

31995L0032

L 178/20

URADNI LIST EVROPSKIH SKUPNOSTI

28.7.1995

**ŠESTA DIREKTIVA KOMISIJE 95/32/ES****z dne 7. julija 1995****o analiznih metodah, ki so potrebne za preverjanje sestave kozmetičnih izdelkov****(Besedilo velja za EGP)**

KOMISIJA EVROPSKIH SKUPNOSTI JE

ob upoštevanju Pogodbe o ustanovitvi Evropske gospodarske skupnosti,

ob upoštevanju Direktive Sveta 76/768/EGS z dne 27. julija 1976 o približevanju zakonodaje držav članic v zvezi s kozmetičnimi izdelki<sup>(1)</sup>, kakor je bila nazadnje spremenjena z Direktivo Komisije 94/32/ES<sup>(2)</sup>, in zlasti člena 8(1) Direktive,

ker Direktiva 76/768/EGS predpisuje uradno preskušanje kozmetičnih izdelkov, da bi zagotovila izpolnitev pogojev o sestavi kozmetičnih izdelkov, predpisanih v določbah Skupnosti;

ker je vse potrebne analizne metode treba določiti čimprej; ker so bili nekateri postopki že sprejeti z Direktivo Komisije 80/1335/EGS<sup>(3)</sup>, kakor je bila spremenjena z Direktivo 87/143/EGS<sup>(4)</sup>, 82/434/EGS<sup>(5)</sup>, kakor je bila spremenjena z Direktivo 90/207/EGS<sup>(6)</sup>, 83/514/EGS<sup>(7)</sup>, 85/490/EGS<sup>(8)</sup> in 93/73/EGS<sup>(9)</sup>;

ker kvalitativno in kvantitativno določanje benzojske kisline, 4-hidroksibenzojske kisline, sorbinske kisline, salicilne kisline in propionske kisline v kozmetičnih izdelkih ter kvalitativno in kvantitativno določanje hidrokinona, hidrokinonskega monometiletra, hidrokinonskega monoetiletra in hidrokinonskega monobenziletra v kozmetičnih izdelkih sestavljajo šesti korak;

ker so ukrepi iz te direktive v skladu z mnenjem Odbora za prilagajanje Direktive 76/768/EGS tehničnemu napredku,

SPREJELA NASLEDNJO DIREKTIVO:

**Člen 1**

Države članice sprejmejo vse potrebne ukrepe za zagotovitev, da je med uradnim preskušanjem kozmetičnih izdelkov:

— kvalitativno in kvantitativno določanje benzojske kisline, 4-hidroksibenzojske kisline, sorbinske kisline, salicilne kisline in propionske kisline,

— kvalitativno in kvantitativno določanje hidrokinona, hidrokinonskega monometiletra, hidrokinonskega monoetiletra in hidrokinonskega monobenziletra,

opravljeno v skladu s postopki, opisanimi v Prilogi.

**Člen 2**

1. Države članice sprejmejo zakone in druge predpise, potrebne za uskladitev s to direktivo, najpozneje do 30. septembra 1996. O tem takoj obvestijo Komisijo.

Države članice se v sprejetih predpisih sklicujejo na to direktivo ali pa sklic nanjo navedejo ob njihovi uradni objavi. Način sklicevanja določijo države članice.

2. Države članice predložijo Komisiji besedila predpisov nacionalne zakonodaje, sprejetih na področju, ki ga ureja ta direktiva.

**Člen 3**

Ta direktiva začne veljati dvajseti dan po objavi v *Uradnem listu Evropskih skupnosti*.

**Člen 4**

Ta direktiva je naslovljena na države članice.

V Bruslju, 7. julija 1995

Za Komisijo

Emma BONINO

Članica Komisije

<sup>(1)</sup> UL 262, 27.9.1976, str. 169.

<sup>(2)</sup> UL 181, 15.7.1994, str. 31.

<sup>(3)</sup> UL 383, 31.12.1980, str. 27.

<sup>(4)</sup> UL 57, 27.2.1987, str. 56.

<sup>(5)</sup> UL 185, 30.6.1982, str. 1.

<sup>(6)</sup> UL 108, 28.4.1990, str. 92.

<sup>(7)</sup> UL 291, 24.10.1983, str. 9.

<sup>(8)</sup> UL 295, 7.11.1985, str. 30.

<sup>(9)</sup> UL 231, 14.9.1993, str. 34.

## PRILOGA

**I. KVALITATIVNO IN KVANTITATIVNO DOLOČANJE BENZOJSKE KISLINE, 4-HIDROKSIBENZOJSKE KISLINE, SORBINSKE KISLINE, SALICILNE KISLINE IN PROPIONSKE KISLINE V KOZMETIČNIH IZDELKIH****1. Namen in področje uporabe**

Metoda je uporabna za kvalitativno in kvantitativno določanje benzojske kisline, 4-hidroksibenzojske kisline, sorbinske kisline, salicilne kisline in propionske kisline v kozmetičnih izdelkih. Ločeni postopki opisujejo kvalitativno določanje teh konzervansov; kvantitativno določanje propionske kisline in kvantitativno določanje 4-hidroksibenzojske kisline, salicilne kisline, sorbinske kisline in benzojske kisline.

**2. Opredelitev pojmov**

Količine benzojske kisline, 4-hidroksibenzojske kisline, salicilne kisline, sorbinske kisline in propionske kisline, določene po tej metodi, so izražene v masnih odstotkih prostih kislin.

**A. KVALITATIVNA DOLOČITEV****1. Princip**

Po ekstrakciji konzervansa v kislem se ekstrakt analizira s tankoplastno kromatografijo (TLC) z uporabo takojšnje derivatizacije. Glede na rezultate se kvalitativna določitev potrdi še s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC), pri propionski kislini pa s plinsko kromatografijo (GC).

**2. Reagenti****2.1 Splošno**

Vsi reagenti morajo biti analitsko čisti. Uporabljena voda mora biti destilirana ali vsaj ekvivalentne čistote.

**2.2 Aceton****2.3 Dietil eter****2.4 Acetonitril****2.5 Toluen****2.6 n-heksan****2.7 Parafin, tekoči****2.8 Klorovodikova kislina, 4 M****2.9 Kalijev hidroksid, vodni, 4 M****2.10 Kalcijev klorid,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$** **2.11 Litijev karbonat,  $\text{Li}_2\text{CO}_3$** **2.12 2-bromo-2'-acetonafon****2.13 4-hidroksibenzojska kislina****2.14 Salicilna kislina****2.15 Benzojska kislina****2.16 Sorbinska kislina****2.17 Propionska kislina**

- 2.18 Referenčne raztopine
- Pripravijo se 0,1 % (m/v) raztopine (100 mg/100 ml) vsakega od petih konzervansov (2.13 do 2.17) v dietil etru
- 2.19 Reagent za derivatizacijo
- 0,5 % (m/v) raztopina 2-bromo-2'-acetonafona (2.12) v acetonitrilu (2.4) (50 mg/10 ml). Raztopina se pripravi vsak teden posebej in se shranjuje v hladilniku
- 2.20 Raztopina katalizatorja
- 0,3 % (m/v) raztopina litijevega karbonata (2.11) v vodi (300 mg/100 ml). Raztopina se pripravi sveža
- 2.21 Topilo za razvijanje
- Toluen (2.5)/aceton (2.2) (20: 0,5, v/v)
- 2.22 Tekoči parafin (2.7)/n-heksan (2.6) (1: 2, v/v)

### 3. Aparatura

Običajna laboratorijska oprema

- 3.1 Vodna kopel, zmožna vzdrževati temperaturo na 60 °C
- 3.2 Posoda za razvijanje
- 3.3 Izvor ultravijolične svetlobe, 254 in 366 nm
- 3.4 Tankoplastne plošče, Kieselgel 60, brez fluorescenčnega indikatorja, 20 x 20 cm, debelina plasti 0,25 mm v koncentrirnem območju 2,5 x 20 cm (Merck 11845 ali ekvivalenten)
- 3.5 Mikrobrizga, 10 µl
- 3.6 Mikrobrizga, 25 µl
- 3.7 Peč za vzdrževanje temperature do 105 °C
- 3.8 50-mililitrske steklene epruvete z zamaškom na navoj
- 3.9 Filtrirni papir, premer 90 mm, Schleicher & Schull, Weissband št. 5892 ali ekvivalent
- 3.10 Univerzalni pH indikatorski papir, pH 1–11
- 3.11 5-mililitrske stekleničke za vzorce
- 3.12 Krožni izparjevalnik (Rotavapor ali ekvivalenten)
- 3.13 Grelna plošča

### 4. Postopek

#### 4.1 Priprava vzorca

Približno 1 g vzorca se odtehta v 50-mililitrsko stekleno epruveto z zamaškom na navoj (3.8). Dodajo se štiri kapljice 4 M klorovodikove kisline (2.8) in 40 ml acetona (2.2). Močno alkalnim proizvodom, kakor je toaletno milo, se doda še 20 kapljic 4 M klorovodikove kisline (2.8). Z indikatorskim papirjem (3.10) se preveri, ali je pH približno 2. Epruveta se zapre in eno minuto temeljito stresa.

Če je ekstrakcija konzervansov v acetonsko fazo treba pospešiti, se mešanica previdno segreje na približno 60 °C, da se vse faze utekočinijo.

Raztopina se ohladi na sobno temperaturo in se prefiltrira skozi filtrirni papir (3.9) v erlenmajerico.

20 ml filtrata se prenese v 200-mililitrsko erlenmajerico, se doda 20 ml vode in premeša. S 4 M kalijevim hidroksidom (2.9) se pH mešanice naravnajo na približno 10. Za kontrolo se uporabi indikatorski papir (3.10).

Doda se 1 g kalcijevega klorida (2.10) in se temeljito pretrese. Prefiltrira se skozi filtrirni papir (3.9) v 250-mililitrski lij ločnik s 75 ml dietiletra (2.3) in se temeljito stresa eno minuto. Pusti se, da se fazi ločita, in vodna faza se odlije v 250-mililitrsko erlenmajerico. Etrna faza se zavrže. Z uporabo indikatorskega papirja (3.10) se s 4 M klorovodikovo kislino (2.8) pH vodne raztopine naravnajo na približno 2. Doda se 10 ml dietiletra (2.3), bučka se zamaši in se temeljito stresa eno minuto. Pusti se, da se fazi ločita, in etrna faza se prenese v rotavapor (3.12). Vodna faza se zavrže.

Etrna faza se odpari skoraj do suhega in ostanek se raztopi v 1 ml dietiletra (2.3). Raztopina se prenese v stekleničko za vzorec (3.11).

#### 4.2 Tankoplastna kromatografija

Za vsako referenco in vzorec za kromatografijo se nanese približno 3  $\mu$ l raztopine litijevega karbonata (2.20) v enakih razdaljah z mikrobrizgo (3.5) na startno črto v koncentrirnem območju TLC plošče (3.4). Posuši se v toku mrzlega zraka.

TLC plošča se prenese na grelno ploščo (3.13), segreto na 40 °C, da lise ohranijo najmanjšo možno površino. Z mikrobrizgo (3.5) se nanese 10  $\mu$ l vsake referenčne raztopine (2.18) in raztopine vzorca (4.1) na startno črto plošče, natanko tja, kjer je nanesen litijev karbonat.

Na koncu se spet na natanko ista mesta, kjer so nanese referenčne raztopine/raztopine vzorca in litijev karbonat, nanese še po približno 15  $\mu$ l reagenta za derivatizacijo (2.19) (raztopina 2-bromo-2'-acetonafona).

TLC plošča se segreva v peči (3.7) pri 80 °C 45 minut. Po ohlajanju se plošča razvije v posodi za razvijanje (3.2), ki je bila ekvilibrirana 15 minut (brez uporabe ovoja filtrirnega papirja), uporabi se topilo za razvijanje 2.21 (toluen/acetone), dokler fronta ne doseže 15 cm (to lahko traja približno 80 minut).

Plošča se posuši v toku mrzlega zraka in dobljene lise se pregledajo pod izvorom UV-svetlobe (3.3). Za ojačitev šibkejših fluorescirajočih lis se TLC plošča potopi v tekoči parafin/n-heksan (2.22).

#### 5. Kvalitativna določitev

Izračuna se  $R_f$  za vsako liso.

Primerja se  $R_f$  in obnašanje lis vzorca pod UV z lisami referenčnih raztopin.

Naredi se ocena navzočnosti in vrste konzervansov v vzorcu. Izvede se HPLC, kakor je opisano v oddelku B, oziroma če je navzoča propionska kislina, GC, kakor je opisano v oddelku C. Primerjajo se retenzijski časi s časi referenčnih raztopin.

Združijo se rezultati, dobljeni s TLC in HPLC ali GC, in osnuje se končna kvalitativna določitev navzočih konzervansov v vzorcu na podlagi združenih rezultatov.

#### B. KVANTITATIVNO DOLOČANJE BENZOJSKE KISLINE, 4-HIDROKSIBENZOJSKE KISLINE, SORBINSKE KISLINE IN SALICILNE KISLINE

##### 1. Princip

Po nakisanju se vzorec ekstrahira z mešanico etanola in vode. Po filtraciji se izvede tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC).

##### 2. Reagenti

2.1 Vsi reagenti morajo biti analitsko čisti in ustrezati zahtevam za HPLC. Uporabljen voda mora biti destilirana voda ali voda vsaj ekvivalentne čistote.

2.2 Etanol, absolutni

2.3 4-hidroksibenzojska kislina

- 2.4 Salicilna kislina
- 2.5 Benzojska kislina
- 2.6 Sorbinska kislina
- 2.7 Natrijev acetat, ( $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ )
- 2.8 Ocetna kislina, ( $\alpha$ )<sub>4</sub><sup>20</sup> = 1,05 g/ml
- 2.9 Acetonitril
- 2.10 Žveplova kislina, 2 M
- 2.11 Kalijev hidroksid, vodni, 0,2 M
- 2.12 2-metoksibenzojska kislina
- 2.13 Mešanica etanola (2.2) in vode (2.1)  
v razmerju 9 : 1 (v/v)
- 2.14 Raztopina internega standarda  
Pripravi se raztopina približno 1 g 2-metoksibenzojske kisline (2.12) v 500 ml mešanice etanola in vode (2.13)
- 2.15 Mobilna faza za HPLC
- 2.15.1 Acetatni pufer: 1 l vode se doda 6,35 g natrijevega acetata (2.7) in 20,0 ml očetne kisline (2.8) in se premeša
- 2.15.2 Pripravi se mobilna faza iz mešanice acetatnega pufra (2.15.1) in acetonitrila (2.9.) v razmerju 9: 1 (v/v)
- 2.16 Zaloga raztopin konzervansov  
Natančno se odtehta približno 0,05 g 4-hidroksibenzojske kisline (2.3), 0,2 g salicilne kisline (2.4), 0,2 g benzojske kisline (2.5) in 0,05 g sorbinske kisline (2.6) v 50-mililitrsko merilno bučko. Do oznake se dolije mešanica etanol/voda (2.13). Ta raztopina se shrani v hladilniku. Ta raztopina je stabilna en teden
- 2.17 Standardne raztopine konzervansov  
Po 8,00; 4,00; 2,00; 1,00 in 0,50 ml raztopine konzervansov (2.16), vsaka posebej, se prenese v vrsto 20-mililitrskih merilnih bučk. V vsako bučko se doda 10,00 ml internega standarda (2.14) in 0,5 ml 2 M žveplove kisline (2.10). Do oznake se dolije mešanica etanol/voda (2.13). Te raztopine morajo biti sveže pripravljene
3. **Aparatura**
- Navadna laboratorijska oprema, če ni drugače določeno, in:
- 3.1 Vodna kopel, nastavljena na 60 °C
- 3.2 Kromatograf za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti z UV-detektorjem na spremenljivo valovno dolžino in 10- $\mu$ l injektorjem z zanko s stalnim volumnom
- 3.3 Analitska kolona  
Nerjaveče jeklo, dolžina 12,5 do 25 cm, notranji premer 4,6 mm, napolnjena z Nucleosilom 5C18 ali ekvivalentom
- 3.4 Filtrirni papir, premer: 90 mm, Schleicher in Schull, Weissband št. 5892 ali ekvivalent
- 3.5 50-mililitrske steklene epruvete z zamaškom na navoj

- 3.6 5-mililitrske stekleničke za vzorce
- 3.7 Vrelni kamenčki, karborund, velikosti 2 do 4 mm, ali ekvivalent

#### 4. Postopek

##### 4.1 Priprava vzorca

###### 4.1.1 Priprava vzorca brez dodatka internega standarda

1 g vzorca se odtehta v 50-mililitrsko stekleno epruveto z zamaškom na navoj (3.5). Odpipetira se 1,00 ml 2 M žveplove kisline (2.10) in 40,0 ml mešanice etanol/voda (2.13) v epruveto. Doda se približno 1 g vrelnih kamenčkov (3.7), se zapre z zamaškom in močno stresa vsaj eno minuto, da se suspenzija homogenizira. Za pospešitev ekstrakcije konzervansov v etanolno fazo se epruveta za natanko pet minut postavi v vodno kopel pri 60 °C (3.1).

Na hitro se epruveta ohladi v toku hladne vode in ekstrakt se za eno uro shrani pri 5 °C.

Ekstrakt se prefiltrira skozi filtrirni papir (3.4) in približno 2 ml filtrata se prenese v stekleničko za vzorec (3.6). Ekstrakt se shrani pri 5 °C in določanje s HPLC se izvede v 24 urah.

###### 4.1.2 Priprava vzorca z dodatkom internega standarda

Na tri decimalna mesta natančno se odtehta  $1 \pm 0,1$  g vzorca v 50-mililitrsko epruveto z zamaškom na navoj (3.5). S pipeto se doda 1,00 ml 2 M žveplove kisline (2.10) in 30,0 ml mešanice etanol/voda (2.13). Doda se približno 1 g vrelnih kamenčkov (3.7) in 10,00 ml raztopine internega standarda (2.14). Epruveta se zamaši in močno stresa vsaj eno minuto, da se suspenzija homogenizira. Za pospešitev ekstrakcije konzervansov v etanolno fazo se postavi epruveta za natanko pet minut v vodno kopel pri 60 °C (3.1).

Epruveta se na hitro ohladi v toku hladne vode in ekstrakt se za eno uro shrani pri 5 °C.

Ekstrakt se prefiltrira skozi filtrirni papir (3.4) in približno 2 ml filtrata se prenese v stekleničko za vzorec (3.6). Ekstrakt se shrani pri 5 °C in določanje s HPLC se izvede v 24 urah.

##### 4.2 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

Mobilna faza: acetonitril/acetatni puffer (2.15)

Nastavi se pretok mobilne faze skozi kolono na  $2,0 \pm 0,5$  ml na minuto in valovna dolžina na detektorju na 240 nm.

###### 4.2.1 Umeritev

Po 10 µl vsake standardne raztopine konzervansa (2.17) se vbrizga v aparat za tekočinsko kromatografijo (3.2). S kromatograma se za vsako raztopino konzervansa določi razmerje višin vrhov glede na vrh internega standarda. Nariše se diagram za vsak konzervans glede na razmerje višine vrha proti koncentraciji standardne raztopine.

Preveri se, da je umerjanje s standardnimi raztopinami v linearnem območju.

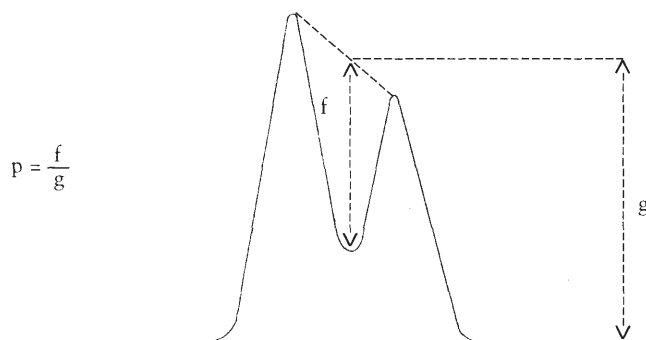
###### 4.2.2 Kvantitativno določanje

10 µl izvlečka (ekstrakta) vzorca (4.1.1) se vbrizga v tekočinski kromatograf (3.2) in posname se kromatogram. Vbrizga se 10 µl standardne raztopine konzervansa (2.17) in se posname kromatogram. Primerjata se dobljena kromatograma. Če v kromatogramu izvlečka (ekstrakta) vzorca (4.1.1) ni nobenega vrha z istim retenzijskim časom, kakor ga ima 2-metoksibenzojska kislina (priporočeni interni standard), se vbrizga 10 µl ekstrakta vzorca z dodanim internim standardom (4.1.2) v tekočinski kromatograf in se posname kromatogram.

Če je na kromatogramu vzorca (4.1.1) navzoč vrh, ki je preblizu vrha 2-metoksibenzojske kisline, se izbere drug ustrezen interni standard. (Če na kromatogramu manjka eden od preiskovanih konzervansov, se ta konzervans lahko uporabi kot interni standard.)

Preveri se, ali dobljeni kromatogram za standardno raztopino in raztopino vzorca ustreza naslednjim zahtevam:

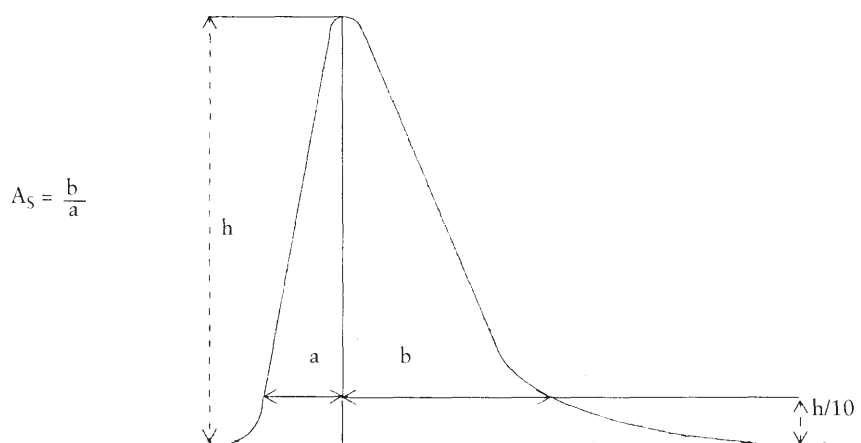
— Ločljivost vrha najslabše ločljivega para vrhov naj bo najmanj 0,90. (Za definicijo ločljivosti vrhov glej skico 1.)



Skica 1: Ločljivost vrhov

Če potrebna ločljivost ni dosežena, se uporabi bodisi učinkovitejša kolona ali pa je treba spremeniti sestavo mobilne faze, da rezultat ustreza zahtevi.

- Faktor asimetričnosti  $A_s$  vseh dobljenih vrhov naj bo med 0,9 in 1,5. (Za definicijo asimetričnosti vrhov glej skico 2). Za določanje faktorja asimetričnosti naj bo hitrost zapisa kromatograma vsaj 2 cm na minuto.



Skica 2: Faktor asimetričnosti vrha

- Osnovna črta naj bo ravna.

## 5. Izračun

Za izračun koncentracije kislih konzervansov v raztopini vzorca se uporabijo razmerja višin vrhov iskanih konzervansov proti višini vrha 2-metoksibenzojske kisline (interni standard) in umeritvena krivulja. Izračuna se vsebnost benzojske kisline, 4-hidroksibenzojske kisline, sorbinske kisline ali salicilne kisline v vzorcu kot masni odstotek ( $x_i$ ), z uporabo formule:

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

pri čemer je:

a = masa (v gramih) testnega vzorca (4.1.2),

b = koncentracija (v  $\mu\text{g/ml}$ ) konzervansa v ekstraktu vzorca (4.1.2), dobljena z umeritvene krivulje.

**6. Ponovljivost <sup>(1)</sup>**

Pri približno 0,40 % vsebnosti 4-hidroksibenzojske kisline naj razlika med rezultatoma dveh vzporednih meritev na istem vzorcu ne preseže absolutne vrednosti 0,035 %.

Pri približno 0,50 % vsebnosti benzojske kisline naj razlika med rezultatoma dveh vzporednih meritev na istem vzorcu ne preseže absolutne vrednosti 0,050 %.

Pri približno 0,50 % vsebnosti salicilne kisline naj razlika med rezultatoma dveh vzporednih meritev na istem vzorcu ne preseže absolutne vrednosti 0,045 %.

Pri približno 0,60 % vsebnosti sorbinske kisline naj razlika med rezultatoma dveh vzporednih meritev na istem vzorcu ne preseže absolutne vrednosti 0,035 %.

**7. Opombe**

7.1 Rezultati grobega testa, opravljenega po tej metodi, kažejo, da količina žveplove kisline, ki je dodana vzorcu za izločitev kislin, močno vpliva na končni rezultat, zato je pri doziranju treba upoštevati za vzorec predpisane omejitve.

7.2 Če je treba, se lahko uporabi varovalna kolona.

**C. KVANTITATIVNO DOLOČANJE PROPIONSKE KISLINE****1. Namen in področje uporabe**

Ta metoda je primerna za kvantitativno določanje propionske kisline največje koncentracije 2 % (m/m) v kozmetičnih izdelkih.

**2. Opredelitev pojmov**

Koncentracija propionske kisline, izmerjena po tej metodi, je izražena kot masni delež propionske kisline v izdelku (% m/m).

**3. Princip**

Po ekstrakciji propionske kisline iz izdelka se opravi kvantitativno določanje s plinsko kromatografijo z 2-metilpropionsko kislino kot internim standardom.

**4. Reagenti**

Vsi reagenti morajo biti analitsko čisti; uporabljena mora biti destilirana voda ali voda ekvivalentne kakovosti.

4.1 Etanol, 96 % (v/v)

4.2 Propionska kislina

4.3 2-metilpropionska kislina

4.4 Ortofosforna kislina, 10 % (m/v)

4.5 Raztopina propionske kisline

Natančno se odtehta približno 1,00 g (p gramov) propionske kisline v 50-mililitrsko merilno bučko in se do oznake dolije etanol (4.1)

4.6 Raztopina internega standarda

Natančno se odtehta približno 1,00 g (e gramov) 2-metilpropionske kisline v 50-mililitrsko merilno bučko in se do oznake dolije etanol (4.1).

<sup>(1)</sup> ISO 5725.



5. **Aparatura**

- 5.1 Običajna laboratorijska oprema in:
- 5.2 Plinski kromatograf s plamensko-ionizacijskim detektorjem (FID)
- 5.3 Steklena epruveta (20 × 150 mm) z zamaškom na navoj
- 5.4 Vodna kopel pri 60 °C
- 5.5 10-mililtrska steklena brizga s filtrirno membrano (premer por: 0,45 µm)

6. **Postopek**

- 6.1 Priprava vzorca
- 6.1.1 Priprava vzorca brez internega standarda

V stekleno epruveto (5.3) se odtehta približno 1 g vzorca. Doda se 0,5 ml fosforne kisline (4.4) in 9,5 ml etanola (4.1).

Epruveta se zamaši in temeljito pretrese. Če je potrebno, se postavi v vodno kopel pri 60 °C (5.4) za pet minut, da se lipidna faza popolnoma raztopi. Na hitro se ohladi pod tekočo vodo. Del raztopine se prefiltrira skozi membranski filter (5.5). Filtrat se kromatografira še isti dan.

- 6.1.2 Priprava vzorca z internim standardom

Na tri decimalna mesta natančno se  $1 \pm 0,1$  g (a gramov) vzorca odtehta v stekleno epruveto (5.3). Doda se 0,5 ml fosforne kisline (4.4), 0,5 ml raztopine internega standarda (4.6) in 9 ml etanola (4.1).

Epruveta se zamaši in temeljito pretrese. Če je potrebno, se postavi v vodno kopel pri 60 °C (5.4) za pet minut, da se lipidna faza popolnoma raztopi. Na hitro se ohladi pod tekočo vodo. Del raztopine se prefiltrira skozi membranski filter (5.5). Filtrat se kromatografira še isti dan.

- 6.2 Pogoji za plinsko kromatografijo

Priporočajo so naslednji operativni pogoji:

*Kolona*

Tip	Nerjaveče jeklo
Dolžina	2 m
Premer	1/8 "
Polnilo	10 % SP <sup>TM</sup> 1000 (ali ekvivalenten) + 1 % H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> na Chromosorb WAW 100 do 120 mesh

*Temperatura*

Injektor	200 °C
Kolona	120 °C
Detektor	200 °C
Nosilni plin	dušik
Pretok	25 ml/min

- 6.3 Kromatografija

- 6.3.1 Umeritev

V serijo 20-mililitrskih merilnih bučk se s pipeto prenese po 0,25, 0,50, 1,00, 2,00 in 4,00 ml raztopine propionske kisline (4.5). V vsako merilno bučko se s pipeto prenese še po 1,00 ml raztopine internega standarda (4.6). Do vrha se dolije etanol (4.1) in se premeša. Tako pripravljena raztopina vsebuje e mg/ml 2-metilpropionske kisline kot internega standarda (se pravi 1 mg/ml, če e = 1000) in p/4, p/2, p, 2p in 4p mg/ml propionske kisline (se pravi 0,25, 0,50, 1,00, 2,00 in 4,00 mg/ml, če p = 1000).

Vbrizga se po 1 µl vsake izmed teh raztopin in izriše umeritvena krivulja z vnesenimi razmerji mas propionske kisline/2-metilpropionske kisline na os x in z razmerjem ustreznih vrhov na os y.

Vsaka raztopina se vbrizga trikrat in se izračuna povprečni vrh.

#### 6.3.2 Kvalitativno določanje

Vbrizga se 1 µl vzorca filtrata 6.1.1. Kromatogram se primerja s tistim, dobljenim s standardno raztopino (6.3.1). Če ima vrh približno enak retencijski čas kot 2-metanolpropionska kislina, se interni standard spremeni. Če ni interference, se vbrizga 1 µl vzorca filtrata 6.1.2 in se izmeri površine vrha propionske kisline in vrh internega standarda.

Opravi se tri vbrizge vsake raztopine in izračunajo se povprečne površine vrhov.

### 7. Izračun

7.1 Iz umeritvene krivulje, dobljene v 6.3.1, se razbere razmerje mas (K), ustrezno izračunanemu vrhu v 6.3.2.

7.2 Iz tako dobljenega masnega razmerja se izračuna masni odstotek propionske kisline v vzorcu (X) po enačbi:

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

pri čemer je:

K = izračunano razmerje v 7.1,

e = masa v gramih internega standarda, stehtanega v 4.6,

a = masa v gramih vzorca, stehtanega v 6.1.2.

Končni rezultati se zaokrožijo na eno decimalno mesto.

### 8. Ponovljivost <sup>(1)</sup>

Pri 2 % vsebnosti propionske kisline (m/m) naj razlika med rezultatoma dveh zaporednih meritev na istem vzorcu ne presega 0,12 %.

## II. KVALITATIVNO IN KVANTITATIVNO DOLOČANJE HIDROKINONA, HIDROKINON MONOMETILETRA, HIDROKINON MONOETILETRA IN HIDROKINON MONOBENZILETRA V KOZMETIČNIH IZDELKIH

### A. KVALITATIVNO DOLOČANJE

#### 1. Namen in področje uporabe

Metoda opisuje kvalitativno in kvantitativno določanje hidrokinona, hidrokinon monometiletra, hidrokinon monoetiletra in hidrokinon monobenziletra v kozmetičnih izdelkih za posvetlitev kože.

#### 2. Princip

Kvalitativno določanje hidrokinona in njegovih etrov se izvaja s tankoplastno kromatografijo (TLC).

#### 3. Reagenti

Vsi reagenti morajo biti analitsko čisti.

<sup>(1)</sup> ISO 5725.

- 3.1 Etanol, 96 % (v/v)
- 3.2 Kloroform
- 3.3 Dietileter
- 3.4 Topilo za razvijanje:  
Kloroform/dietileter, 66 : 33 (v/v)
- 3.5 Amonijak, 25 % (m/m) ( $d_{4}^{20} = 0,91$  g/ml)
- 3.6 Askorbinska kislina
- 3.7 Hidrokinon
- 3.8 Hidrokinon monometileter
- 3.9 Hidrokinon monoetileter
- 3.10 Hidrokinon monobenzileter (monobenzon)
- 3.11 Referenčne raztopine
- Naslednje referenčne raztopine naj bodo sveže pripravljene in stabilne en dan.
- 3.11.1 0,05 g hidrokinona (3.7) se odtehta v 10-mililitrsko merilno epruveto. Doda se 0,250 g askorbinske kisline (3.6) in 5 ml etanola (3.1). Dodaja se amonijak (3.5), dokler pH ne doseže 10, in se do oznake 10 ml dopolni z etanolom.
- 3.11.2 0,05 g hidrokinona monometiletra (3.8) se odtehta v 10-mililitrsko merilno epruveto. Doda se 0,250 g askorbinske kisline (3.6) in 5 ml etanola (3.1). Dodaja se amonijak (3.5), dokler pH ne doseže 10, in se do oznake 10 ml dopolni z etanolom.
- 3.11.3 0,05 g hidrokinona monoetiletra (3.9) se odtehta v 10-mililitrsko merilno epruveto. Doda se 0,250 g askorbinske kisline (3.6) in 5 ml etanola (3.1). Dodaja se amonijak (3.5), dokler pH ne doseže 10, in se do oznake 10 ml dopolni z etanolom.
- 3.11.4 0,05 g hidrokinona monobenziletra (3.10) se odtehta v 10-mililitrsko merilno epruveto. Doda se 0,250 g askorbinske kisline (3.6) in 5 ml etanola (3.1). Dodaja se amonijak (3.5), dokler pH ne doseže 10, in se do oznake 10 ml dopolni z etanolom.
- 3.12 Srebrov nitrat
- 3.13 12-molibdofosforna kislina
- 3.14 Kalijev cianoferrat heksahidrat
- 3.15 Železov klorid, heksahidrat
- 3.16 Pršilni reagenti
- 3.16.1 V 5 % (m/v) vodno raztopino srebrovega nitrata (3.12) se dodaja amonijak (3.5), dokler se oborina ne raztopi.
- Opozorilo:*
- raztopina postane po daljši neuporabi eksplozivno nestabilna, zato je po uporabi ne hranimo.
- 3.16.2 10 % (m/v) raztopina 12-molibdofosorne kisline (3.13) v etanolu (3.1).

- 3.16.3 Priprava se 1 % (m/v) vodna raztopina kalijevega cianoferata (3.14) in 2 % (m/v) vodna raztopina železovega klorida (3.15). Tik pred uporabo se zmešata enaka dela obeh raztopin.

#### 4. Aparatura

Običajna laboratorijska oprema in:

- 4.1 Običajna TLC oprema
- 4.2 Že pripravljene TLC plošče: silikagel GHR/UV<sub>254</sub>; 20×20 cm (Machery, Nagel ali ekvivalent). Debelina plasti 0,25 mm.
- 4.3 Ultrazvočna kopel
- 4.4 Centrifuga
- 4.5 UV-svetilka, 254 nm

#### 5. Postopek

##### 5.1 Priprava vzorca

3,0 g vzorca se odtehta v 10-mililitrsko merilno epruveto. Doda se 0,250 g askorbinske kisline (3.6) in 5 ml etanola (3.1). Z uporabo amonijaka (3.5) se pH raztopina naravna na 10. Do oznake 10 ml se dolije z etanolom (3.1). Epruveta se zapre z zamaškom in homogenizira v ultrazvočni kopeli 10 minut. Filtrira se skozi filtrirni papir ali se centrifugira pri 3000 obr/min.

##### 5.2 TLC

5.2.1 Kromatografska posoda se nasiti s topilom za razvijanje (3.4).

5.2.2 Na ploščo se nakapa po 2  $\mu$ l referenčnih raztopin (3.11) in 2  $\mu$ l raztopine vzorca (5.1). Razvija se v temi in pri sobni temperaturi, dokler fronta ne doseže 15 cm.

5.2.3 Plošča se odstrani iz posode in se pusti, da se posuši pri sobni temperaturi.

##### 5.3 Detekcija

5.3.1 Plošča se pregleda pod UV-svetilko pri 254 nm in označijo se položaji lis.

5.3.2 Plošča se poprši z:

- reagentom srebrovega nitrata (3.16.1) ali
- reagentom 12-molibdofosforne kisline (3.16.2); segreje se na približno 120 °C, ali
- raztopino kalijevega cianoferata in raztopino železovega klorida (3.16.3).

#### 6. Kvalitativna določitev

Izračunaj R<sub>f</sub> za vsako liso.

Primerjaj lise, dobljene z raztopino vzorca, z lisami referenčnih raztopin glede na: njihove R<sub>f</sub> vrednosti; barvo lis pod UV-svetlobo in barvo lis, ki se pokažejo po popršenju z reagenti.

Izvede se HPLC, kakor je opisano v naslednjem oddelku (B), in primerjajo se retenzijski časi vrhov vzorca s časi referenčnih raztopin.

Rezultati iz TLC in HPLC se združijo, da se potrdi navzočnost hidrokinona in/ali njegovih etrov.

#### 7. Opombe

Pod opisanimi pogoji so bili dobljeni naslednji R<sub>f</sub>:

hidrokinon:	0,32
hidrokinon monometileter:	0,53
hidrokinon monoetileter:	0,55
hidrokinon monobenzileter:	0,58

## B. KVANTITATIVNA DOLOČITEV

### 1. Namen in področje uporabe

Ta metoda opisuje proces kvantitativnega določanja hidrokinona, hidrokinon monometiletra, hidrokinon monoetiletra in hidrokinon monobenziletra v kozmetičnih izdelkih za posvetlitev kože.

### 2. Princip

Vzorec se ekstrahira z mešanico vode in metanola ob previdnem segrevanju, da se stalijo vse lipidne snovi. Določanje analita v dobljeni raztopini se opravi s tekočinsko kromatografijo z reverzno fazo in UV-detekcijo.

### 3. Reagenti

3.1 Vsi reagenti morajo biti analitsko čisti. Uporabljena voda mora biti destilirana voda ali voda vsaj ekvivalentne čistote.

3.2 Metanol

3.3 Hidrokinon

3.4 Hidrokinon monometileter

3.5 Hidrokinon monoetileter

3.6 Hidrokinon monobenzileter (monobenzon)

3.7 Tetrahidrofur, sestavina topila HPLC

3.8 Mešanica voda/metanol 1 : 1 (v/v). En volumski del vode se zmeša z enim volumskim delom metanola. (3.2)

3.9 Mobilna faza: mešanica tetrahidrofur/voda 45 : 55 (v/v). 45 volumskih delov tetrahidrofurana (3.7) se zmeša s 55 volumskimi deli vode

3.10 Referenčna raztopina

0,06 g hidrokinona (3.3), 0,08 g hidrokinon monometiletra (3.4), 0,10 g hidrokinon monoetiletra (3.5) in 0,12 g hidrokinon monobenziletra (3.6) se odtehta v 50-mililitrsko merilno bučko. Raztopi se in do oznake dolije z metanolom (3.2). Referenčna raztopina se pripravi z razredčenjem 10,00 ml te raztopine na 50,00 ml z mešanico voda/metanol (3.8). Te raztopine morajo biti sveže pripravljene.

### 4. Aparatura

Običajna laboratorijska oprema in:

4.1 Vodna kopel, zmožna vzdrževati temperaturo na 60 °C

4.2 Kromatograf za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) z UV-detektorjem z nastavljivo valovno dolžino in 10- $\mu$ l injektorjem z zanko s stalnim volumnom

4.3 Analitska kolona:

Kolona iz nerjavečega jekla, dolžina 250 mm, notranji premer 4,6 mm, polnjena z Zorbax phenylom (kemijsko vezani fenetilsilan na Zorbax SIL, sklenjen s trimetilklorosilanom), velikost delcev 6  $\mu$ m, ali ekvivalent. Ne sme se uporabljati predkolona, razen fenilne, ali ekvivalent

4.4 Filtrirni papir, premer 90 mm, Schleicher in Schull, Weissband št. 5892, ali ekvivalent

## 5. Postopek

5.1 Priprava vzorca

Na tri decimalna mesta natančno se odtehta  $1 \pm 0,1$  g (a gramov) vzorca v 50-mililitrsko merilno bučko. Vzorec se raztopi v 25 ml mešanice voda/metanol (3.8). Bučka se zapre in temeljito pretrese, dokler se ne dobi homogena suspenzija. Stresa se vsaj eno minuto. Bučka se postavi v vodno kopel (4.1) pri  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , da se pospeši ekstrakcija. Bučka se ohladi in se do oznake dolije z mešanico voda/metanol (3.8). Ekstrakt se prefiltrira skozi filter papir (4.4). Določanje s HPLC se izvede v 24 urah.

5.2 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC).

5.2.1 Pretok mobilne faze (3.9) se nastavi na 1,0 ml/min in valovna dolžina detektorja na 295 nm.

5.2.2 Vbrizga se 10  $\mu\text{l}$  raztopine vzorca, dobljene, kakor je opisano v oddelku 5.1, in se posname kromatogram. Izmerijo se površine vrhov. Izvede se umeritev, kakor je opisano v 5.2.3. Kromatogram raztopine vzorca se primerja s kromatogrami standardnih raztopin. Z uporabo površin vrhov in faktorjev odziva (RF), izračunanih po 5.2.3, se izračuna koncentracija analitov v vzorcu.

5.2.3 Umeritev

Vbrizga se 10  $\mu\text{l}$  referenčne raztopine (3.10) in se posname kromatogram. Vbrizga se večkrat, dokler niso površine vrhov konstantne.

Določi se faktor občutljivosti  $RF_i$ :

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

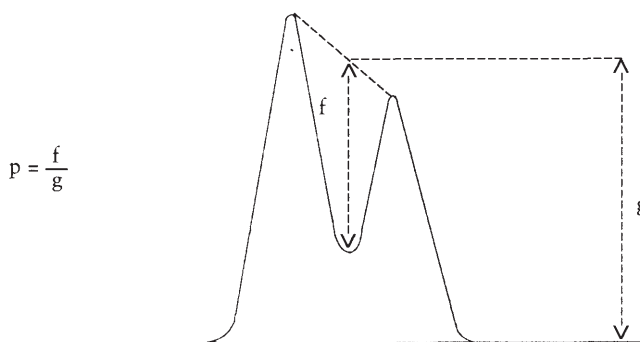
pri čemer je:

$P_i$  = površina vrha za hidrokinon, hidrokinon monometileter, hidrokinon monoetileter ali hidrokinon monobenzileter in

$c_i$  = koncentracija (g/50 ml) hidrokinona, hidrokinon monometiletra, hidrokinon monoetiletra ali hidrokinon monobenziletra v referenčni raztopini (3.10).

Preveri se, ali dobljeni kromatogram za standardno raztopino in raztopino vzorca ustreza naslednjim zahtevam:

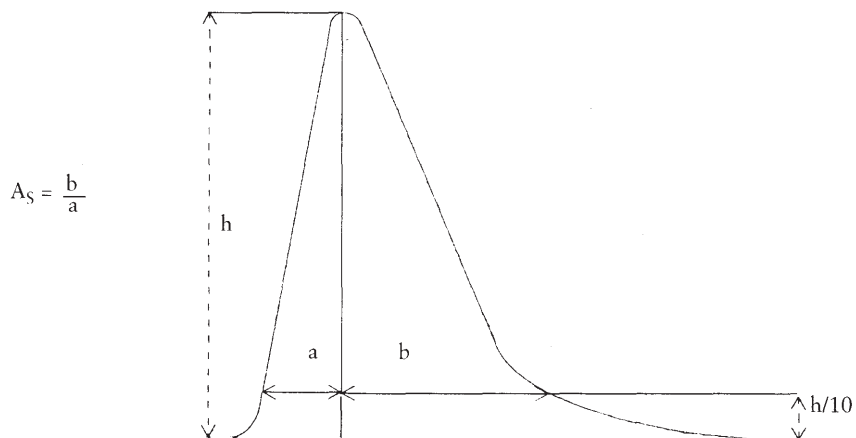
— Ločljivost vrha najslabše ločljivega para vrhov naj bo najmanj 0,90. (Za definicijo ločljivosti glej skico 1.)



Skica 1: Ločljivost vrhov

Če potrebna ločljivost ni dosežena, se uporabi učinkovitejša kolona ali pa je treba spremeniti sestavo mobilne faze, da rezultat ustreza zahtevi.

- Faktor asimetričnosti  $A_s$  vseh dobljenih vrhov naj bo med 0,9 in 1,5. (Za definicijo asimetričnosti vrhov glej skico 2.) Za določanje faktorja asimetričnosti naj bo hitrost zapisa kromatograma vsaj 2 cm na minuto.



Skica 2: Faktor asimetričnosti vrha

- Osnovna črta naj bo ravna.

## 6. Izračun

Uporabijo se področja vrhov analita za izračun koncentracije analitov v vzorcu. Koncentracija analita se izračuna kot masni delež v odstotkih ( $x_i$ ), po enačbi:

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

pri čemer je:

- $a$  = masa vzorca v gramih in
- $b_i$  = površina vrha analita  $i$  v vzorcu.

## 7. Ponovljivost <sup>(1)</sup>

- 7.1 Pri 2,0 % vsebnosti hidrokinona naj razlika med rezultatoma dveh vzporednih določanj na istem vzorcu ne presega absolutne vrednosti 0,13 %.
- 7.2 Pri 1,0 % vsebnosti hidrokinon monometiletra naj razlika med rezultatoma dveh vzporednih določanj na istem vzorcu ne presega absolutne vrednosti 0,1 %.
- 7.3 Pri 1,0 % vsebnosti hidrokinon monoetiletra naj razlika med rezultatoma dveh vzporednih določanj na istem vzorcu ne presega absolutne vrednosti 0,11 %.
- 7.4 Pri 1,0 % vsebnosti hidrokinon monobenziletra naj razlika med rezultatoma dveh vzporednih določanj na istem vzorcu ne presega absolutne vrednosti 0,11 %.

## 8. Ponovljivost postopka <sup>(1)</sup>

- 8.1 Pri 2,0 % vsebnosti hidrokinona naj razlika med rezultatoma dveh določanj na istem vzorcu pod drugačnimi pogoji (drugi laboratorij, laboranti, aparature in/ali čas) ne presega absolutne vrednosti 0,37 %.

<sup>(1)</sup> ISO 5725.

- 8.2 Pri 1,0 % vsebnosti hidrokinon monometiletra naj razlika med rezultatoma dveh določanj na istem vzorcu pod drugačnimi pogoji (drugi laboratorij, laboranti, aparature in/ali čas) ne presega absolutne vrednosti 0,21 %.
- 8.3 Pri 1,0 % vsebnosti hidrokinon monoetiletra naj razlika med rezultatoma dveh določanj na istem vzorcu pod drugačnimi pogoji (drugi laboratorij, laboranti, aparature in/ali čas) ne presega absolutne vrednosti 0,19 %.
- 8.4 Pri 1,0 % vsebnosti hidrokinon monobenziletra naj razlika med rezultatoma dveh določanj na istem vzorcu pod drugačnimi pogoji (drugi laboratorij, laboranti, aparature in/ali čas) ne presega absolutne vrednosti 0,11 %.

## 9. Opombe

- 9.1 Če je dobljeni rezultat vsebnosti hidrokinona opazno večji od 2 % in se zahteva točna ocena vsebine, se mora izvleček (ekstrakt) vzorca (5.1) razredčiti na podobno koncentracijo, kakor bi jo dobili iz vzorca z 2 % vsebnostjo hidrokinona, in določanje ponoviti.

(V nekaterih instrumentih je lahko absorbanca pri visokih koncentracijah hidrokinona zunaj linearnega območja detektorja.)

- 9.2 Interference

Zgoraj opisana metoda omogoča kvantitativno določanje hidrokinona in njegovih etrov v enem samem izokratnem temperaturnem programu. Uporaba fenilne kolone omogoča zadostno retenzijo hidrokinona, česar pa uporaba kolone C18 z opisano mobilno fazo ne zagotavlja.

Metoda je občutljiva na interference številnih parabenov. V takšnih primerih se določanje ponovi z uporabo drugega sistema mobilne in stacionarne faze. Ustrezne metode najdemo v referencah 1 in 2, namreč:

Kolona: Zorbax ODS, 4,6 mm × 25 mm, ali ekvivalent:

temperatura: 36 °C

pretok: 1,5 ml/min

mobilna faza:

za hidrokinon: metanol/voda 5/95 (V/V)

za hidrokinon monometileter: metanol/voda 30/70 (V/V)

za hidrokinon monobenzileter: metanol/voda 80/20 (V/V) <sup>(1)</sup>.

Kolona: Spherisorb S5-ODS ali ekvivalent:

mobilna faza: voda/metanol 90/10 (V/V)

pretok: 1,5 ml/min.

Ti pogoji so ustrezni za hidrokinon <sup>(2)</sup>.

<sup>(1)</sup> M. Herpol-Borremans in 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).

<sup>(2)</sup> J. Firth in I. Rix, Determination of hydroquinone in skin toning creams, *Analyst* (1986), 111, str. 129.