáza:

pre hydrochinón: metanol/voda 5/95 (obj. diely)

pre monometyléter hydrochinónu: metanol/voda 30/70 (obj. diely)

pre monobenzyléter hydrochinónu: metanol/voda 80/20 (obj. diely) ⁽¹⁾.

Kolóna: Spherisorb S5-ODS alebo jej ekvivalent:

mobilná fáza: voda/metanol 90/10 (obj. diely)

prietoková rýchlosť: 1,5 ml/min.

Tieto podmienky sú vhodné pre hydrochinón ⁽²⁾.

⁽¹⁾ M. Herpol-Borremans a M.-O. Masse: Identification et dosage de l'hydroquinone et de ses éthers méthylque et benzylique dans le produits cosmétiques pour blanchir la peau. (Identifikácia a stanovenie hydrochinónu a jeho metyl- a benzyléteru v kozmetických výrobkoch na zosvetľovanie pleti) Int. J. Cosmet. Sci. 8-203-214 (1986).

⁽²⁾ J. Firth a I. Rix: Determination of hydroquinone in skin toning creams (Stanovenie hydrochinónu v tónovacích krémoch), Analyst 111, s. 129 (1986).