31995L0032

ŠESTÁ SMĚRNICE KOMISE 95/32/ES

ze dne 7. července 1995

o metodách analýzy nezbytných pro kontrolu složení kosmetických prostředků

(Text s významem pro EHP)

KOMISE EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ,

s ohledem na Smlouvu o založení Evropského společenství,

s ohledem na směrnici Rady 76/768/EHS ze dne 27. července 1976 o sbližování právních předpisů členských států týkajících se kosmetických prostředků ([1]), naposledy pozměněnou směrnicí Komise 94/32/ES ([2]), a zejména na čl. 8 odst. 1 uvedené směrnice,

vzhledem k tomu, že se ve směrnici 76/768/EHS stanoví úřední zkoušení kosmetických prostředků s cílem zajistit dodržení podmínek předepsaných předpisy Společenství, které se týkají složení kosmetických prostředků;

vzhledem k tomu, že by všechny nezbytné metody analýzy měly být stanoveny co nejdříve; že některé metody již byly přijaty ve směrnici Komise 80/1335/EHS ([3]) ve znění směrnice 87/143/EHS ([4]), směrnici 82/434/EHS ([5]) ve znění směrnice 90/207/EHS ([6]) a ve směrnicích 83/514/EHS ([7]), 85/490/EHS ([8]) a 93/73/EHS ([9]);

vzhledem k tomu, že důkaz a stanovení kyseliny benzoové, kyseliny 4hydroxybenzoové, kyseliny sorbové, kyseliny salicylové a kyseliny propionové v kosmetických prostředcích a důkaz a stanovení hydrochinonu, hydrochinonmonomethyletheru, hydrochinonmonoethyletheru a hydrochinonmonobenzyletheru v kosmetických prostředcích jsou šestým krokem;

vzhledem k tomu, že opatření této směrnice jsou v souladu se stanoviskem Výboru pro přizpůsobení směrnice 76/768/EHS technickému pokroku,

PŘIJALA TUTO SMĚRNICI:

Článek 1

Členské státy učiní všechny nezbytné kroky k zajištění toho, aby se při úředním zkoušení kosmetických prostředků:

— důkaz a stanovení kyseliny benzoové, kyseliny 4hydroxybenzoové, kyseliny sorbové, kyseliny salicylové a kyseliny propionové,

— důkaz a stanovení hydrochinonu, hydrochinonmonomethyletheru, hydrochinonmonoethyletheru a hydrochinonmonobenzyletheru

prováděly metodami popsanými v příloze.

Článek 2

1. Členské státy uvedou v účinnost právní a správní předpisy nezbytné pro dosažení souladu s touto směrnicí nejpozději do 30. září 1996. Neprodleně o nich uvědomí Komisi.

Tato opatření přijatá členskými státy musí obsahovat odkaz na tuto směrnici nebo musí takový odkaz být učiněn při jejich úředním vyhlášení. Způsob odkazu si stanoví členské státy.

2. Členské státy sdělí Komisi znění vnitrostátních právních předpisů, které přijmou v oblasti působnosti této směrnice.

Článek 3

Tato směrnice vstupuje v platnost dvacátým dnem po vyhlášení v *Úředním věstníku Evropských společenství*.

Článek 4

Tato směrnice je určena členským státům.

V Bruselu dne 7. července 1995.

Za Komisi

Emma BONINO

členka Komise

([1]) Úř. věst. L 262, 27.9.1976, s. 169.
([2]) Úř. věst. L 181, 15.7.1994, s. 31.
([3]) Úř. věst. L 383, 31.12.1980, s. 27.
([4]) Úř. věst. L 57, 27.2.1987, s. 56.
([5]) Úř. věst. L 185, 30.6.1982, s. 1.
([6]) Úř. věst. L 108, 28.4.1990, s. 92.
([7]) Úř. věst. L 291, 24.10.1983, s. 9.
([8]) Úř. věst. L 295, 7.11.1985, s. 30.
([9]) Úř. věst. L 231, 14.9.1993, s. 34.

PŘÍLOHA

I. DŮKAZ A STANOVENÍ KYSELINY BENZOOVÉ, KYSELINY 4HYDROXYBENZOOVÉ, KYSELINY SORBOVÉ, KYSELINY SALICYLOVÉ A KYSELINY PROPIONOVÉ V KOSMETICKÝCH PROSTŘEDCÍCH

1. Rozsah a oblast použití

Metoda je použitelná pro důkaz a stanovení kyseliny benzoové, kyseliny 4hydroxybenzoové, kyseliny sorbové, kyseliny salicylové a kyseliny propionové v kosmetických prostředcích. Samostatně jsou popsány postupy důkazu těchto konzervačních přísad, stanovení kyseliny propionové a stanovení kyseliny 4hydroxybenzoové, kyseliny salicylové, kyseliny sorbové a kyseliny benzoové.

2. Definice

Množství kyseliny benzoové, kyseliny 4hydroxybenzoové, kyseliny salicylové, kyseliny sorbové a kyseliny propionové stanovená touto metodou se vyjádří v hmotnostních procentech volných kyselin.

A. DŮKAZ

1. Podstata metody

Po kyselé/zásadité extrakci konzervačních přísad se extrakt analyzuje chromatografií na tenké vrstvě (TLC) a reakční chromatografií („derivatizace na desce“). V závislosti na výsledcích se důkaz potvrdí vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) nebo, v případě kyseliny propionové, plynovou chromatografií (GC).

2. Reakční činidla

2.1 Obecně

Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a. Musí být použita destilovaná voda nebo voda alespoň ekvivalentní čistoty.

2.2 Aceton

2.3 Diethylether

2.4 Acetonitril

2.5 Toluen

2.6 nHexan

2.7 Parafin, tekutý

2.8 Kyselina chlorovodíková, 4 M

2.9 Hydroxid draselný, 4 M vodný roztok

2.10 Chlorid vápenatý, CaCl2·2H2O

2.11 Uhličitan lithný, Li2CO3

2.12 2Brom2‘acetonafton

2.13 Kyselina 4hydroxybenzoová

2.14 Kyselina salicylová

2.15 Kyselina benzoová

2.16 Kyselina sorbová

2.17 Kyselina propionová

2.18 Referenční roztoky

Připraví se 0,1 % (m/V) roztoky (100 mg/100 ml) každé z pěti konzervačních přísad (2.13 až 2.17) v diethyletheru.

2.19 Derivatizační činidlo

0,5 % roztok 2brom2'acetonaftonu (2.12) v acetonitrilu (2.4) (50 mg/10 ml). Tento roztok by měl být připravován každý týden a uchováván v ledničce.

2.20 Roztok katalyzátoru

0,3 % (m/V) roztok uhličitanu lithného (2.11) ve vodě (300 mg/100 ml). Tento roztok by měl být připravován čerstvý.

2.21 Vyvíjecí rozpouštědlo

Toluen (2.5)/aceton (2.2) (20: 0,5, V/V)

2.22 Tekutý parafin (2.7)/nhexan (2.6) (1:2, V/V)

3. **Přístroje a pomůcky**

Běžné laboratorní vybavení

3.1 Vodní lázeň nastavitelná na teplotu 60 °C

3.2 Vyvíjecí komora

3.3 Zdroj ultrafialového světla 254 a 366 nm

3.4 Hotové desky pro chromatografii na tenké vrstvě, Silikagel 60, bez fluorescenčního indikátoru, 20 × 20 cm, tloušťka vrstvy 0,25 mm s koncentrační zónou 2,5 × 20 cm (Merk 11845 nebo ekvivalentní)

3.5 Mikrostříkačka na 10 µl

3.6 Mikrostříkačka na 25 µl

3.7 Sušárna nastavitelná na teplotu až 105 °C

3.8 Erlenmeyerovy baňky na 50 a 200 ml se zabroušenou zátkou

3.9 Filtrační papír, průměr 90 mm, Schleicher & Schüll, Weissband No. 5892, nebo ekvivalentní

3.10 Univerzální indikátorový papírek, pH 1 – 11

3.11 Skleněné vzorkovací lahvičky na 5 ml

3.12 Rotační filmová odparka (Rotavapor nebo ekvivalentní)

3.13 Topná deska

4. **Postup**

4.1 Příprava vzorků

Do Erlenmeyerovy baňky na 50 ml se zabroušenou zátkou (3.8) se odváží přibližně 1 g vzorku. Přidají se čtyři kapky 4 M kyseliny chlorovodíkové (2.8) a 40 ml acetonu (2.2). U silně zásaditých výrobků, jako je toaletní mýdlo, by mělo být přidáno 20 kapek 4 M kyseliny chlorovodíkové (2.8). Pomocí indikátorového papírku (3.10) se zkontroluje, zda je pH přibližně 2. Erlenmeyerova baňka se uzavře a po dobu jedné minuty se silně protřepává.

Jeli nezbytné usnadnit extrakci konzervačních přísad do acetonové fáze, směs se opatrně zahřeje na asi 60 °C, aby se tekutá fáze rozpustila.

Roztok se zchladí na pokojovou teplotu a přefiltruje přes filtrační papír (3.9) do Erlenmeyerovy baňky.

20 ml filtrátu se převede do Erlenmeyerovy baňky na 200 ml, přidá se 20 ml vody a promíchá se. pH směsi se upraví přibližně na 10 pomocí 4 M hydroxidu draselného (2.9) za použití indikátorového papírku (3.10).

Přidá se 1 g chloridu vápenatého (2.10) a silně se protřepe. Zfiltruje se přes filtrační papír (3.9) do dělicí nálevky na 250 ml obsahující 75 ml diethyletheru (2.3) a silně se třepe jednu minutu. Vrstvy se nechají oddělit a vodná vrstva se odpustí do Erlenmeyerovy baňky na 250 ml. Etherová vrstva se zlikviduje. Za použití indikátorového papírku (3.10) se pH vodného roztoku upraví na přibližně 2 okyselením 4 M kyselinou chlorovodíkovou (2.8). Přidá se 10 ml diethyletheru (2.3), baňka se zazátkuje a silně protřepává jednu minutu; vrstvy se nechají oddělit a etherová vrstva se převede do rotační odparky (3.12). Vodná vrstva se zlikviduje.

Etherová vrstva se odpaří téměř do sucha a zbytek se znovu rozpustí v 1 ml diethyletheru (2.3). Roztok se převede do vzorkovací lahvičky (3.11).

4.2 Chromatografie na tenké vrstvě

Na startovní linii koncentrační zóny desky pro chromatografii na tenké vrstvě (3.4) se do bodů, jejichž počet odpovídá počtu referenčních roztoků a roztoků vzorků, které mají být analyzovány, nanese stříkačkou (3.5) ve stejných odstupech vždy po 3 µl uhličitanu lithného (2.20) a vysuší se v proudu studeného vzduchu.

Chromatografická deska se přenese na topnou desku (3.13) zahřátou na 40 °C, aby se skvrny udržely co nejmenší. Mikrostříkačkou (3.5) se na startovní linii desky nanese vždy 10 µl každého referenčního vzorku (2.18) a roztoku vzorku (4.1) přesně do bodů, kam byl nanesen uhličitan lithný.

Nakonec se opět přesně do bodů, kam byly naneseny referenční roztoky/roztoky vzorku a roztok uhličitanu lithného, nanese přibližně 15 µl derivatizačního činidla (2.19) (roztok 2brom2'acetonaftonu).

Chromatografická deska se zahřívá v sušárně (3.7) 45 minut při 80 °C. Po vychladnutí se deska vyvíjí v komoře (3.2), která byla (bez vyložení filtračním papírem) 15 minut sycena vyvíjecím rozpouštědlem 2.21 (toluen/aceton), dokud čelo rozpouštědla nedosáhne vzdálenosti 15 cm (doba vyvíjení je přibližně 80 minut).

Deska se vysuší v proudu studeného vzduchu a získané skvrny se vyhodnotí pod UV světlem (3.3). Pro zesílení fluorescence slabých skvrn může být chromatografická deska ponořena do tekutého parafinu/nhexanu (2.22).

5. **Důkaz**

Pro každou skvrnu se vypočte hodnota Rf.

Hodnoty Rf a chování vzorku pod UV světlem se porovnají s hodnotami a chováním referenčních vzorků.

Učiní se předběžné závěry o přítomnosti a důkazu konzervačních přísad. Provede se vysokoúčinná kapalinová chromatografie popsaná v oddílu B, nebo ukazuje-li se, že je přítomna kyselina propionová, provede se plynová chromatografie popsaná v oddílu C. Získané retenční časy se porovnají s retenčními časy referenčních vzorků.

Výsledky TLC a HPLC nebo GC se zkombinují a při konečném důkazu konzervačních přísad se vychází z kombinace výsledků.

B. STANOVENÍ KYSELINY BENZOOVÉ, KYSELINY 4HYDROXYBENZOOVÉ, KYSELINY SORBOVÉ A KYSELINY SALICYLOVÉ

1. **Podstata metody**

Vzorek se po okyselení extrahuje směsí ethanolu a vody. Po filtraci se konzervační přísady stanoví vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC).

2. **Reakční činidla**

2.1 Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a. a musí být vhodná pro HPLC. Musí být použita destilovaná voda nebo voda alespoň ekvivalentní čistoty.

2.2 Ethanol, absolutní

2.3 Kyselina 4hydroxybenzoová

2.4 Kyselina salicylová

2.5 Kyselina benzoová

2.6 Kyselina sorbová

2.7 Octan sodný, ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$)

2.8 Kyselina octová, d_4^{20} = 1,05 g/ml

2.9 Acetonitril

2.10 Kyselina sírová, 2 M

2.11 Hydroxid draselný, 0,2 M vodný roztok

2.12 Kyselina 2methoxybenzoová

2.13 Směs ethanol/voda

Devět dílů ethanolu (2.2) se smíchá s jedním dílem vody (2:1)

2.14 Roztok vnitřního standardu

Připraví se roztok obsahující 1 g kyseliny 2methoxybenzoové (2.12) v 500 ml směsi ethanol/voda (2.13).

2.15 Mobilní fáze pro HPLC

2.15.1 Acetátový pufr: do 1 litru vody se přidá 6,35 g octanu sodného (2.7) a 20,0 ml kyseliny octové (2.8) a smíchá se.

2.15.2 Mobilní fáze se připraví smícháním devíti dílů acetátového pufru (2.15.1) a jednoho dílu acetonitrilu (2.9).

2.16 Zásobní roztok konzervačních přísad

Do odměrné baňky na 50 ml se přesně naváží asi 0,05 g kyseliny 4hydroxybenzoové (2.3), 0,2 g kyseliny salicylové (2.4), 0,2 g kyseliny benzoové (2.5) a 0,05 g kyseliny sorbové (2.6) a objem se doplní směsí ethanol/voda (2.13). Roztok se uchovává v ledničce. Roztok je stabilní jeden týden.

2.17 Standardní roztoky konzervačních přísad

Do odměrných baněk na 20 ml se odměří 8,00, 4,00, 2,00, 1,00 a 0,50 ml zásobního roztoku (2.16). Do každé baňky se přidá 10,00 ml roztoku vnitřního standardu (2.14) a 0,5 ml 2 M kyseliny sírové (2.10). Objem se doplní směsí ethanol/voda (2.13). Tyto roztoky musí být připravovány čerstvé.

3. **Přístroje a pomůcky**

Běžné laboratorní vybavení a dále:

3.1 Vodní lázeň, nastavená na 60 °C

3.2 Chromatograf pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii s UV detektorem s nastavitelnou vlnovou délkou a 10µl nastřikovací smyčkou.

3.3 Analytická kolona

Korozivzdorná ocel, délka 12,5 až 25 cm, vnitřní průměr 4,6 mm, plněná Nucleosilem 5C18 nebo ekvivalentní náplní.

3.4 Filtrační papír, průměr: 90 mm, Schleicher and Schüll, Weissband No 5892 nebo ekvivalentní.

3.5 Erlenmeyerovy baňky na 50 ml

3.6 Skleněné vzorkovací lahvičky na 5 ml

3.7 Varné kamínky, karborundum, velikost 2–4 mm, nebo ekvivalentní

4. **Postup**

4.1 Příprava vzorku

4.1.1 Příprava vzorku bez přidání vnitřního standardu

Do Erlenmeyerovy baňky na 50 ml (3.5) se naváží 1 g vzorku. Do Erlenmeyerovy baňky se odpipetuje 10 ml 2 M kyseliny sírové (2.10) a 40 ml směsi ethanol/voda (2.13). Přidá se přibližně 1 g varných kamínků (3.7), baňka se uzavře a silně se alespoň jednu minutu protřepává, dokud nevznikne homogenní suspenze. Pro usnadnění extrakce konzervačních přísad do ethanolové fáze se Erlenmeyerova baňka zahřívá přesně pět minut na vodní lázni (3.1) při 60 °C.

Erlenmeyerova baňka se ihned ochladí v proudu studené vody a extrakt se na hodinu uloží při 5 °C.

Extrakt se zfiltruje přes filtrační papír (3.4). Asi 2 ml extraktu se převedou do vzorkovací lahvičky (3.6). Extrakt se uchovává při 5 °C a stanovení pomocí HPLC se provede do 24 hodin.

4.1.2 Příprava vzorku s přidáním vnitřního standardu

Do Erlenmeyerovy baňky na 50 ml (3.5) se s přesností na tři desetinná místa naváží 1 ± 0,1 g vzorku (a gramů). Pipetou se přidá 1,00 ml 2 M kyseliny sírové (2.10) a 30,0 ml směsi ethanol/voda (2.13). Přidá se přibližně 1 g varných kamínků (3.7) a 10 ml roztoku vnitřního standardu(2.14). Erlenmeyerova baňka se uzavře a silně se alespoň jednu minutu protřepává, dokud nevznikne homogenní suspenze. Pro usnadnění extrakce konzervačních přísad do ethanolové fáze se Erlenmeyerova baňka zahřívá přesně pět minut na vodní lázni (3.1) při 60 °C.

Erlenmeyerova baňka se ihned ochladí v proudu studené vody a extrakt se uloží na hodinu při 5 °C.

Extrakt se zfiltruje přes filtrační papír (3.4). Asi 2 ml extraktu se převedou do vzorkovací lahvičky (3.6). Extrakt se uchovává při 5 °C a stanovení pomocí HPLC se provede do 24 hodin.

4.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Mobilní fáze: acetonitril/acetátový pufr (2.15).

Průtok mobilní fáze kolonou se nastaví na 2,0 ± 0,5 ml/min. Vlnová délka detektoru se nastaví na 240 nm.

4.2.1 Kalibrace

Do kapalinového chromatografu (3.2) se nastříkne po 10 µl standardních roztoků konzervačních přísad (2.17). Pro každý roztok se ze získaných chromatogramů stanoví poměr výšky píku vyšetřované konzervační přísady k výšce píku vnitřního standardu získaného z chromatogramů. Pro každou konzervační přísadu se sestrojí graf závislosti poměru výšek píků na koncentraci každého standardního roztoku.

Přesvědčete se, že při kalibraci byla pro standardní roztoky získána lineární odezva.

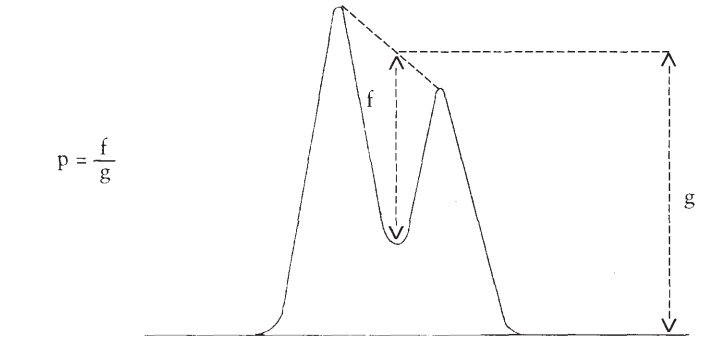
4.2.2 Stanovení

Do kapalinového chromatografu (3.2) se nastříkne 10 µl extraktu vzorku (4.1.1) a zaznamená se chromatogram. Nastříkne se 10 µl standardního roztoku konzervační přísady (2.17) a zaznamená se chromatogram. Obdržené chromatogramy se porovnají. Není-li v chromatogramu extraktu vzorku (4.1.1) žádný pík s přibližně stejným retenčním časem jako pík kyseliny 2methoxybenzoové (doporučený vnitřní standard), nastříkne se do kapalinového chromatografu 10 µl extraktu vzorku s přidaným vnitřním standardem (4.1.2) a zaznamená se chromatogram.

Je-li v chromatogramu extraktu vzorku (4.1.1) rušivý pík se stejným retenčním časem jako kyselina 2methoxybenzoová, měl by být vybrán jiný vnitřní standard. (Není-li jedna z vyšetřovaných konzervačních přísad v chromatogramu přítomna, lze tuto konzervační přísadu použít jako vnitřní standard.)

Je třeba ověřit, zda chromatogramy získané pro standardní roztok a roztok vzorku splňují následující požadavky:

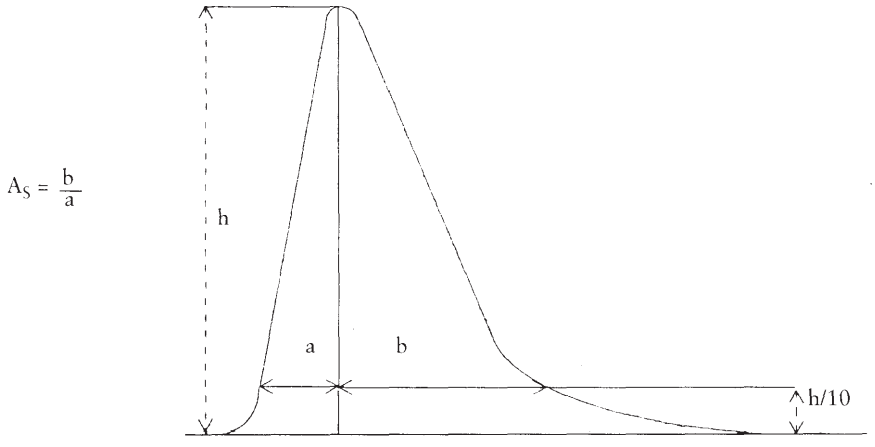
— separace píků nejhůře odděleného páru je alespoň 0,90. (Definice separace píků je uvedena na obrázku 1)



Obrázek 1: **Separace píků**

Není-li požadované separace dosaženo, měla by být buď použita účinnější kolona nebo by mělo být složení mobilní fáze upraveno tak, aby byl požadavek splněn.

— Faktor asymetrie As všech získaných píků by se měl pohybovat od 0,9 do 1,5. (Definice faktoru asymetrie je uvedena na obrázku 2.) Při zaznamenání chromatogramu za účelem stanovení faktoru asymetrie je doporučená rychlost posuvu papíru nejméně 2 cm/min.



Obrázek 2: **Faktor asymetrie píku**

— Základna musí být stabilní.

5. **Výpočet**

Pro výpočet koncentrace konzervačních přísad v roztoku vzorku se použijí poměry výšek píků vyšetřovaných konzervačních přísad a výšky píku kyseliny 2methoxybenzoové (vnitřní standard) a dále kalibrační graf. Obsah kyseliny benzoové, kyseliny 4hydroxybenzoové, kyseliny sorbové nebo kyseliny salicylové ve vzorku v hmotnostních procentech (xi) se vypočte pomocí vzorce

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

kde

a = hmotnost zkušebního vzorku (4.1.2) (g),

b = koncentrace konzervační přísady v extraktu vzorku (4.1.2) (μg/ml) odečtená z kalibračního grafu.

6. **Opakovatelnost** ([1])

Při obsahu kyseliny 4hydroxybenzoové 0,40 % by neměla absolutní hodnota rozdílu výsledků dvou stanovení provedených současně se stejným vzorkem překročit 0,035 %.

Při obsahu kyseliny benzoové 0,50 % by neměla absolutní hodnota rozdílu výsledků dvou stanovení provedených současně se stejným vzorkem překročit 0,050 %.

Při obsahu kyseliny salicylové 0,50 % by neměla absolutní hodnota rozdílu výsledků dvou stanovení provedených současně se stejným vzorkem překročit 0,045 %.

Při obsahu kyseliny sorbové 0,60 % by neměla absolutní hodnota rozdílu výsledků dvou stanovení provedených současně se stejným vzorkem překročit 0,035 %.

7. **Poznámky**

7.1 Výsledky testování robustnosti metody ukazují, že množství kyseliny sírové přidané do extraktu kyselin ze vzorku je rozhodující a množství zpracovávaného vzorku by tedy mělo být v předepsaném rozmezí.

7.2 Je-li to žádoucí, lze použít vhodnou ochrannou kolonu.

C. STANOVENÍ KYSELINY PROPIONOVÉ

1. **Rozsah a oblast použití**

Tato metoda je vhodná pro stanovení kyseliny propionové v kosmetických prostředcích až do maximální koncentrace 2 % (m/m).

2. **Definice**

Koncentrace kyseliny propionové stanovená touto metodou se vyjádří v procentech hmotnosti (% m/m) výrobku.

3. **Podstata metody**

Po extrakci kyseliny propionové z výrobku se stanovení provede plynovou chromatografií za použití kyseliny 2methylpropionové jako vnitřního standardu.

4. **Reakční činidla**

Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a; musí být použita destilovaná voda nebo voda alespoň ekvivalentní čistoty.

4.1 Ethanol, 96 % (V/V)

4.2 Kyselina propionová

4.3 Kyselina 2methylpropionová

4.4 Kyselina trihydrogenfosforečná, 10 % (m/V)

4.5 Roztok kyseliny propionové

Do odměrné baňky na 50 ml se přesně naváží 1 g (p gramů) kyseliny propionové a doplní se na objem ethanolem (4.1).

4.6 Roztok vnitřního standardu

Do odměrné baňky na 50 ml se přesně naváží 1 g (e gramů) kyseliny 2methylpropionové a doplní se na objem ethanolem (4.1).

([1]) ISO 5725.

5. **Přístroje a pomůcky**

5.1 Běžné laboratorní vybavení a dále:

5.2 Plynový chromatograf s plamenovým ionizačním detektorem

5.3 Skleněná zkumavka (20 × 150 mm) se šroubovacím uzávěrem

5.4 Vodní lázeň nastavená na 60 °C

5.5 Skleněná injekční stříkačka na 10 ml s filtrační membránou (průměr pórů 0,45 μm)

6. **Postup**

6.1 Příprava vzorku

6.1.1 Příprava vzorku bez vnitřního standardu

Do skleněné zkumavky (5.3) se naváží přibližně 1 g vzorku. Přidá se 0,5 ml kyseliny trihydrogenfosforečné (4.4) a 9,5 ml ethanolu (4.1).

Zkumavka se uzavře a silně protřepe. Jeli to nezbytné, umístí se zkumavka na pět minut do vodní lázně zahřáté na 60 °C (5.4), aby se zcela rozpustila tuková fáze. Zkumavka se rychle zchladí pod tekoucí vodou. Část roztoku se zfiltruje přes membránový filtr (5.5). Chromatografie filtrátu se provede tentýž den.

6.1.2 Příprava vzorku s vnitřním standardem

Do skleněné zkumavky (5.3) se s přesností na 3 desetinná místa naváží 1 ± 0,1 g vzorku. Přidá se 0,5 ml kyseliny trihydrogenfosforečné (4.4), 0,50 ml roztoku vnitřního standardu (4.6)a 9 ml ethanolu (4.1).

Zkumavka se uzavře a silně protřepe. Jeli to nezbytné, umístí se zkumavka na pět minut do vodní lázně zahřáté na 60 °C (5.4), aby se zcela rozpustila tuková fáze. Zkumavka se rychle zchladí pod tekoucí vodou. Část roztoku se zfiltruje přes membránový filtr (5.5). Chromatografie filtrátu se provede tentýž den.

6.2 Podmínky pro plynovou chromatografii

Doporučují se následující provozní podmínky

Kolona

Typ	korozivzdorná ocel
Délka	2 m
Průměr	⅛”
Náplň	10 % SP™ 1000 (nebo ekvivalentní) + 1 % H_3PO_4 na Chromosorbu WAW 100–120 mesh

Teplota

Nástřik	200 °C
Kolona	120 °C
Detektor	200 °C
Nosný plyn	dusík
Průtoková rychlost	25 ml/min

6.3 Chromatografie

6.3.1 Kalibrace

Do řady odměrných baněk na 20 ml se odpipetuje 0,25, 0,50, 1,00, 2,00 a 4,00 ml roztoku kyseliny propionové (4.5). Do každé odměrné baňky se odpipetuje 1,00 ml roztoku vnitřního standardu (4.6); doplní se na objem ethanolem (4.1) a zamíchá. Takto připravené roztoky obsahují kyselinu 2methylpropionovou jako vnitřní standard v koncentraci e mg/ml (to znamená 1 mg/ml, je-li e = 1,000) a kyselinu propionovou v koncentraci p/4, p/2, p, 2p, 4p mg/ml (to znamená 0,25, 0,50, 1,00, 2,00, 4,00 mg/ml, je-li p = 1,000).

Nastříkne se 1 μl těchto roztoků a kalibrační křivka se sestrojí vynesením poměru hmotností kyseliny propionové a kyseliny 2methylpropionové na osu x a poměru odpovídajících ploch píků na osu y.

Nastříknou se 3 dávky z každého roztoku a vypočte se průměr poměrů ploch píku.

6.3.2 Stanovení

Nastříkne se 1 µl filtrátu vzorku 6.1.1. Chromatogram se porovná s chromatogramem jednoho ze standardních roztoků (6.3.1). Má-li pík přibližně stejný retenční čas jako pík kyseliny 2methylpropionové, změní se vnitřní standard. Není-li pozorován žádný rušivý vliv, nastříkne se 1 µl filtrátu vzorku 6.1.2 a změří se plochy píku kyseliny propionové a píku vnitřního standardu.

Nastříknou se 3 dávky z každého roztoku a vypočte se průměr poměrů ploch píku.

7. **Výpočty**

7.1 Z kalibrační křivky sestrojené podle bodu 6.3.1 se odečte poměr hmotností (K), který odpovídá poměru ploch píků vypočtenému v bodu 6.3.2.

7.2 Z takto získaného poměru hmotností se vypočte obsah kyseliny propionové ve vzorku (x) v hmotnostních procentech pomocí vzorce

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

kde

K = poměr vypočtený v bodu 7.1,

e = hmotnost vnitřního standardu v gramech podle bodu 4.6,

a = hmotnost vzorku v gramech podle bodu 6.1.2,

Výsledky se zaokrouhlí na jedno desetinné místo.

8. **Opakovatelnost** ([1])

Při obsahu kyseliny propionové 2 % (m/m) by neměl rozdíl výsledků dvou stanovení provedených současně se stejným vzorkem překročit 0,12 %.

II. DŮKAZ A STANOVENÍ HYDROCHINONU, HYDROCHINONMONOMETHYLETHERU, HYDROCHINONMONOETHYLETHERU A HYDROCHINONMONOBENZYLETHERU V KOSMETICKÝCH PROSTŘEDCÍCH

A. DŮKAZ

1. **Rozsah a oblast použití**

V metodě je popsána detekce a důkaz hydrochinonu, hydrochinonmonomethyletheru, hydrochinonmonoethyletheru a hydrochinonmonobenzyletheru (monobenzonu) v kosmetických prostředcích pro zesvětlení kůže.

2. **Podstata metody**

Důkaz hydrochinonu a jeho etherů se provede chromatografií na tenké vrstvě (TLC).

3. **Reakční činidla**

Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a.

([1]) ISO 5725.

3.1 Ethanol, 96 % (V/V)

3.2 Chloroform

3.3 Diethylether

3.4 Vyvíjecí rozpouštědlo:

Chloroform/diethylether, 66: 33 (V/V)

3.5 Amoniak, 25 % (m/m) (d_4^{20} = 0,91 g/ml)

3.6 Kyselina askorbová

3.7 Hydrochinon

3.8 Hydrochinonmonomethylether

3.9 Hydrochinonmonoethylether

3.10 Hydrochinonmonobenzylether (monobenzon)

3.11 Referenční roztoky

Následující referenční roztoky se připravují čerstvě a jsou stabilní jeden den.

3.11.1 Do dělené zkumavky na 10 ml se naváží 0,05 g hydrochinonu (3.7). Přidá se 0,250 g kyseliny askorbové (3.6) a 5 ml ethanolu (3.1). Přidává se amoniak (3.5), dokud není dosaženo pH 10, a doplní se ethanolem na objem 10 ml (3.1).

3.11.2 Do dělené zkumavky na 10 ml se naváží 0,05 g hydrochinonmonomethyletheru (3.8). Přidá se 0,250 g kyseliny askorbové (3.6) a 5 ml ethanolu (3.1). Přidává se amoniak (3.5), dokud není dosaženo pH 10, a doplní se ethanolem na objem 10 ml (3.1).

3.11.3 Do dělené zkumavky na 10 ml se naváží 0,05 g hydrochinonmonoethyletheru (3.9). Přidá se 0,250 g kyseliny askorbové (3.6) a 5 ml ethanolu (3.1). Přidává se amoniak (3.5), dokud není dosaženo pH 10, a doplní se ethanolem na objem 10 ml (3.1).

3.11.4 Do dělené zkumavky na 10 ml se naváží 0,05 g hydrochinonmonobenzyletheru (3.10). Přidá se 0,250 g kyseliny askorbové (3.6) a 5 ml ethanolu (3.1). Přidává se amoniak (3.5), dokud není dosaženo pH 10, a doplní se ethanolem na objem 10 ml (3.1).

3.12 Dusičnan stříbrný

3.13 Kyselina dodekamolybdofosforečná

3.14 Kyanoželezitan draselný hexahydrát

3.15 Chlorid železitý hexahydrát

3.16 Detekční činidla

3.16.1 Do 5 % vodného roztoku (m/V) dusičnanu stříbrného (3.12) se přidává amoniak (3.5), dokud se tvořící se sraženina opět nerozpustí.

Upozornění:

Při delším stání se v roztoku tvoří výbušné sloučeniny a měl by být po použití zlikvidován.

3.16.2 10 % (m/V) roztok kyseliny dodekamolybdofosforečné (3.13) v ethanolu (3.1).

3.16.3 Připraví se 1 % (m/V) vodný roztok kyanoželezitanu draselného (3.14) a 2 % (m/V) vodný roztoku chloridu železitého (3.15). Těsně před použitím se smíchají stejné díly obou roztoků.

4. **Přístroje a pomůcky**

Běžné laboratorní vybavení, a dále:

4.1 Běžné vybavení pro chromatografii na tenké vrstvě

4.2 Hotové desky pro chromatografii na tenké vrstvě: silikagel GHR/UV254 (254 je dolním indexem GHR/UV); 20 × 20 cm (Machery, Nagel nebo ekvivalentní). Tloušťka vrstvy 0,25 mm.

4.3 Ultrazvuková lázeň

4.4 Odstředivka

4.5 UV lampa, 254 nm

5. **Postup**

5.1 Příprava vzorku

Do dělené zkumavky na 10 ml se naváží 3 g vzorku. Přidá se 0,250 g kyseliny askorbové (3.6) a 5 ml ethanolu (3.1). pH roztoku se upraví amoniakem (3.5) na 10. Objem se doplní ethanolem (3.1) na 10 ml. Zkumavka se uzavře zátkou a homogenizuje se 10 minut v ultrazvukové lázni. Zfiltruje se přes filtrační papír nebo se odstředí při 3 000 ot./min.

5.2 Chromatografie na tenké vrstvě (TLC)

5.2.1 Chromatografická komora se nasytí vyvíjecím rozpouštědlem (3.4).

5.2.2 Na desku se nanese po 2 µl referenčních roztoků (3.11) a 2 µl roztoku vzorku (5.1). Vyvíjí se ve tmě při teplotě okolí, dokud čelo rozpouštědla nedosáhne vzdálenosti 15 cm od startu.

5.2.3 Deska se vyjme, nechá se vyschnout při pokojové teplotě.

5.3 Detekce

5.3.1 Deska se pozoruje pod UV světem při 254 nm a poloha skvrn se označí.

5.3.2 Deska se postříká

— dusičnanem stříbrným (3.16.1), nebo

— kyselinou dodekamolybdofosforečnou (3.16.2); zahřeje se na asi 120 °C, nebo

— roztokem kyanoželezitanu draselného a roztokem chloridu železitého (3.16.3).

6. **Důkaz**

Spočítá se hodnota Rf každé skvrny.

Skvrny získané pro roztok vzorku se porovnají se skvrnami získanými pro referenční roztoky, pokud jde o jejich hodnoty Rf, barvu skvrn v UV světle a barvu skvrn po zviditelnění detekčním činidlem.

Provede se vysokoúčinná kapalinová chromatografie popsaná v následujícím oddílu (B) a porovnají se retenční časy získané pro pík (píky) vzorku s retenčními časy píků referenčních roztoků.

Výsledky z TLC a HPLC se zkombinují s cílem dokázat přítomnost hydrochinonu nebo jeho etherů.

7. **Poznámky**

Za uvedených podmínek byly pozorovány následující hodnoty Rf:

hydrochinon:	0,32
hydrochinonmonomethylether:	0,53
hydrochinonmonoethylether:	0,55
hydrochinonmonobenzylether:	0,58

B. STANOVENÍ

1. **Rozsah a oblast použití**

V metodě je specifikován postup pro stanovení hydrochinonu, hydrochinonmonomethyletheru, hydrochinonmonoethyletheru a hydrochinonmonobenzyletheru v kosmetických prostředcích pro zesvětlení kůže.

2. **Podstata metody**

Vzorek je extrahován směsí voda/methanol za mírného zahřátí, kterým se rozpustí tukový materiál. Stanovení analytů ve výsledném roztoku se provede kapalinovou chromatografií s obrácenou fází s UV detekcí.

3. **Reakční činidla**

3.1 Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a. Musí být použita destilovaná voda nebo voda alespoň ekvivalentní čistoty.

3.2 Methanol

3.3 Hydrochinon

3.4 Hydrochinonmonomethylether

3.5 Hydrochinonmonoethylether

3.6 Hydrochinonmonobenzylether (monobenzon)

3.7 Tetrahydrofuran, čistoty pro HPLC

3.8 Směs voda/methanol 1:1 (V/V). Smíchá se jeden díl vody a jeden díl methanolu (3.2)

3.9 Mobilní fáze: směs tetrahydrofuran/voda 45:55 (V/V). Smíchá se 45 dílů tetrahydrofuranu (3.7) a 55 dílů vody.

3.10 Referenční roztok

Do odměrné baňky na 50 ml se naváží 0,06 g hydrochinonu (3.3), 0,08 g hydrochinonmonomethyletheru (3.4), 0,10 g hydrochinonmonoethyletheru (3.5) a 0,12 g hydrochinonmonobenzyletheru (3.6). Rozpustí se a doplní se na objem methanolem (3.2). Referenční roztok se připraví zředěním 10 ml tohoto roztoku na 50 ml směsí voda/methanol (3.8). Tyto roztoky se připravují čerstvé.

4. **Přístroje a pomůcky**

Běžné laboratorní vybavení a dále:

4.1 Vodní lázeň nastavitelná na teplotu 60 °C

4.2 Chromatograf pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii s UV detektorem s nastavitelnou vlnovou délkou a 10µl nastřikovací smyčkou

4.3 Analytická kolona:

Chromatografická kolona z korozivzdorné oceli, délka 250 mm, vnitřní průměr 4,6 mm, plněná Zorbax fenylem (chemicky vázaným fenethylsilanem na Zorbaxu SIL, uzavřená trimethylchlorsilanem), velikost částic 6 µm, nebo ekvivalentní náplní. Nepoužívá se ochranná kolona, s výjimkou fenylové kolony nebo kolony s ekvivalentní náplní.

4.4 Filtrační papír, průměr 90 mm, Schleicher and Schüll, Weissband No 5892 nebo ekvivalentní

5. **Postup**

5.1 Příprava vzorku

Do odměrné baňky na 50 ml se s přesností na tři desetinná místa naváží 1 ± 0,1 g (a gramů) vzorku. Vzorek se rozptýlí ve 25 ml směsi voda/methanol (3.8). Baňka se uzavře a silně protřepe, dokud se nevytvoří homogenní suspenze. Protřepává se alespoň jednu minutu. Baňka se umístí na vodní lázeň (4.1) nastavenou na 60 °C, aby se usnadnila extrakce. Baňka se ochladí a doplní se na objem směsí voda/methanol (3.8). Extrakt se zfiltruje přes filtrační papír (4.4). Důkaz HPLC se provede do 24 hodin od přípravy extraktu.

5.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

5.2.1 Průtoková rychlost mobilní fáze (3.9) se upraví na 1,0 ml/min a vlnová délka detektoru se nastaví na 295 nm.

5.2.2 Nastříkne se 10 µl roztoku vzorku získaného podle bodu 5.1 a zaznamená se chromatogram. Změří se plochy píků. Provede se kalibrace podle bodu 5.2.3. Porovnají se chromatogramy získané pro vzorek a referenční roztoky. Pro výpočet koncentrace analytu v roztoku vzorku se použijí plochy píků a faktory odezvy (RF) vypočtené podle bodu 5.2.3.

5.2.3 Kalibrace

Nastříkne se 10 µl referenčního roztoku (3.10) a zaznamená se chromatogram. Nástřik se provede několikrát, dokud není plocha píku konstantní.

Stanoví se faktor odezvy RFi (i je dolním infexem RF):

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

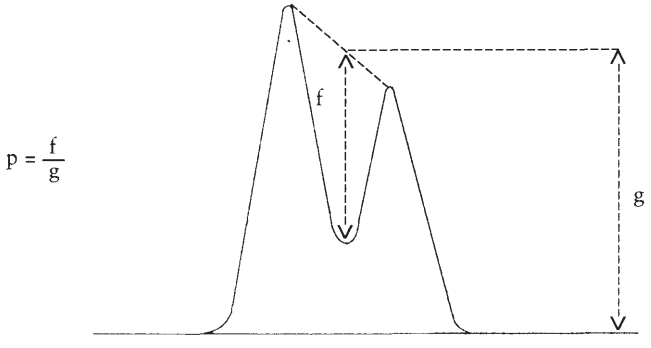
kde

p_i = plocha píku pro hydrochinon, hydrochinonmonomethylether, hydrochinonmonoethylether nebo hydrochinonmonobenzylether, a

c_i = koncentrace hydrochinonu, hydrochinonmonomethyletheru, hydrochinonmonoethyletheru nebo hydrochinonmonobenzyletheru v referenčním roztoku (3.10) (g/50 ml).

Je třeba ověřit, zda chromatogramy získané pro standardní roztok a roztok vzorku splňují následující požadavky:

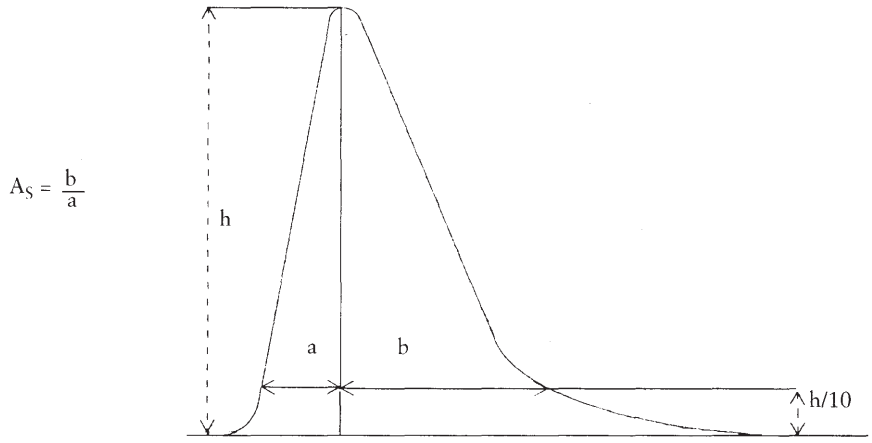
— separace píků nejhůře odděleného páru je alespoň 0,90. (Definice separace píků je uvedena na obrázku 1.).



Obrázek 1: **Separace píků**

Není-li požadované separace dosaženo, měla by být buď použita účinnější kolona nebo by mělo být složení mobilní fáze upraveno tak, aby byl požadavek splněn.

— Faktor asymetrie As všech získaných píků by se měl pohybovat od 0,9 do 1,5. (Definice faktoru asymetrie je uvedena na obrázku 2.) Při zaznamenání chromatogramu za účelem stanovení faktoru asymetrie je doporučená rychlost posuvu papíru nejméně 2 cm/min.



Obrázek 2: **Faktor asymetrie píku**

— Základna musí být stabilní.

6. **Výpočet**

Pro výpočet koncentrace analytu (koncentrací analytů) ve vzorku se použijí plochy píků analytů. Koncentrace analytu ve vzorku vyjádřená v hmotnostních procentech (x_i) se vypočte pomocí vzorce

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

kde

a = hmotnost vzorku v gramech,

b_i = plocha píku analytu i ve vzorku.

7. **Opakovatelnost** ([1])

7.1 Při obsahu hydrochinonu 2,0 % by neměla absolutní hodnota rozdílu výsledků dvou stanovení provedených současně se stejným vzorkem překročit 0,13 %.

7.2 Při obsahu hydrochinonmonomethyletheru 1,0 % by neměla absolutní hodnota rozdílu výsledků dvou stanovení provedených současně se stejným vzorkem překročit 0,1 %.

7.3 Při obsahu hydrochinonmonoethyletheru 1,0 % by neměla absolutní hodnota rozdílu výsledků dvou stanovení provedených současně se stejným vzorkem překročit 0,11 %.

7.4 Při obsahu hydrochinonmonobenzyletheru 1,0 % by neměla absolutní hodnota rozdílu výsledků dvou stanovení provedených současně se stejným vzorkem překročit 0,11 %.

8. **Reprodukovatelnost** ([1])

8.1 Při obsahu hydrochinonu 2 % by neměla absolutní hodnota rozdílu výsledků dvou stanovení provedených se stejným vzorkem za různých podmínek (různé laboratoře, různí experimentátoři, různé přístroje nebo různá doba) překročit 0,37 %.

([1]) ISO 5725.

8.2 Při obsahu hydrochinonmonomethyletheru 1 % by neměla absolutní hodnota rozdílu výsledků dvou stanovení provedených se stejným vzorkem za různých podmínek (různé laboratoře, různí experimentátoři, různé přístroje nebo různá doba) překročit 0,21 %.

8.3 Při obsahu hydrochinonmonoethyletheru 1 % by neměla absolutní hodnota rozdílu výsledků dvou stanovení provedených se stejným vzorkem za různých podmínek (různé laboratoře, různí experimentátoři, různé přístroje nebo různá doba) překročit 0,19 %.

8.4 Při obsahu hydrochinonmonobenzyletheru 1 % by neměla absolutní hodnota rozdílu výsledků dvou stanovení provedených se stejným vzorkem za různých podmínek (různé laboratoře, různí experimentátoři, různé přístroje nebo různá doba) překročit 0,11 %.

9. **Poznámky**

9.1 Jestliže je zjištěn obsah hydrochinonu výrazně vyšší než 2 % a je požadován přesný odhad obsahu, měl by být extrakt vzorku (5.1) zředěn na podobnou koncentraci, jakou by dal vzorek obsahující 2 % hydrochinonu, a stanovení by mělo být opakováno.

(U některých přístrojů může při vysokých koncentracích hydrochinonu ležet hodnota absorbance mimo lineární rozsah detektoru.)

9.2 Rušivé vlivy

Výše popsaná metoda umožňuje stanovení hydrochinonu a jeho etherů v jednom isokratickém průběhu. Použití fenylové kolony zajistí dostatečnou retenci hydrochinonu, kterou nelze zajistit při použití kolony C18 s uvedenou mobilní fází.

U této metody však snadno dochází k rušivému vlivu celé řady parabenů. V takovém případě by stanovení mělo být zopakováno s jiným systémem mobilní fáze/stacionární fáze. Vhodné metody lze najít v literatuře v odkazech 2 a 3:

Kolona: Zorbax ODS, 4,6 mm × 25 mm nebo ekvivalentní:

teplota: 36 °C

průtok: 1,5 ml/min

mobilní fáze:

pro hydrochinon: methanol/voda 5/95 (V/V)

pro hydrochinonmonomethylether: methanol/voda 30/70 (V/V)

pro hydrochinonmonobenzylether: methanol/voda 80/20 (V/V) ([1]).

Kolona: Spherisorb S5ODS nebo ekvivalentní:

mobilní fáze: voda/methanol 90/10 (V/V)

průtok: 1,5 ml/min

Tyto podmínky jsou vhodné pro hydrochinon ([2]).

([1]) Herpol-Borremans, M., Masse M.-O., 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]) Firth, J., Rix I., Determination of hydroquinone in skin toning creams, *Analyst*, (1986), 111, s. 129.