

SIEBTE RICHTLINIE 96/45/EG DER KOMMISSION

vom 2. Juli 1996

über Analysemethoden zur Kontrolle der Zusammensetzung kosmetischer Mittel

(Text von Bedeutung für den EWR)

DIE KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN —

gestützt auf den Vertrag zur Gründung der Europäischen Gemeinschaft,

gestützt auf die Richtlinie 76/768/EWG des Rates vom 27. Juli 1976 zur Angleichung der Rechtsvorschriften der Mitgliedstaaten über kosmetische Mittel⁽¹⁾, zuletzt geändert durch die Richtlinie 95/34/EG der Kommission⁽²⁾, insbesondere auf Artikel 8 Absatz 1,

in Erwägung nachstehender Gründe:

Die Richtlinie 76/768/EWG sieht amtliche Kontrollen der kosmetischen Mittel vor, mit denen sichergestellt werden soll, daß die in den Gemeinschaftsbestimmungen über die Zusammensetzung der kosmetischen Mittel vorgeschriebenen Bedingungen erfüllt sind.

Alle erforderlichen Analysemethoden sollten so rasch wie möglich festgelegt werden. Verschiedene Methoden wurden bereits mit der Richtlinie 80/1335/EWG der Kommission⁽³⁾, geändert durch die Richtlinie 87/143/EWG⁽⁴⁾, mit der Richtlinie 82/434/EWG der Kommission⁽⁵⁾, geändert durch die Richtlinie 90/207/EWG⁽⁶⁾, und mit den Richtlinien der Kommission 83/514/EWG⁽⁷⁾, 85/490/EWG⁽⁸⁾, 93/73/EWG⁽⁹⁾ und 95/32/EG⁽¹⁰⁾ festgelegt.

Die Methoden zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung von 2-Phenoxyethanol, 1-Phenoxypropan-2-ol, Methyl-, Ethyl-, Propyl-, Butyl- und Benzyl-4-hydroxybenzoat in kosmetischen Mitteln stellen eine siebte Etappe dar.

Die in dieser Richtlinie vorgesehenen Maßnahmen entsprechen der Stellungnahme des Ausschusses für die Anpassung der Richtlinie 76/768/EWG an den technischen Fortschritt —

HAT FOLGENDE RICHTLINIE ERLASSEN:

Artikel 1

Die Mitgliedstaaten treffen alle erforderlichen Maßnahmen, damit bei der amtlichen Kontrolle der

kosmetischen Mittel der Nachweis und die quantitative Bestimmung von 2-Phenoxyethanol, 1-Phenoxypropan-2-ol, Methyl-, Ethyl-, Propyl-, Butyl- und Benzyl-4-hydroxybenzoat nach den im Anhang beschriebenen Methoden erfolgen.

Artikel 2

(1) Die Mitgliedstaaten erlassen die erforderlichen Rechts- und Verwaltungsvorschriften, um dieser Richtlinie bis spätestens 30. September 1997 nachzukommen. Sie setzen die Kommission unverzüglich davon in Kenntnis.

(2) Wenn die Mitgliedstaaten diese Vorschriften erlassen, nehmen sie in diesen Vorschriften selbst oder durch einen Hinweis bei der amtlichen Veröffentlichung auf diese Richtlinie Bezug. Die Mitgliedstaaten regeln die Einzelheiten dieser Bezugnahme.

(3) Die Mitgliedstaaten teilen der Kommission den Wortlaut der innerstaatlichen Rechtsvorschriften mit, die sie auf dem unter diese Richtlinie fallenden Gebiet erlassen.

Artikel 3

Diese Richtlinie tritt am zwanzigsten Tag nach ihrer Veröffentlichung im *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften* in Kraft.

Artikel 4

Diese Richtlinie ist an die Mitgliedstaaten gerichtet.

Brüssel, den 2. Juli 1996

Für die Kommission

Emma BONINO

Mitglied der Kommission

⁽¹⁾ ABl. Nr. L 262 vom 27. 9. 1976, S. 169.

⁽²⁾ ABl. Nr. L 167 vom 18. 7. 1995, S. 19.

⁽³⁾ ABl. Nr. L 383 vom 31. 12. 1980, S. 27.

⁽⁴⁾ ABl. Nr. L 57 vom 27. 2. 1987, S. 56.

⁽⁵⁾ ABl. Nr. L 185 vom 30. 6. 1982, S. 1.

⁽⁶⁾ ABl. Nr. L 108 vom 28. 4. 1990, S. 92.

⁽⁷⁾ ABl. Nr. L 291 vom 24. 10. 1983, S. 9.

⁽⁸⁾ ABl. Nr. L 295 vom 7. 11. 1985, S. 30.

⁽⁹⁾ ABl. Nr. L 231 vom 14. 9. 1993, S. 34.

⁽¹⁰⁾ ABl. Nr. L 178 vom 28. 7. 1995, S. 20.

ANHANG

NACHWEIS UND BESTIMMUNG VON 2-PHENOXYETHANOL, 1-PHENOXYPROPAN-2-OL, METHYL-, ETHYL-, PROPYL-, BUTYL- UND BENZYL-4-HYDROXYBENZOAT IN KOSMETISCHEN MITTELN

A. NACHWEIS

1. **Zweck und Anwendungsbereich**

Diese Methode beschreibt ein dünnschichtchromatographisches Verfahren, das in Verbindung mit der in Abschnitt B beschriebenen quantitativen Bestimmung den Nachweis von 2-Phenoxyethanol, 1-Phenoxypropan-2-ol, Methyl-4-hydroxybenzoat, Ethyl-4-hydroxybenzoat, Propyl-4-hydroxybenzoat, Butyl-4-hydroxybenzoat und Benzyl-4-hydroxybenzoat in kosmetischen Mitteln ermöglicht.

2. **Kurzbeschreibung**

Die Konservierungsstoffe werden mit Aceton aus der angesäuerten Probe des kosmetischen Mittels extrahiert. Nach Filtration wird die Acetonlösung mit Wasser gemischt, und die Fettsäuren werden im alkalischen Medium als ihre Calciumsalze ausgefällt. Die alkalische Aceton-Wasser-Mischung wird mit Diethylether zur Entfernung der lipophilen Stoffe extrahiert. Nach Ansäuern werden die Konservierungsstoffe mit Diethylether extrahiert. Ein aliquoter Teil des Diethylether-extrakts wird auf eine Kieselgel-Dünnschichtplatte aufgetragen. Nach Entwicklung der Dünnschichtplatte wird das erhaltene Chromatogramm unter UV-Licht betrachtet und mit Millon's Reagenz sichtbar gemacht.

3. **Reagenzien**3.1. **Allgemeines**

Alle Reagenzien müssen analysenrein sein. Wasser muß destilliert sein oder zumindest gleichwertige Reinheit aufweisen.

3.2. Aceton

3.3. Diethylether

3.4. n-Pentan

3.5. Methanol

3.6. Eisessig

3.7. Salzsäure, $c(\text{HCl}) = 4 \text{ mol/l}$ 3.8. Kalilauge, $c(\text{KOH}) = 4 \text{ mol/l}$ 3.9. Calciumchlorid-Dihydrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

3.10. Nachweisreagenz: Millon's Reagenz

Millon's Reagenz [vorwiegend Quecksilber(II)-nitrat] ist als gebrauchsfertige Lösung im Handel erhältlich (Fluka 69820).

3.11. 2-Phenoxyethanol

3.12. 1-Phenoxypropan-2-ol

3.13. Methyl-4-hydroxybenzoat (Methylparaben)

3.14. Ethyl-4-hydroxybenzoat (Ethylparaben)

3.15. n-Propyl-4-hydroxybenzoat (Propylparaben)

3.16. n-Butyl-4-hydroxybenzoat (Butylparaben)

3.17. Benzyl-4-hydroxybenzoat (Benzylparaben)

3.18. Vergleichslösungen

Jeweils 0,1 %ige (m/V) Lösungen der Vergleichssubstanzen 3.11, 3.12, 3.13, 3.14, 3.15, 3.16 und 3.17 in Methanol

3.19. Fließmittel

88 Volumenteile n-Pentan (3.4) werden mit 12 Volumenteilen Eisessig (3.6) gemischt.

4. Geräte

Normale Laborausstattung und

- 4.1. Wasserbad, auf 60 °C konstant einstellbar
- 4.2. Entwicklungskammer (nicht mit Filterpapier ausgekleidet)
- 4.3. UV-Lampe, 254 nm
- 4.4. DC-Fertigplatten (200 mm × 200 mm), Sorbensschicht: Kieselgel 60 F₂₅₄ (Fluoreszenzindikator), Schichtdicke: 0,25 mm mit Konzentrierungszone 25 mm × 200 mm (Merck 11798, Darmstadt oder gleichwertiges Erzeugnis)
- 4.5. Trockenschrank, bis auf 105 °C konstant einstellbar
- 4.6. Heißluftfön
- 4.7. Woll-Farbroller, etwa 10 cm breit, Außendurchmesser etwa 3,5 cm. Die Dicke der Wollschicht soll 2 bis 3 mm betragen; gegebenenfalls ist die Wolle zu kürzen. (Siehe Anmerkung unter 5.2).
- 4.8. Erlenmeyerkolben mit Schliffstopfen, 50 ml
- 4.9. Elektrische Heizplatte mit Thermostatregler. Temperatureinstellung etwa 80 °C. Die Heizplatte ist mit einer Aluminiumplatte von 20 cm × 20 cm und etwa 6 mm Dicke zur Erzielung einer gleichmäßigen Wärmeverteilung abzudecken.

5. Durchführung

5.1. Vorbereitung der Probe

Ungefähr 1,0 g der Probe wird in einen 50-ml-Erlenmeyerkolben (4.8) mit 4 Tropfen Salzsäure (3.7) und 40 ml Aceton versetzt.

Bei stark basischen Erzeugnissen, wie Feinseife, werden 20 Tropfen Salzsäure hinzugefügt. Der Erlenmeyerkolben wird verschlossen und vorsichtig auf etwa 60 °C erwärmt, damit die Extraktion der Konservierungsstoffe in die Aceton-Phase erleichtert wird, und anschließend eine Minute lang kräftig geschüttelt.

Der pH-Wert der Mischung wird mit pH-Indikatorpapier gemessen und mit Salzsäure auf ≤ 3 eingestellt. Die Mischung wird erneut eine Minute lang kräftig geschüttelt.

Die Mischung wird auf Zimmertemperatur abgekühlt und durch ein Papierfilter in einen Erlenmeyerkolben filtriert. 20 ml des Filtrats werden in einen 200-ml-Erlenmeyerkolben übergeführt, mit 60 ml Wasser versetzt und gemischt. Mit Kalilauge (3.8) wird der pH-Wert der Mischung gegen Indikatorpapier auf ungefähr 10 eingestellt.

Nach Zusatz von 1 g Calciumchlorid (3.9) wird die Mischung kräftig geschüttelt und danach durch ein Papierfilter in einen 250-ml-Scheidetrichter, der 75 ml Diethylether enthält, filtriert. Die Mischung wird eine Minute lang kräftig geschüttelt. Nach der Phasentrennung wird die wäßrige Phase in einen 200-ml-Erlenmeyerkolben abgelassen. Mit Hilfe von Indikatorpapier wird der pH-Wert der wäßrigen Lösung mit Salzsäure auf ungefähr 2 eingestellt. Nach Zusatz von 10 ml Diethylether wird die Mischung eine Minute lang kräftig geschüttelt. Nach der Phasentrennung werden etwa 2 ml der Etherphase in ein 5-ml-Probenfläschchen übergeführt.

5.2. Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtplatte (4.4) wird auf die erwärmte Aluminiumplatte (4.9) gelegt. Von jeder Vergleichslösung (3.18) werden 10 µl und von der Probelösung (5.1) 100 µl auf die Startlinie in der Konzentrierungszone der Dünnschichtplatte aufgetragen.

Erforderlichenfalls kann zur Beschleunigung der Verdunstung des Lösungsmittels ein Luftstrom verwendet werden. Die Dünnschichtplatte wird von der Heizplatte genommen und auf Raumtemperatur abgekühlt. 100 ml des Fließmittels (3.19) werden in die Entwicklungskammer (4.2) gefüllt und die Dünnschichtplatte sofort in die ungesättigte Kammer gestellt und bei Raumtemperatur bis zu einer Höhe von etwa 15 cm entwickelt. Nach Entnahme aus der Kammer wird die Platte im Heißluftstrom (Fön) getrocknet.

Die Dünnschichtplatte wird im UV-Licht (4.3) betrachtet, und die Positionen der Flecke werden markiert. Anschließend wird die Platte im Trockenschrank (4.5) 30 Minuten lang bei 100 °C erwärmt, um überschüssige Essigsäure zu entfernen. Die Konservierungsstoffe werden auf der Dünnschichtplatte durch Eintauchen des Farbrollers (4.7) in das Millon's Reagenz (3.10) und Überstreichen der Platte bis zur gleichmäßigen Benetzung sichtbar gemacht.

Hinweis: Alternativ können die Flecke durch sorgfältiges Auftragen eines Tropfens Millon's Reagenz auf die im UV-Licht markierten Flecke sichtbar gemacht werden.

Die Ester der 4-Hydroxybenzoesäure erscheinen als rote, 2-Phenoxyethanol und 1-Phenoxypropan-2-ol als gelbe Flecke. Zu beachten ist allerdings, daß die 4-Hydroxybenzoesäure selbst, die in den Proben als Konservierungsstoff oder als Zersetzungsprodukt ihrer Ester anwesend sein kann, ebenfalls als roter Fleck erscheint. (Siehe unter 7.3 und 7.4).

6. Auswertung

Der R_f -Wert wird für jeden Fleck berechnet. Die für die Probelösung erhaltenen Flecke werden mit denen der Vergleichslösungen im Hinblick auf ihre R_f -Werte, ihr Verhalten im UV-Licht und ihre Färbung nach Sichtbarmachung mit dem Reagenz verglichen. Im Ergebnis dieses Vergleichs wird eine vorläufige Schlußfolgerung gezogen, welche Konservierungsstoffe vorliegen. Zur Bestätigung sollte das im Abschnitt B beschriebene HPLC-Verfahren durchgeführt werden. Der Nachweis der Konservierungsstoffe wird abschließend durch Kombination der Ergebnisse der DC und der HPLC geführt.

7. Bemerkungen

- 7.1. Millon's Reagenz wird wegen seiner Toxizität am besten nach einem der beschriebenen Verfahren angewandt. Sprühen ist nicht zu empfehlen.
- 7.2. Andere Hydroxylgruppen enthaltende Verbindungen können ebenfalls mit Millon's Reagenz angefärbt werden. Eine Übersicht über Färbungen und R_f -Werte für eine Reihe von Konservierungsstoffen findet man in: N. De Kruijf, M.A.H. Rijk, L.A. Pranoto-Soetardhi und A. Schouten: Determination of preservatives in cosmetic products I: Thin layer chromatographic procedure for the identification of preservatives in cosmetic products (J. Chromatogr., 410, 395-411 (1987)).
- 7.3. Die in folgender Tabelle aufgelisteten R_f -Werte geben Hinweise auf die zu erwartenden Werte.

Substanz	R_f	Anfärbung
4-Hydroxybenzoesäure	11	rot
Methylparaben	12	rot
Ethylparaben	17	rot
Propylparaben	21	rot
Butylparaben	26	rot
Benzylparaben	16	rot
2-Phenoxyethanol	29	gelb
1-Phenoxypropan-2-ol	50	gelb

- 7.4. Keine Trennung erreicht man für 4-Hydroxybenzoesäure und Methylparaben bzw. für Benzylparaben und Ethylparaben. Der Nachweis dieser Substanzen sollte mittels HPLC nach Abschnitt B durch Vergleich der Retentionszeiten der Probenpeaks mit denen der Standards bestätigt werden.

B. BESTIMMUNG

1. Zweck und Anwendungsbereich

Diese Methode beschreibt ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von 2-Phenoxyethanol, 1-Phenoxypropan-2-ol, Methyl-4-hydroxybenzoat, Ethyl-4-hydroxybenzoat, Propyl-4-hydroxybenzoat, Butyl-4-hydroxybenzoat und Benzyl-4-hydroxybenzoat in kosmetischen Mitteln.

2. Definition

Die nach diesem Verfahren ermittelten Gehalte an Konservierungsstoffen werden in Prozent (% m/m) angegeben.

3. Kurzbeschreibung

Nach dem Ansäuern mit Schwefelsäure wird die Probe in einer Mischung aus Ethanol und Wasser suspendiert. Die Mischung wird vorsichtig bis zum Schmelzen der Lipidphase erwärmt, um die quantitative Extraktion zu gewährleisten.

Nach der Filtration wird der Gehalt an Konservierungsstoffen durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit Umkehrphase und Isopropyl-4-hydroxybenzoat als innerem Standard bestimmt.

4. Reagenzien

4.1. Allgemeines

Alle Reagenzien müssen analysenrein und, wo erforderlich, für die HPLC geeignet sein. Wasser muß destilliert sein oder zumindest gleichwertige Reinheit aufweisen.

4.2. Absolutes Ethanol

4.3. 2-Phenoxyethanol

4.4. 1-Phenoxypropan-2-ol

- 4.5. Methyl-4-hydroxybenzoat (Methylparaben)
- 4.6. Ethyl-4-hydroxybenzoat (Ethylparaben)
- 4.7. n-Propyl-4-hydroxybenzoat (Propylparaben)
- 4.8. Isopropyl-4-hydroxybenzoat (Isopropylparaben)
- 4.9. n-Butyl-4-hydroxybenzoat (Butylparaben)
- 4.10. Benzyl-4-hydroxybenzoat (Benzylparaben)
- 4.11. Tetrahydrofuran
- 4.12. Methanol
- 4.13. Acetonitril
- 4.14. Schwefelsäure, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 2 \text{ mol/l}$
- 4.15. Ethanol/Wasser-Mischung
9 Volumenteile Ethanol (4.2) werden mit 1 Volumenteil Wasser gemischt.
- 4.16. Lösung des inneren Standards
Ungefähr 0,25 g Isopropylparaben (4.8) werden in einen 500-ml-Meßkolben eingewogen, in der Ethanol/Wasser-Mischung (4.15) gelöst und zur Marke aufgefüllt.
- 4.17. Mobile Phase
5 Volumenteile Tetrahydrofuran, 60 Volumenteile Wasser, 10 Volumenteile Methanol und 25 Volumenteile Acetonitril werden gemischt.
- 4.18. Stammlösung der Konservierungsstoffe
Ungefähr 0,2 g 2-Phenoxyethanol, 0,2 g 1-Phenoxypropan-2-ol, 0,05 g Methylparaben, 0,05 g Ethylparaben, 0,05 g Propylparaben, 0,05 g Butylparaben und 0,025 g Benzylparaben werden in einen 100-ml-Meßkolben genau eingewogen, gelöst und mit der Ethanol/Wasser-Mischung zur Marke aufgefüllt.
Die Lösung wird im Kühlschrank aufbewahrt und ist eine Woche lang haltbar.
- 4.19. Standardlösungen der Konservierungsstoffe
Von der Stammlösung (4.18) werden 20,00 ml, 10,00 ml, 5,00 ml, 2,00 ml bzw. 1,00 ml in eine Reihe von 50-ml-Meßkolben pipettiert. Nach Zusatz von jeweils 10,00 ml der Lösung des inneren Standards (4.16) und 1,0 ml Schwefelsäure (4.14) wird mit der Ethanol/Wasser-Mischung zur Marke aufgefüllt und gemischt. Die Lösungen sind frisch herzustellen.
5. **Geräte**
Normale Laborausstattung und
 - 5.1. Wasserbad, auf $60^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ einstellbar
 - 5.2. Hochleistungsflüssigkeitschromatograph mit UV-Detektor, Wellenlänge 280 nm
 - 5.3. Analytische Trennsäule
Material: Edelstahl, Länge: 12,5 cm oder 25 cm, Innendurchmesser: 4,6 mm, aktiver Festkörper: Mit Octadecylgruppen modifiziertes Kieselgel (Nucleosil 5 C18 oder gleichwertiges Erzeugnis (siehe 10.1))
 - 5.4. Erlenmeyerkolben mit Schliffstopfen, 100 ml
 - 5.5. Siedesteinchen (Karbonat), Größe 2 bis 4 mm, oder gleichwertiges Material
6. **Durchführung**
 - 6.1. Vorbereitung der Probe
 - 6.1.1. Vorbereitung der Probe ohne Zugabe des inneren Standards
Ungefähr 1 g der Probe wird in einen 100-ml-Erlenmeyerkolben eingewogen. Nach Zusatz von 1,00 ml Schwefelsäure (4.14) und 50,0 ml der Ethanol/Wasser-Mischung (4.15) sowie ungefähr 1 g Siedesteinchen (5.5) wird der verschlossene Kolben kräftig geschüttelt, bis eine homogene Suspension entstanden ist, mindestens jedoch 1 Minute. Zur Verbesserung der Extraktion wird der Kolben 5 Minuten im Wasserbad (5.1) auf $60^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ erwärmt.
Danach wird der Kolben sofort unter fließendem kaltem Wasser abgekühlt und anschließend eine Stunde lang im Kühlschrank aufbewahrt. Der Extrakt wird durch ein Papierfilter filtriert. Etwa 2 ml des Filtrats werden in ein 5-ml-Probenfläschchen übergeführt und im Kühlschrank aufbewahrt. Die HPLC-Bestimmung ist innerhalb von 24 Stunden nach Herstellung der Probelösung durchzuführen.

6.1.2. Vorbereitung der Probe unter Zugabe des inneren Standards

1,0 g \pm 0,1 g (a Gramm) der Probe wird auf drei Dezimalstellen genau in einen 100-ml-Erlenmeyerkolben eingewogen.

Nach Zusatz von 1,00 ml Schwefelsäure und 40,0 ml der Ethanol/Wasser-Mischung sowie ungefähr 1 g Siedesteinchen und genau 10,00 ml der Lösung des inneren Standards (4.16) wird der verschlossene Kolben kräftig geschüttelt, bis eine homogene Suspension entstanden ist, mindestens jedoch 1 Minute. Zur Verbesserung der Extraktion wird der Kolben 5 Minuten im Wasserbad auf 60 °C \pm 1 °C erwärmt.

Danach wird der Kolben sofort unter fließendem kaltem Wasser abgekühlt und anschließend eine Stunde lang im Kühlschrank aufbewahrt. Der Extrakt wird durch ein Papierfilter filtriert.

Etwa 2 ml des Filtrats werden in ein 5-ml-Probenfläschchen übergeführt (Prüflösung) und im Kühlschrank aufbewahrt. Die HPLC-Bestimmung ist innerhalb von 24 Stunden nach Herstellung der Prüflösung durchzuführen.

6.2. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

6.2.1. Bedingungen für die Chromatographie

- Mobile Phase: Tetrahydrofuran/Wasser/Methanol/Acetonitril-Mischung (4.17)
- Volumenstrom der mobilen Phase: 1,5 ml/min
- Detektionswellenlänge: 280 nm

6.2.2. Kalibrierung

10 μ l jeder der Standardlösungen der Konservierungsstoffe (4.19) werden chromatographiert, die Chromatogramme aufgezeichnet und die Peakhöhen ermittelt. Für jede Standardlösung wird das Verhältnis zwischen den Peakhöhen der zu bestimmenden Konservierungsstoffe und der des inneren Standards ermittelt. Es wird für jeden Konservierungsstoff eine Kalibrierkurve gezeichnet, indem das Peakhöhenverhältnis in Abhängigkeit von der Konzentration des Konservierungsstoffes aufgetragen wird, oder es wird die Regressionsgerade berechnet. Man vergewissert sich, daß sich für die Standardlösungen eine lineare Kurve ergibt.

6.2.3. Bestimmung

Jeweils 10 μ l der Probelösung ohne inneren Standard (6.1.1) und einer der Standardlösungen der Konservierungsstoffe (4.19) werden chromatographiert und die Chromatogramme aufgezeichnet. Die Chromatogramme der Probe- und der Standardlösung werden verglichen.

Falls das Chromatogramm der Probelösung (6.1.1) keinen Peak mit der Retentionszeit des empfohlenen inneren Standards Isopropylparaben zeigt, werden 10 μ l der Probelösung mit innerem Standard (6.1.2) chromatographiert, das Chromatogramm aufgezeichnet und die Peakhöhen ermittelt.

Falls im Chromatogramm der Probelösung (6.1.1) ein störender Peak erscheint, der etwa dieselbe Retentionszeit wie Isopropylparaben aufweist, ist ein anderer geeigneter innerer Standard zu wählen.

Als innerer Standard kann einer der zu bestimmenden Konservierungsstoffe verwendet werden, der nicht auf dem Chromatogramm der Probelösung erscheint.

Es wird das Verhältnis zwischen den Peakhöhen der zu bestimmenden Konservierungsstoffe und der des inneren Standards ermittelt.

Für die Standardlösung soll die Eichkurve eine Gerade bilden.

Die Chromatogramme der Standardlösungen und der Probelösung sollen folgende Bedingungen erfüllen:

- Peakauflösung p: Die Peakauflösung des am schlechtesten getrennten Paares soll mindestens 0,90 betragen (zur Definition der Peakauflösung s. Abb. 1).

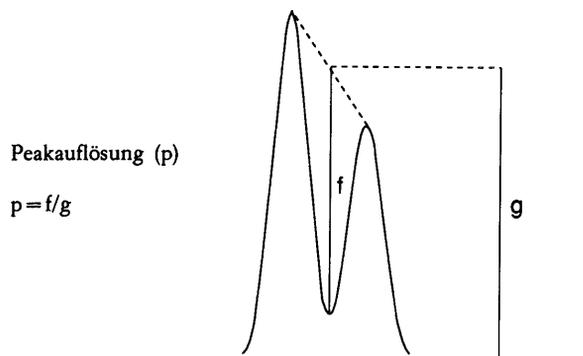


Abb. 1: Peakauflösung

Falls die erforderliche Auflösung nicht erreicht wird, verwendet man entweder eine leistungsfähigere Säule oder verändert die Zusammensetzung der mobilen Phase, bis die Bedingung erfüllt ist.

- Peakasymmetrie: Der Asymmetriefaktor A_s aller interessierenden Peaks soll zwischen 0,9 und 1,5 liegen (zur Definition des Asymmetriefaktors s. Abb. 2). Bei der Aufzeichnung des Chromatogramms zur Bestimmung der Peakasymmetrie sollte der Papiervorschub mindestens 2 cm/min betragen.

Asymmetriefaktor (A_s)

$$A_s = b/a$$

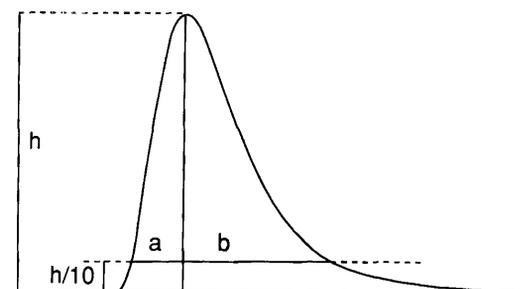


Abb. 2: Asymmetriefaktor

- Basislinie: Die Basislinie sollte stabil sein.

7. Berechnung

Unter Verwendung der Verhältnisse zwischen den Peakhöhen der zu bestimmenden Konservierungsstoffe und der Peakhöhe des inneren Standards wird die Konzentration der Konservierungsstoffe in der Prüflösung aus der Kalibrierkurve (6.2.2) abgelesen bzw. aus der Gleichung für die Regressionsgerade berechnet. Der Gehalt w_i an 2-Phenoxyethanol, 1-Phenoxypropan-2-ol, Methyl-4-hydroxybenzoat, Ethyl-4-hydroxybenzoat, Propyl-4-hydroxybenzoat, Butyl-4-hydroxybenzoat und Benzyl-4-hydroxybenzoat in Prozent (% m/m) der Probe wird nach folgender Formel berechnet:

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

wobei:

b_i = aus der Kalibrierkurve abgelesene Konzentration des Konservierungsstoffes i in der Prüflösung (6.1.2) in Mikrogramm je Milliliter bzw. der aus der Gleichung für die Regressionsgerade berechnete Wert

a = Einwaage der untersuchten Probe (6.1.2) in Gramm

8. Wiederholbarkeit⁽¹⁾

Siehe Bemerkungen unter 10.5

9. Vergleichbarkeit⁽¹⁾

Siehe Bemerkungen unter 10.5

10. Bemerkungen

10.1. Stationäre Phase

Das Retentionsverhalten der Substanzen ist stark abhängig vom Typ, der Handelsmarke und der Vorgeschichte der Trennsäule (stationäre Phase). Ob eine Säule für die Trennung der zu bestimmenden Konservierungsstoffe geeignet ist, kann aus den für die Standardlösungen gewonnenen Ergebnissen geschlossen werden (siehe Bemerkungen unter 6.2.3). Neben der vorgeschlagenen Handelsmarke sind auch die Füllmaterialien Hypersil ODS und Zorbax ODS als stationäre Phasen geeignet.

Alternativ kann auch die Zusammensetzung der mobilen Phase zur Erzielung der geforderten Auflösung optimiert werden.

10.2. Detektionswellenlänge

Der Robustheitstest (ruggedness test) mit der beschriebenen Methode hat ergeben, daß eine geringfügige Änderung der Detektionswellenlänge sich signifikant auf die Ergebnisse der Bestimmung auswirken kann.

Bei der Analyse muß daher dieser Parameter sorgfältig kontrolliert werden.

⁽¹⁾ ISO 5725.

10.3. Interferenzen

Unter den Bedingungen der beschriebenen Methode werden auch viele andere Substanzen, wie weitere Konservierungsstoffe und kosmetische Zusatzstoffe, eluiert. Retentionszeiten für eine Vielzahl der im Anhang VI der Richtlinie des Rates über kosmetische Mittel erwähnten Konservierungsstoffe findet man in: N. De Kruijf, M.A.H. Rijk, L.A. Pranato-Soetardhi und A. Schouten: Determination of preservatives in cosmetic products II. High performance liquid chromatographic identification (J. Chromatogr. 469, 317-328 (1989)).

10.4. Zum Schutz der Trennsäule empfiehlt sich die Verwendung einer geeigneten Vorsäule.

10.5. Die Methode ist in einem Ringversuch unter Beteiligung von 9 Laboratorien an drei kosmetischen Erzeugnissen untersucht worden. In der folgenden Tabelle sind für jede der drei Proben der Mittelwert m in Prozent (% m/m), die Wiederholbarkeit r und die Vergleichbarkeit R für die jeweils ermittelten Analyten aufgelistet:

Probe		2-Phenoxy-ethanol	1-Phenoxy-propan-2-ol	Methyl-paraben	Ethyl-paraben	Propyl-paraben	Butyl-paraben	Benzyl-paraben
Vitamincreme	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	
Vanishingcreme	m	1,196		0,266	0,076			
	r	0,040		0,003	0,002			
	R	0,147		0,022	0,004			
Massagecreme	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