

31996L0045

L 213/8

ÚŘEDNÍ VĚSTNÍK EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ

22.8.1996

SEDMÁ SMĚRNICE KOMISE 96/45/ES**ze dne 2. července 1996****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 95/34/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 Komise 82/434/EHS ⁽⁵⁾ ve znění směrnice 90/207/EHS ⁽⁶⁾ a ve směrnicích Komise 83/514/EHS ⁽⁷⁾, 85/490/EHS ⁽⁸⁾, 93/73/EHS ⁽⁹⁾ a 95/32/ES ⁽¹⁰⁾;

vzhledem k tomu, že důkaz a stanovení 2-fenoxyethanolu, 1-fenoxypropan-2-olu, methyl, ethyl, propyl, butyl a benzyl 4-hydroxybenzoátu v kosmetických prostředcích je sedmým 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 2-fenoxyethanolu, 1-fenoxypropan-2-olu, methyl, ethyl, propyl, butyl a benzyl 4-hydroxybenzoátu prováděly metodami popsány 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 1997. Neprodleně o nich uvědomí Komisi.

2. 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.

3. 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 2. července 1996.

Za Komisi

Emma BONINO

členka Komise

⁽¹⁾ Úř. věst. L 262, 27.9.1976, s. 169.

⁽²⁾ Úř. věst. L 167, 18.7.1995, s. 19.

⁽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.

⁽¹⁰⁾ Úř. věst. L 178, 28.7.1995, s. 20.

PŘÍLOHA

DŮKAZ A STANOVENÍ 2-FENOXYETHANOLU, 1-FENOXYPROPAN-2-OLU, METHYL, ETHYL, PROPYL, BUTYL A BENZYL 4-HYDROXYBENZOÁTU V KOSMETICKÝCH PROSTŘEDCÍCH**A. DŮKAZ****1. Rozsah a oblast použití**

V této metodě je specifikován postup chromatografie na tenké vrstvě, který v kombinaci s metodou stanovení popsanou v oddílu B umožní důkaz 2-fenoxyethanolu, 1-fenoxypropan-2-olu, methyl 4-hydroxybenzoátu, ethyl 4-hydroxybenzoátu, propyl 4-hydroxybenzoátu, butyl 4-hydroxybenzoátu a benzyl 4-hydroxybenzoátu v kosmetických prostředcích.

2. Podstata metody

Konzervační přísady se extrahují z okyselených vzorků kosmetických prostředků acetonem. Po filtraci se acetonový roztok smíchá s vodou a mastné kyseliny se v alkalickém prostředí vysrážejí jako vápenaté soli. Alkalická směs aceton/voda je extrahována diethyletherem, čímž se odstraní lipofilní látky. Po okyselení se konzervační přísady extrahují diethyletherem. Alikvotní část diethyletherového extraktu se nanese na desku pokrytou tenkou vrstvou silikagelu. Po vyvíjení se získaný chromatogram pozoruje v UV světle a zviditelní se za použití Millonova činidla.

3. Reakční činidla**3.1 Obecně**

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

3.2 Aceton**3.3 Diethylether****3.4 n-Pentan****3.5 Methanol****3.6 Ledová kyselina octová****3.7 Roztok kyseliny chlorovodíkové, $c(\text{HCl}) = 4 \text{ mol/l}$** **3.8 Roztok hydroxidu draselného, $c(\text{KOH}) = 4 \text{ mol/l}$** **3.9 Chlorid vápenatý dihydrát ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)****3.10 Detekční činidlo: Millonovo činidlo**

Millonovo činidlo (dusičnan rtuťnatý) je komerčně dostupný roztok (Fluka 69820).

3.11 2-Fenoxyethanol**3.12 1-Fenoxypropan-2-ol****3.13 Methyl 4-hydroxybenzoát (methylparaben)****3.14 Ethyl 4-hydroxybenzoát (ethylparaben)****3.15 n-Propyl 4-hydroxybenzoát (propylparaben)****3.16 n-Butyl 4-hydroxybenzoát (butylparaben)****3.17 Benzyl 4-hydroxybenzoát (benzylparaben)****3.18 Referenční roztoky**

Připraví se 0,1 % (m/V) roztoky každé z referenčních látek 3.11, 3.12, 3.13, 3.14, 3.15, 3.16 a 3.17 v methanolu.

3.19 Vyvíjecí rozpouštědlo

Smíchá se 88 dílů npentanu (3.4) s 12 díly ledové kyseliny octové (3.6).

4. **Přístroje a pomůcky**

Běžné laboratorní vybavení a dále:

- 4.1 Vodní lázeň nastavitelná na teplotu 60 °C
- 4.2 Vytvájecí komora (nevyložená filtračním papírem)
- 4.3 Zdroj ultrafialového světla, 254 nm
- 4.4 Hotové desky 20 cm × 20 cm, předem potažené 0,25 mm tenkou vrstvou silikagelu 60F254 (254 je dolním indexem 60F) s koncentrační zónou (Merck No 11798, Darmstadt, nebo ekvivalentní)
- 4.5 Sušárna nastavitelná na teplotu až do 105 °C
- 4.6 Horkovzdušný vysoušeč vlasů
- 4.7 Vlněný malířský váleček o délce přibližně 10 cm, vnější průměr přibližně 3,5 cm. Vlněná vrstva by měla být 2 až 3 mm silná. Podle potřeby se vlna zastříhne.

Viz poznámka v bodu 5.2.
- 4.8 Skleněné zkumavky na 50 ml se šroubovacími uzávěry.
- 4.9 Elektrická topná deska s termostatem. Nastavení teploty: asi 80 °C. Topná deska se pokryje hliníkovou deskou o velikosti 20 cm × 20 cm a tloušťce asi 6 mm, čímž se dosáhne rovnoměrného rozložení tepla.

5. **Postup**

5.1 Příprava vzorku

Do skleněné zkumavky na 50 ml se šroubovacím uzávěrem (4.8) se odváží přibližně 1 g vzorku. Přidají se čtyři kapky roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.7) a 40 ml acetonu.

V případě silně zásaditých kosmetických prostředků, jako je toaletní mýdlo, se přidá 20 kapek roztoku kyseliny chlorovodíkové. Zkumavka se uzavře, směs se zlehka zahřeje na asi 60 °C, aby se usnadnila extrakce konzervačních látek do acetonové fáze, a 1 minutu se silně třepe.

Indikátorovým papírkem se změř pH roztoku a upraví se na hodnotu ≤ 3 roztokem kyseliny chlorovodíkové. Znovu se 1 minutu silně třepe.

Roztok se ochladí na pokojovou teplotu a zfiltruje se přes filtrační papír do Erlenmeyerovy baňky. 20 ml filtrátu se převede do Erlenmeyerovy baňky na 200 ml, přidá se 60 ml vody a promíchá. Hodnota pH směsi se upraví hydroxidem draselným (3.8) přibližně na 10 za použití indikátorového papírku.

Přidá se 1 g chloridu vápenatého dihydrátu (3.9) a silně se protřepe. Roztok se zfiltruje přes filtrační papír do dělicí nálevky na 250 ml, která obsahuje 75 ml diethyletheru, a silně se jednu minutu protřepává. Fáze se nechají oddělit a vodná fáze se vypustí do Erlenmeyerovy baňky na 200 ml. Hodnota pH roztoku se upraví roztokem kyseliny chlorovodíkové na přibližně 2 za použití indikátorového papírku. Poté se přidá 10 ml diethyletheru a silně se jednu minutu protřepává. Fáze se nechají oddělit a asi 2 ml fáze diethyletheru se převede do vzorkovací lahvičky na 5 ml.

5.2 Chromatografie na tenké vrstvě (TLC)

TLC deska se umístí na zahřátou hliníkovou desku (4.9). Na startovní linii koncentrační zóny TLC desky se nanese 10 µl každého z referenčních roztoků a 100 µl roztoku vzorku (vzorků) (5.1).

Podle potřeby lze podpořit odpaření rozpouštědla proudem vzduchu. TLC deska se odstraní z topné desky a nechá se vychladnout na pokojovou teplotu. Vytvájecí komora (4.2) se naplní 100 ml vytvájecího rozpouštědla (3.19).

TLC deska se ihned vloží do nenasycené komory a vyvíjí se při pokojové teplotě, dokud čelo rozpouštědla nepostoupí asi 15 cm od základní linie. Deska se z vytvájecí komory vyjme a vysuší v proudu horkého vzduchu pomocí horkovzdušného vysoušeče vlasů.

Deska se prohlédne v UV světle (4.3) a pozice skvrn se vyznačí. Deska se zahřívá 30 minut v sušárně (4.5) při 100 °C, aby se odstranila nadbytečná kyselina octová. Konzervační přísady v chromatogramu se zviditelní Millonovým činidlem (3.10) tak, že se TLC deska rovnoměrně navlhčí válečkem (4.7) namočeným do činidla.

Poznámka: Skvrny lze rovněž zviditelnit opatrným nanesením kapky Millonova činidla na každou skvrnu označenou pod UV světlem.

Estery kyseliny 4-hydroxybenzoové se projeví jako červené skvrny, 2-fenoxyethanol a 1-fenoxypropan-2-ol jako žluté skvrny. Je však třeba dávat pozor na to, že kyselina 4-hydroxybenzoová, která může být přítomná ve vzorcích jako konzervační látka nebo produkt rozkladu parabenů, se sama o sobě projeví jako červená skvrna. Viz 7.3 a 7.4.

6. Důkaz

Pro každou skvrnu se vypočte hodnota R_f . Skvrny získané z roztoku vzorku se porovnají se skvrnami získanými z referenčních roztoků, pokud jde o jejich hodnoty R_f , jejich chování v UV světle a barvu po zviditelnění. Učiní se předběžné závěry o identitě konzervačních přísad.

Pokud se zdá, že jsou přítomny parabeny, provede se analýza vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) popsanou v oddíle B. Výsledky chromatografie na tenké vrstvě (TLC) a vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) se zkombinují, aby se potvrdila přítomnost 2-fenoxyethanolu, 1-fenoxypropan-2-olu a parabenů.

7. Poznámky

7.1 Vzhledem k toxicitě Millonova činidla je nejvhodnější aplikovat toto činidlo jedním z popsanych způsobů. Postřík se nedoporučuje.

7.2 Jiné sloučeniny obsahující hydroxylové skupiny mohou rovněž při reakci s Millonovým činidlem poskytovat zbarvení. Tabulka barev a hodnot R_f získaných pro řadu konzervačních přísad použitím chromatografie na tenké vrstvě je uvedena v práci N. de Kruijff, M. A. H. Rijk, L. A. Pranato-Soetardhi a A. Schouten (1987): Determination of preservatives in cosmetic products I: Thin-layer chromatographic procedure for the identification of preservatives in cosmetic products (*J. Chromatography* 410, 395-411).

7.3 Hodnoty R_f uvedené v následující tabulce slouží jako ukazatele hodnot, které lze získat:

Sloučenina	R_f	Barva
Kyselina 4-hydroxybenzoová	11	Červená
Methylparaben	12	Červená
Ethylparaben	17	červená
Propylparaben	21	červená
Butylparaben	26	červená
Benzylparaben	16	červená
2-Fenoxyethanol	29	žlutá
1-Fenoxypropan-2-ol	50	žlutá

7.4 V případě kyseliny 4-hydroxybenzoové a methylparabenu ani v případě benzylparabenu a ethylparabenu nedochází k oddělení. Důkaz těchto sloučenin by měl být potvrzen metodou HPLC popsanou v oddíle B a porovnáním retenčních časů vzorku s retenčními časy standardů.

B. STANOVENÍ**1. Rozsah a oblast použití**

V této metodě je specifikován postup pro stanovení 2-fenoxyethanolu, 1-fenoxypropan-2-olu, methyl 4-hydroxybenzoátu, ethyl 4-hydroxybenzoátu, propyl 4-hydroxybenzoátu, butyl 4-hydroxybenzoátu a benzyl 4-hydroxybenzoátu v kosmetických prostředcích.

2. Definice

Množství konzervačních přísad stanovená touto metodou se vyjádří v hmotnostních procentech.

3. Podstata metody

Vzorek se okyselí přidáním kyseliny sírové a poté se suspenduje ve směsi ethanolu a vody. Směs se opatrně zahřeje do rozpuštění tukové fáze, aby se zajistila kvantitativní extrakce, a poté se zfiltruje.

Konzervační látky ve filtrátu se stanoví vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) s obrácenou fází za použití isopropyl 4-hydroxybenzoátu jako vnitřního standardu.

4. Reakční činidla**4.1 Obecně**

Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a. a podle potřeby musí být vhodná pro HPLC. Musí být použita destilovaná voda nebo voda alespoň stejné čistoty.

4.2 Ethanol, absolutní**4.3 2-Fenoxyethanol****4.4 1-Fenoxypropan-2-ol**

- 4.5 Methyl 4-hydroxybenzoát (methylparaben)
- 4.6 Ethyl 4-hydroxybenzoát (ethylparaben)
- 4.7 n-Propyl 4-hydroxybenzoát (propylparaben)
- 4.8 Isopropyl 4-hydroxybenzoát (isopropylparaben)
- 4.9 n-Butyl 4-hydroxybenzoát (butylparaben)
- 4.10 Benzyl 4-hydroxybenzoát (benzylparaben)
- 4.11 Tetrahydrofuran
- 4.12 Methanol
- 4.13 Acetonitril
- 4.14 Roztok kyseliny sírové $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 2 \text{ mol/l}$
- 4.15 Směs ethanol/voda
- Smíchá se devět dílů ethanolu (4.2) a jeden díl vody.
- 4.16 Roztok vnitřního standardu
- Přesně se naváží přibližně 0,25 g isopropylparabenu (4.8), převede se do odměrné baňky na 500 ml, rozpustí se a doplní se směsí ethanol/voda (4.15) na objem.
- 4.17 Mobilní fáze: směs tetrahydrofuran/voda/methanol/acetonitril
- Smíchá se 5 dílů tetrahydrofuranu, 60 dílů vody, 10 dílů methanolu a 25 dílů acetonitrilu.
- 4.18 Zásobní roztok konzervačních přísad
- Do odměrné baňky na 100 ml se přesně naváží přibližně 0,2 g 2-fenoxyethanolu, 0,2 g 1-fenoxypropan-2-olu, 0,05 g methylparabenu, 0,05 g ethylparabenu, 0,05 g propylparabenu, 0,05 g butylparabenu a 0,025 g benzylparabenu, rozpustí se a doplní směsí ethanol/voda na objem.
- Roztok se uchovává v ledničce a je stabilní 1 týden.
- 4.19 Standardní roztoky konzervačních přísad
- Do odměrných baněk na 50 ml se ze zásobního roztoku (4.18) převede 20,00 ml, 10,00 ml, 5,00 ml, 2,00 ml a 1,00 ml. Do každé baňky se přidá 10,00 ml roztoku vnitřního standardu (4.16) a 1,0 ml roztoku kyseliny sírové (4.14) a doplní směsí ethanol/voda na objem. Tyto roztoky se připravují čerstvě.

5. Přístroje a pomůcky

Běžné laboratorní vybavení, a dále:

- 5.1 Vodní lázeň nastavitelná na teplotu $60 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.
- 5.2 HPLC chromatograf s UV detektorem, vlnová délka 280 nm
- 5.3 Analytická kolona:
- Korozivzdorná ocel, délka 25 cm, vnitřní průměr 4,6 mm (nebo délka 12,5 cm a vnitřní průměr 4,6 mm), naplněná Nucleosilem 5C18, nebo ekvivalentním sorbentem (viz 10.1).
- 5.4 Skleněné zkumavky na 100 ml se šroubovacím uzávěrem
- 5.5 Varné kamínky, karborundum, velikost 2 až 4 mm nebo ekvivalentní

6. Postup

6.1 Příprava vzorku

6.1.1 Příprava vzorku bez přidání vnitřního standardu

Do zkumavky na 100 ml se šroubovacím uzávěrem se odváží asi 1,0 g vzorku. Do zkumavek se pipetou přidá 1,0 ml roztoku kyseliny sírové (4.14) a 50,0 ml směsi ethanol/voda (4.15). Přidá se přibližně 1 g varných kamínků (5.5), zkumavka se uzavře a silně se protřepe, dokud nevznikne homogenní suspenze. Protřepává se alespoň jednu minutu. Zkumavka se vloží na 5 minut do vodní lázně (5.1) o teplotě $60 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, aby se podpořila extrakce konzervačních přísad do ethanolové fáze.

Zkumavka se ihned ochladí pod proudem studené vody a extrakt se uloží na jednu hodinu do ledničky. Extrakt se zfiltruje přes filtrační papír. Asi 2 ml filtrátu se převedou do 5 ml vzorkovací lahvičky. Extrakty se uloží do ledničky a stanovení metodou HPLC se provede do 24 hodin.

6.1.2 Příprava vzorků včetně přidání vnitřního standardu

Do skleněné zkumavky na 100 ml se šroubovacím uzávěrem se s přesností na tři desetinná místa odváží $1,0 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$ vzorku.

Do zkumavek se pipetou přidá 1,0 ml roztoku kyseliny sírové a 40,0 ml směsi ethanol/voda. Přidá se přibližně 1 g varných kamínků (5.5) a přesně 10,00 ml roztoku vnitřního standardu. Zkumavka se uzavře a silně se protřepe, dokud nevznikne homogenní suspenze. Protřepává se alespoň jednu minutu. Zkumavka se vloží na 5 minut do vodní lázně o teplotě $60 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$, aby se podpořila extrakce konzervačních přísad do ethanolové fáze.

Zkumavka se ihned ochladí pod proudem studené vody a extrakt se uloží na jednu hodinu do ledničky. Extrakt se zfiltruje přes filtrační papír.

Asi 2 ml filtrátu se převedou do 5 ml vzorkovací lahvičky (zkušební roztok). Extrakt se uloží do ledničky a stanovení metodou HPLC se provede do 24 hodin.

6.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

6.2.1 Chromatografické podmínky

- Mobilní fáze: směs tetrahydrofuran/voda/methanol/acetonitril (4.17)
- Průtoková rychlost: 1,5 ml za minutu
- Detekční vlnová délka: 280 nm

6.2.2 Kalibrace

Nastříkne se 10 μl každého ze standardních roztoků konzervačních přísad (4.19). Ze získaných chromatogramů se stanoví poměr výšek píků standardních roztoků konzervačních přísad k píku vnitřního standardu. Pro každou konzervační přísadu se sestrojí křivka závislosti těchto poměrů na koncentraci standardních roztoků.

6.2.3 Stanovení

Do chromatografu se nastříkne 10 μl roztoku vzorku bez vnitřního standardu (6.1.1) a zaznamená se chromatogram.

Nastříkne se 10 μl jednoho ze standardních roztoků konzervačních přísad (4.19) a zaznamená se chromatogram. Získané chromatogramy se porovnají.

Není-li v chromatogramu extraktu vzorku (6.1.1) přítomen pík s přibližně stejným retenčním časem, jako je retenční čas píku isopropylparabenu (doporučený vnitřní standard), pokračuje se nastříknutím 10 μl roztoku vzorku s vnitřním standardem (6.1.2). Chromatogram se zaznamená a změří se výšky píků.

Je-li v chromatogramu roztoku vzorku rušivý pík s retenčním časem přibližně stejným jako retenční čas isopropylparabenu, měl by být vybrán jiný vnitřní standard.

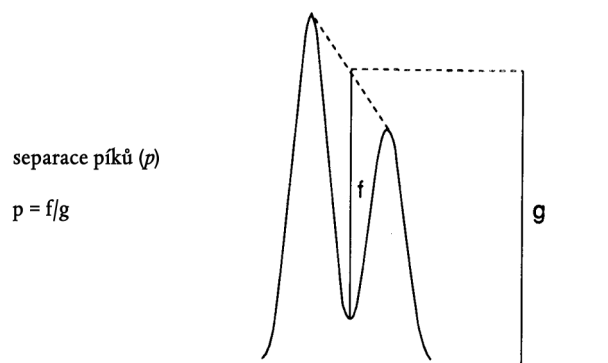
Není-li jedna z vyšetřovaných konzervačních přísad v chromatogramu vzorku přítomna, lze tuto konzervační přísadu použít jako vnitřní standard.

Vypočítají se poměry výšek píků vyšetřovaných konzervačních přísad k výšce píku vnitřního standardu.

Je třeba ověřit, že je kalibrační křivka použitého standardu lineární.

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.),



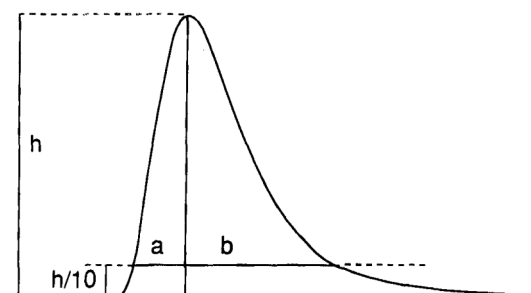
Obrázek 1: Separace píků

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 (A_s) 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 za minutu,

Faktor asymetrie (A_s)

$$A_s = b/a$$



Obrázek 2: Faktor asymetrie píku

- základna musí být stabilní.

7. Výpočet

Pro výpočet koncentrace konzervačních přísad v roztoku vzorku se použije kalibrační křivka (6.2.2) a hodnoty poměrů výšek píků vyšetřovaných konzervačních přísad k výšce píku vnitřního standardu. Obsah (w_i) 2-fenoxyethanolu, 1-fenoxypropan-2-olu, methyl 4-hydroxybenzoátu, ethyl 4-hydroxybenzoátu, propyl 4-hydroxybenzoátu, butyl 4-hydroxybenzoátu a benzyl 4-hydroxybenzoátu v hmotnostních procentech (% m/m) se vypočte pomocí vzorce:

$$\%w_i(m/m) = \frac{b_i}{200 \times a}$$

kde

b_i = koncentrace konzervační přísady i ve zkušebním roztoku ($\mu\text{g/ml}$) odečtená z kalibrační křivky a

a = hmotnost zkušebního vzorku (g).

8. Opakovatelnost ⁽¹⁾

Viz poznámka v bodu 10.5.

9. Reprodukovatelnost ⁽¹⁾

Viz poznámka v bodu 10.5.

10. Poznámky

10.1 Stacionární fáze

Retenční chování rozpouštěných látek při stanoveních HPLC výrazně závisí na typu, značce a historii stacionární fáze. Zda lze kolonu použít pro oddělení vyšetřovaných konzervačních přísad, lze usoudit z výsledků získaných pro standardní roztoky (viz poznámky v bodu 6.2.3). Kromě navrhovaného materiálu náplně kolony byly shledány vhodnými také materiály Hypersil ODS a Zorbax ODS.

Za účelem dosažení požadovaného oddělení lze popřípadě optimalizovat složení mobilní fáze.

10.2 Detekční vlnová délka

Zkouška robustnosti popisované metody ukázala, že nepatrná změna detekční vlnové délky může mít významný vliv na výsledky stanovení.

Tento parametr musí být proto během analýzy pečlivě kontrolován.

⁽¹⁾ ISO 5725.

10.3 Rušivé vlivy

Za podmínek popsaných v této metodě je eluováno mnoho dalších sloučenin, jako jsou další konzervační přísady a kosmetické přísady. Retenční časy velkého množství konzervačních přísad uvedených v příloze VI směrnice Rady týkající se kosmetických prostředků jsou uvedeny v práci N. de Kruijf, M. A. H. Rijk, L. A. Pranato-Soetardhi, A. Schouten, (1989): Determination of preservatives in cosmetic products II. High-performance liquid chromatographic identification (*J. Chromatography*, 469, 317-398).

10.4 Pro ochranu analytické kolony lze použít vhodnou předkolonu.

10.5 Metoda byla zkoušena při okružním pokusu, na němž se podílelo devět laboratoří. Byly analyzovány tři vzorky. V následující tabulce jsou pro každý ze tří vzorků uvedeny střední hodnoty v % m/m (m), opakovatelnosti (r) a reprodukovatelnosti (R) zjištěné pro analyty, které byly ve vzorcích obsaženy:

Vzorek		2-Fenoxyethanol	1-Fenoxypropan-2-ol	Methylparaben	Ethylparaben	Propylparaben	Butylparaben	Benzylparaben
Vitaminový krém	m	1,124		0,250	0,0628	0,031	0,0906	
	r	0,016		0,018	0,0035	0,0028	0,0044	
	R	0,176		0,030	0,0068	0,0111	0,0034	
Základní pleťový krém	m	1,196		0,266	0,076			
	r	0,040		0,003	0,002			
	R	0,147		0,022	0,004			
Masážní krém	m		0,806			0,180	0,148	0,152
	r		0,067			0,034	0,013	0,015
	R		0,112			0,078	0,012	0,016