

31996L0045

L 213/8

SLUŽBENI LIST EUROPSKIH ZAJEDNICA

22.8.1996.

SEDMA DIREKTIVA KOMISIJE 96/45/EZ**od 2. srpnja 1996.****o metodama analize potrebnim za provjeru sastava kozmetičkih proizvoda****(Tekst značajan za EGP)**

KOMISIJA EUROPSKIH ZAJEDNICA,

uzimajući u obzir ugovor o osnivanju Europske zajednice,

uzimajući u obzir Direktivu Vijeća 76/768/EEZ od 27. srpnja 1976. o usklađivanju zakonodavstava država članica u odnosu na kozmetičke proizvode ⁽¹⁾, kako je zadnje izmijenjena Direktivom Komisije 95/34/EZ ⁽²⁾, a posebno njezin članak 8. stavak 1.,

budući da Direktiva 76/768/EEZ predviđa službeno testiranje kozmetičkih proizvoda kako bi se osiguralo ispunjavanje uvjeta utvrđenih odredbama Zajednice, koje se odnose na sastav kozmetičkih proizvoda;

budući da se sve potrebne metode analize moraju utvrditi što je prije moguće; budući da su određene metode već bile usvojene Direktivom Komisije 80/1335/EEZ ⁽³⁾, kako je izmijenjena Direktivom 87/143/EEZ ⁽⁴⁾, 82/434/EEZ ⁽⁵⁾, kako je izmijenjena Direktivom 90/207/EEZ ⁽⁶⁾ i direktivama Komisije 83/514/EEZ ⁽⁷⁾, 85/490/EEZ ⁽⁸⁾, 93/73/EEZ ⁽⁹⁾ i 95/32/EZ ⁽¹⁰⁾;

budući da identifikacija i određivanje 2-fenoksietanola, 1-fenoksipropan-2-ola, metil, etil, propil, butil i benzil 4-hidroksibenzoata u kozmetičkim proizvodima predstavlja sedmu mjeru;

budući da su mjere predviđene ovom Direktivom u skladu s mišljenjem Odbora za prilagodbu tehničkom napretku Direktive 76/768/EEZ,

DONIJELA JE OVU ODLUKU:

Članak 1.

Države članice poduzimaju sve potrebne mjere da osiguraju da se tijekom službenog ispitivanja kozmetičkih proizvoda

identifikacija i određivanje 2-fenoksietanola, 1-fenoksipropan-2-ola, metil, etil, propil, butil i benzil 4-hidroksibenzoata provodi u skladu s metodama opisanim u Prilogu.

Članak 2.

1. Države članice donose zakone i druge propise potrebne za usklađivanje s ovom Direktivom najkasnije do 30. rujna 1997. One o tome odmah obavješćuju Komisiju.

2. Kada države članice donose ove odredbe, te odredbe prilikom njihove službene objave sadržavaju uputu na ovu Direktivu ili se uz njih navodi takva uputa. Postupak za takvu uputu određuju države članice.

3. Države članice Komisiji dostavljaju tekst odredaba nacionalnog prava koje donesu u području na koje se odnosi ova Direktiva

Članak 3.

Ova Direktiva stupa na snagu dvadesetog dana od dana objave u *Službenom listu Europskih zajednica*.

Članak 4.

Ova je Direktiva upućena državama članicama.

Sastavljeno u Bruxellesu 2. srpnja 1996.

Za Komisiju

Emma BONINO

Članica Komisije

⁽¹⁾ SL L 262, 27.9.1976., str. 169.

⁽²⁾ SL L 167, 18.7.1995., str. 19.

⁽³⁾ SL L 383, 31.12.1980., str. 27.

⁽⁴⁾ SL L 57, 27.2.1987., str. 56.

⁽⁵⁾ SL L 185, 30.6.1982., str. 1.

⁽⁶⁾ SL L 108, 28.4.1990., str. 92.

⁽⁷⁾ SL L 291, 24.10.1983., str. 9.

⁽⁸⁾ SL L 295, 7.11.1985., str. 30.

⁽⁹⁾ SL L 231, 14.9.1993., str. 34.

⁽¹⁰⁾ SL L 178, 28.7.1995., str. 20.

PRILOG

IDENTIFIKACIJA I ODREĐIVANJE 2-FENOKSIETANOLA, 1-FENOKSIPROPAN-2-OLA, METIL, ETIL, PROPIL, BUTIL I BENZIL 4-HIDROKSIBENZOATA U KOZMETIČKIM PROIZVODIMA**A. IDENTIFIKACIJA****1. Opseg i područje primjene**

Ova metoda potanko opisuje TLC postupak koji, u kombinaciji s metodom određivanja opisanom u odjeljku B, omogućuje identifikaciju 2-fenoksietanola, 1-fenoksiprop-2-ola, metil 4-hidroksibenzoata, etil 4-hidroksibenzoata, propil 4-hidroksibenzoata, butil 4-hidroksibenzoata i benzil 4-hidroksibenzoata u kozmetičkim proizvodima.

2. Načelo

Konzervansi se ekstrahiraju iz zakiseljenog kozmetičkog uzorka acetonom. Nakon filtracije se acetonska otopina pomiješa s vodom i u lužnatom mediju istalože se masne kiseline kao njihove kalcijeve soli. Kako bi se uklonile lipofilne tvari, lužnata smjesa acetona i vode se ekstrahira dietileterom. Nakon zakiseljavanja, konzervansi se ekstrahiraju dietileterom. Alikvot ekstrakta dobivenog ekstrakcijom dietileterom nanese se na tankoslojnu ploču obloženu silikagelom. Kromatogram koji se dobije nakon razvijanja ploče promatra se pod UV svjetlom i učini se vidljivim pomoću Millonova reagensa.

3. Reagensi**3.1. Općenito**

Svi uporabljeni reagensi moraju biti analitičke čistoće. Voda mora biti destilirana ili barem jednake čistoće.

3.2. Aceton**3.3. Dietileter****3.4. n-pentan****3.5. Metanol****3.6. Ledena octena kiselina****3.7. Otopina klorovodične kiseline, $c(\text{HCl}) = 4 \text{ mol/l}$** **3.8. Otopina kalijeva hidroksida, $c(\text{KOH}) = 4 \text{ mol/l}$** **3.9. Kalcijev klorid dihidrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)****3.10. Reagens za detekciju: Millonov reagens**

Millonov reagens (živin(II) nitrat) je otopina pripremljena za uporabu, koja je komercijalno dostupna (Fluka 69820).

3.11. 2-fenoksietanol**3.12. 1-fenoksiprop-2-ol****3.13. Metil 4-hidroksibenzoat (metilparaben)****3.14. Etil 4-hidroksibenzoat (etilparaben)****3.15. n-propil 4-hidroksibenzoat (propilparaben)****3.16. n-butil 4-hidroksibenzoat (butilparaben)****3.17. benzil 4-hidroksibenzoat (benzilparaben)****3.18. Referentne otopine**

Pripreme se 0,1 postotne (m/V) otopine svake od referentnih tvari 3.11., 3.12., 3.13., 3.14., 3.15., 3.16. i 3.17. u metanolu.

3.19. Otapalo za razvijanje

Pomiješa se 88 volumnih dijelova n-pentana (3.4.) s 12 volumnih dijelova ledene octene kiseline (3.6.).

4. Aparatura

Uobičajena laboratorijska oprema i:

- 4.1. Vodena kupelj koja može održavati temperaturu na 60 °C
- 4.2. Posuda za razvijanje (nije obložena filtrirnim papirom)
- 4.3. Izvor ultraljubičastog zračenja, 254 nm
- 4.4. Tankoslojne ploče, 20 cm × 20 cm, prethodno obložene s 0,25 mm silikagelom 60F₂₅₄, s koncentracijskim područjem (Merck br. 11798, Darmstadt, ili ekvivalent)
- 4.5. Peć koja može održavati temperaturu do 105 °C
- 4.6. Sušilo za kosu s vrućim zrakom
- 4.7. Vuneni valjak za bojanje, dugačak oko 10 cm, vanjskog promjera oko 3,5 cm. Debljina vunenog sloja treba biti od 2 do 3 mm. Ako je potrebno, vunu podšišati.
Vidjeti napomenu pod 5.2.
- 4.8. Staklene epruvete od 50 ml s poklopcem na navoj
- 4.9. Električna grijača ploča s termostatom. Temperatura: podešena na oko 80 °C. Kako bi se postigla ravnomjerna raspodjela topline vruća ploča treba biti pokrivena aluminijskom pločom 20 cm × 20 cm, debljine oko 6 mm.

5. Postupak

5.1. Priprema uzorka

U staklenu epruvetu od 50 ml s poklopcem na navoj (4.8.), odvaži se približno 1 g uzorka. Dodaju se četiri kapi otopine klorovodične kiseline (3.7.) i 40 ml acetona.

Za vrlo lužnate kozmetičke proizvode kao što je toaletni sapun, dodaje se 20 kapi otopine klorovodične kiseline. Epruveta se zatvori, smjesa se lagano zagrijava do približno 60 °C kako bi se olakšala ekstrakcija konzervansa u acetonsku fazu i snažno se trese jednu minutu.

Indikatorskim papirom izmjeri se pH otopine, te se pH otopine podesi otopinom klorovodične kiseline na ≤ 3. Ponovno se snažno trese jednu minutu.

Otopina se ohladi na sobnu temperaturu i filtrira kroz filtrirni papir u Erlenmeyerovu tikvicu. U Erlenmeyerovu tikvicu od 200 ml prenese se 20 ml filtrata, doda 60 ml vode i miješa. Uz uporabu indikatorskog papira, pH smjese se podesi natrijevim hidroksidom (3.8.) na približno 10.

Doda se 1 g kalcijeva klorida dihidrata (3.9.) i snažno trese. Otopina se filtrira kroz filtrirni papir u lijevak za odjeljivanje od 250 ml, koji sadrži 75 ml dietiletera i snažno trese jednu minutu. Pusti se da se faze razdvoje, te se vodeni sloj ispusti u Erlenmeyerovu tikvicu od 200 ml. Uporabom indikatorskog papira, pH otopine se podesi otopinom klorovodične kiseline na približno 2. Zatim se doda 10 ml dietiletera i snažno trese jednu minutu. Pusti se da se faze razdvoje, te se približno 2 ml dietileterskog sloja prenese u bočicu za uzorke od 5 ml.

5.2. Tankoslojna kromatografija (TLC)

TLC ploča (4.4.) se stavi na zagrijanu aluminijsku ploču (4.9.). Na polaznu crtu u koncentracijskom području TLC ploče stavi se po 10 µl svake od referentnih otopina (3.18.) i 100 µl otopine uzorka (uzoraka) (5.1.).

Kako bi se olakšalo isparavanje otapala, može se po želji uporabiti struja zraka. TCL ploča se makne s grijaće ploče i pusti da se ohladi na sobnu temperaturu. U posudu za razvijanje (4.2.) prenese se 100 ml otapala za razvijanje (3.19.).

TCL ploča se odmah stavi u nezasićenu komoru i razvija na sobnoj temperaturi sve dok se fronta otapala ne pomakne s osnovne crte za oko 15 cm. Ploča se izvadi iz posude za razvijanje i suši u struji vrućeg zraka pomoću sušila za kosu.

Ploča se pomno pregleda pod UV svjetlom (4.3.) te se označi položaj mrlja. Kako bi se uklonio višak octene kiseline ploča se zagrijava 30 minuta u peći (4.5.) na 100 °C. Konzervansi na kromatogramu se učine vidljivima pomoću Millonovog reagensa (3.10.) tako da se valjak za bojanje (4.7.) uroni u reagens i prevalja preko TLC ploče sve dok ploča ne bude ravnomjerno namočena.

Napomena: Mrlje se mogu učiniti vidljivima i tako da se na svaku od mrlja označenih pod UV svjetlom pažljivo nanese kap Millonova reagensa.

Esteri 4-hidroksibenzojeve kiseline pokazuju se kao crvene mrlje, 2-fenoksietanol i 1-fenoksipropan-2-ol kao žute mrlje. Međutim, treba napomenuti kako će se sama 4-hidroksibenzojeva kiselina, koja može u uzorcima biti prisutna kao konzervans ili produkt razgradnje parabena, također pokazati kao crvena mrlja. Vidjeti 7.3. i 7.4.

6. Identifikacija

Za svaku se mrlju izračuna R_f -vrijednost. Mrlje dobivene otopinom uzorka usporede se s mrljama dobivenim referentnim otopinama i to s obzirom na njihove R_f -vrijednosti, njihovo ponašanje pod utjecajem UV zračenja i s obzirom na boju nakon što se učine vidljivima. Izvuku se preliminarni zaključci o identitetu konzervansa.

Ako su prisutni parabeni provodi se HPLC postupak opisan u odjeljku B. Kako bi se potvrdila prisutnost 2-fenoksietanola, 1-fenoksiprop-2-ola i parabena kombiniraju se rezultati dobiveni TLC-om i tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC).

7. Napomene

- 7.1. Kako je Millonov reagens otrovan najbolje ga je primijeniti na jedan od opisanih načina. Prskanje se ne preporučuje.
- 7.2. Ostali spojevi koji sadrže hidroksilne skupine također mogu dati obojenje s Millonovim reagensom. Tablica s bojama i R_f -vrijednostima dobivenim za brojne konzervanse pomoću tog TLC postupka može se naći u: N. de Kruijf, M. A. H. Rijk, L. A. Pranato-Soetardhi i 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. R_f -vrijednosti nabrojene u sljedećoj tablici služe kao pokazatelj vrijednosti koje se mogu dobiti:

Spoj	hR_f	Boja
4-hidroksibenzojeva kiselina	11	crvena
metilparaben	12	crvena
etilparaben	17	crvena
propilparaben	21	crvena
butilparaben	26	crvena
benzilparaben	16	crvena
2-fenoksietanol	29	žuta
1-fenoksiprop-2-ol	50	žuta

- 7.4. Za 4-hidroksibenzojevu kiselinu i metilparaben, ili za benzilparaben i etilparaben nije dobiveno razdvajanje. Identifikaciju tih spojeva potrebno je potvrditi primjenom HPLC metode opisane u odjeljku B i usporedbom retencijskih vremena uzorka s retencijskim vremenima standarda.

B. ODREĐIVANJE

1. Svrha i područje primjene

Ova metoda potanko opisuje postupak za određivanje 2-fenoksietanola, 1-fenoksiprop-2-ola, metil 4-hidroksibenzoata, etil 4-hidroksibenzoata, propil 4-hidroksibenzoata, butil 4-hidroksibenzoata i benzil 4-hidroksibenzoata u kozmetičkim proizvodima.

2. Definicija

Količine konzervansa određene ovom metodom iskazuju se kao maseni udjeli.

3. Načelo

Uzorak se zakiselji dodatkom sumporne kiseline i zatim suspendira u smjesi etanola i vode. Kako bi se rastalila lipidna faza i time pospješila kvantitativna ekstrakcija, smjesa se najprije pažljivo zagrijava, a zatim filtrira.

Konzervansi u filtratu se određuju HPLC-om s reverznom fazom, uz izopropil 4-hidroksibenzoat kao unutarnji standard.

4. Reagensi

4.1. Općenito

Svi reagensi moraju biti analitičke čistoće i tamo gdje je to potrebno, prikladni za HPLC. Voda mora biti destilirana, ili barem jednake čistoće.

4.2. Apsolutni etanol

4.3. 2-fenoksietanol

4.4. 1-fenoksiprop-2-ol

- 4.5. Metil 4-hidroksibenzoat (metilparaben)
- 4.6. Etil 4-hidroksibenzoat (etilparaben)
- 4.7. n-propil 4-hidroksibenzoat (propilparaben)
- 4.8. Izopropil 4-hidroksibenzoat (izopropilparaben)
- 4.9. n-butil 4-hidroksibenzoat (butilparaben)
- 4.10. Benzil 4-hidroksibenzoat (benzilparaben)
- 4.11. Tetrahidrofuran
- 4.12. Metanol
- 4.13. Acetonitril
- 4.14. Otopina sumporne kiseline, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 2 \text{ mol/l}$
- 4.15. Smjesa etanola i vode
Pomiješa se devet volumnih dijelova etanola (4.2.) i jedan volumni dio vode.
- 4.16. Otopina unutarnjeg standarda
Točno se odvaži oko 0,25 g izopropilparabena (4.8.), prenese u odmjernu tikvicu od 500 ml, otopi i nadopuni do oznake smjesom etanola i vode (4.15.).
- 4.17. Pokretna faza: smjesa tetrahidrofurana, vode, metanola i acetonitrila
Pomiješa se 5 volumnih dijelova tetrahidrofurana, 60 volumnih dijelova vode, 10 volumnih dijelova metanola i 25 volumnih dijelova acetonitrila.
- 4.18. Ishodišna otopina konzervansa
U odmjernu tikvicu od 100 ml točno se odvaži oko 0,2 g 2-fenoksietanola, 0,2 g 1-fenoksipropan-2-ola, 0,05 g metilparabena, 0,05 g etilparabena, 0,05 g propilparabena, 0,05 g butilparabena i 0,025 g benzilparabena, otopi se i nadopuni do oznake smjesom etanola i vode.
Ako se drži u hladnjaku otopina je stabilna tjedan dana.
- 4.19. Standardne otopine konzervansa
U odmjerne tikvice od 50 ml stavi se redom 20,00 ml, 10,00 ml, 5,00 ml, 2,00 ml i 1,00 ml ishodišne otopine (4.18.). U svaku tikvicu doda se 10,00 ml otopine unutarnjeg standarda (4.16.) i 1,0 ml otopine sumporne kiseline (4.14.), te nadopuni do oznake smjesom etanola i vode. Te otopine moraju biti svježe pripremljene.
5. **Aparatura**
Uobičajena laboratorijska oprema, i:
- 5.1. Vodena kupelj koja može održavati temperaturu na $60^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$
- 5.2. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti s UV detektorom, valne duljine 280 nm
- 5.3. Analitička kolona:
Nehrđajući čelik, unutarnje dimenzije $25 \text{ cm} \times 4,6 \text{ mm}$ (ili unutarnje dimenzije $12,5 \text{ cm} \times 4,6 \text{ mm}$) punjene Nucleosil 5C18, ili ekvivalentom (vidjeti 10.1.)
- 5.4. Staklene epruvete od 100 ml s poklopcem na navoj
- 5.5. Kamenčići za vrenje, karborund, veličine od 2 do 4 mm, ili ekvivalent
6. **Postupak**
- 6.1. Priprema uzorka
- 6.1.1. Priprema uzorka bez dodatka unutarnjeg standarda
U staklenu epruvetu od 100 ml, s poklopcem na navoj, odvaži se oko 1,0 g uzorka. U epruvetu se otpipetira 1,0 ml otopine sumporne kiseline (4.14.) i 50,0 ml smjese etanola i vode (4.15.). Doda se oko 1 g kamenčića za vrenje (5.5.), epruveta se zatvori i snažno trese sve dok se ne dobije homogena suspenzija. Trese se najmanje jednu minutu. Kako bi se olakšala ekstrakcija konzervansa u etanolnu fazu, epruveta se stavi na pet minuta u vodenu kupelj (5.1.) temperature $60^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.
Epruveta se odmah ohladi pod mlazom hladne vode, a ekstrakt se na jedan sat pohrani u hladnjak. Ekstrakt se filtrira preko filtrirnog papira. Oko 2 ml filtrata se prenese u bočicu za uzorke od 5 ml. Ekstrakti se pohrane u hladnjak i unutar 24 sata provede se određivanje HPLC-om.

6.1.2. Priprema uzorka koja uključuje dodatak unutarnjeg standarda

U staklenu epruvetu od 100 ml, s poklopcem na navoj, odvaži se s točnošću na tri decimale $1,0 \pm 0,1$ g uzorka.

U epruvetu se otpipetira 1,0 ml otopine sumporne kiseline i 40,0 ml smjese etanola i vode. Doda se oko 1 g kamenčića za vrenje (5.5.) i točno 10,00 ml otopine unutarnjeg standarda. Epruveta se zatvori i snažno trese sve dok se ne dobije homogena suspenzija. Trese se najmanje jednu minutu. Kako bi se olakšala ekstrakcija konzervansa u etanolnu fazu, epruveta se stavi na pet minuta u vodenu kupelj temperature $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Epruveta se odmah ohladi pod mlazom hladne vodovodne vode, a ekstrakt se na jedan sat pohrani u hladnjak. Ekstrakt se filtrira preko filtrirnog papira.

Oko 2 ml filtrata se prenese u bočicu za uzorke od 5 ml (otopina koja se ispituje). Ekstrakti se pohrane u hladnjak i unutar 24 sata provede se određivanje HPLC-om.

6.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

6.2.1. Uvjeti kromatografiranja

- Pokretna faza: smjesa tetrahidrofurana, vode, metanola i acetonitrila (4.17.)
- Brzina protoka: 1,5 ml/minuta
- Valna duljina detekcije: 280 nm

6.2.2. Kalibracija

Injektira se po 10 μ l svake od standardnih otopina konzervansa (4.19.). Iz dobivenih kromatograma odrede se omjeri visine vrhova standardnih otopina konzervansa prema visini vrha unutarnjeg standarda. Za svaki konzervans nacrti se krivulja koja prikazuje ovisnost tih omjera o koncentracijama standardnih otopina.

6.2.3. Određivanje

U kromatograf se injektira 10 μ l otopine uzorka bez unutarnjeg standarda (6.1.1.) i snimi se kromatogram.

Injektira se 10 μ l jedne od standardnih otopina konzervansa (4.19.) i snimi se kromatogram. Dobiveni kromatogrami se usporede.

Ako na kromatogramu ekstrakta uzorka (6.1.1.) nema vrha s retencijskim vremenom približno jednakim retencijskom vremenu izopropilparabena (preporučeni unutarnji standard), postupak se nastavlja injektiranjem 10 μ l otopine uzorka s unutarnjim standardom (6.1.2.). Snimi se kromatogram i izmjere visine vrhova.

Ako se na kromatogramu otopine uzorka opaža interferirajući vrh s retencijskim vremenom približno jednakim retencijskom vremenu izopropilparabena, potrebno je odabrati drugi unutarnji standard.

Ako na kromatogramu uzorka nema jednog od konzervansa koji se ispituju, taj konzervans se može uporabiti kao alternativni unutarnji standard.

Izračunaju se omjeri visine vrhova ispitivanih konzervansa prema visini vrha unutarnjeg standarda.

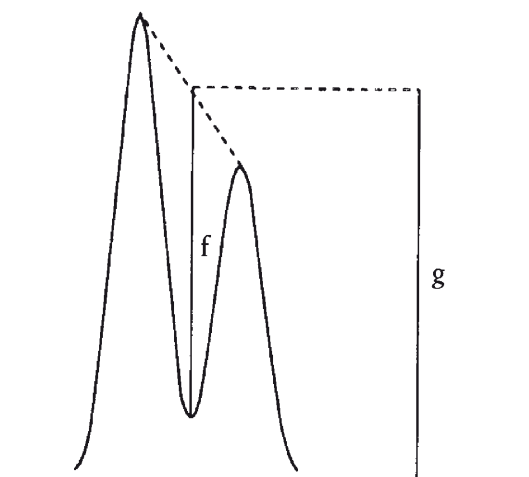
Provjeri se je li za standardne otopine koje su se uporabile za kalibraciju dobiven linearni odziv.

Provjeri se zadovoljavaju li kromatogrami dobiveni za standardnu otopinu i otopinu uzorka sljedeće uvjete:

- razdvajanje vrhova za najlošije razdvojeni par treba biti barem 0,90. (Za definiciju razdvajanja vrhova vidjeti sliku 1.).

razdvajanje vrhova (p)

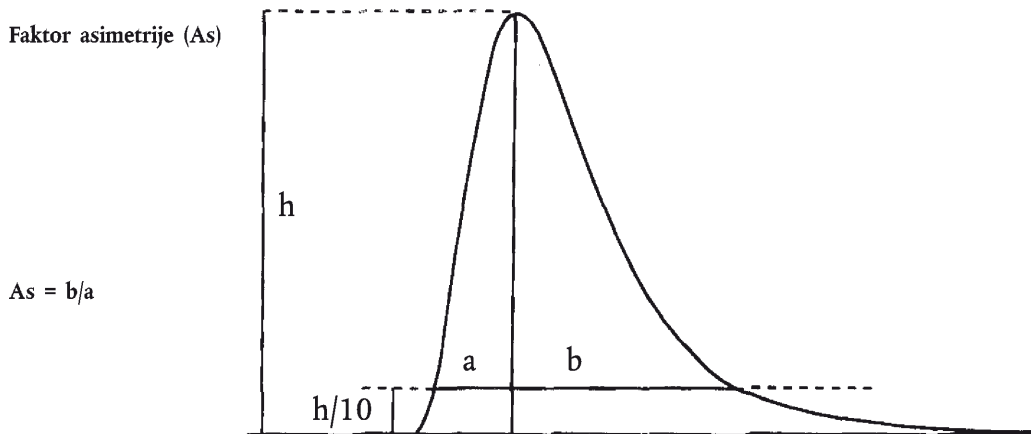
$$p = f/g$$



Slika 1.: Razdvajanje vrhova

Ako se zahtijevano razdvajanje nije postiglo, potrebno je ili uporabiti učinkovitiju kolonu ili se sastav pokretne faze treba podešavati sve dok nije zadovoljen gornji uvjet.

- faktor asimetrije A_s svih dobivenih vrhova treba biti između 0,9 i 1,5. (Za definiciju faktora simetrije vidjeti sliku 2.). Kako bi se snimio kromatogram za određivanje faktora asimetrije, preporuča se brzina kretanja dijagrama najmanje 2 cm/minuti.



Slika 2. Faktor asimetrije vrha

- Dobije se jednolika osnovna crta.

7. Izračun

Konzentracija konzervansa u otopini uzorka izračuna se pomoću kalibracijske krivulje (6.2.2.) i omjera visine vrhova ispitivanih konzervansa prema visini vrha unutarnjeg standarda. Sadržaj 2-fenoksietanola, 1-fenoksi-propan-2-ola, metil 4-hidroksibenzoata, etil 4-hidroksibenzoata, propil-hidroksibenzoata, butil 4-hidroksibenzoata i benzil 4-hidroksibenzoata, w_i , izračuna se kao maseni udio (% m/m) pomoću formule:

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

gdje je:

b_i = koncentracija ($\mu\text{g/ml}$) konzervansa u ispitivanoj otopini očitana iz kalibracijske krivulje; i

a = masa u (g) ispitivanog dijela.

8. Ponovljivost ⁽¹⁾

Vidjeti napomene, 10.5.

9. Obnovljivost ⁽¹⁾

Vidjeti napomene, 10.5.

10. Napomene

10.1. Nepokretna faza

Retencijsko ponašanje otapala tijekom HPLC određivanja vrlo ovisi o vrsti, trgovačkoj marki i povijesti nepokretne faze. O prikladnosti kolone za razdvajanje ispitivanih konzervansa može se zaključiti iz rezultata dobivenih za standardne otopine (vidjeti napomene 6.2.3.). Uz predložene materijale za punjenje kolone, utvrđeno je da su prikladni i Hypersil ODS i Zorbax ODS.

Kako bi se dobilo traženo razdvajanje, alternativno se može optimizirati preporučena pokretna faza.

10.2. Valna duljina detekcije

Grubo ispitivanje opisane metode je pokazalo da male promjene valne duljine detekcije mogu znatno utjecati na rezultate određivanja.

Zato se tijekom analize taj parametar mora pažljivo nadzirati.

⁽¹⁾ ISO 5725

10.3. Interferenti

Pod uvjetima opisanim u ovoj metodi mogu se eluirati i mnogi drugi spojevi, kao što su konzervansi i kozmetički dodaci. Retencijska vremena velikog broja konzervansa, koji se spominju u Prilogu VI. Direktivi Vijeća koja se odnosi na kozmetičke proizvode, nabrojeni su u: N. de Kruijf, M. A. H. Rijk, L. A. Pranato-Soetardhi i A. Schouten, (1989.): Determination of preservatives in cosmetic products II. High-performance liquid chromatographic identification (*J. Chromatography* 469, 317-398).

10.4. Kako bi se projektirala analitička kolona može se uporabiti prikladna zaštitna kolona.

10.5. Ova metoda je bila ispitana u zajedničkom pokusu u kojem je sudjelovalo devet laboratorija. Analizirana su tri uzorka. Za svaki od tri uzorka sljedeća tablica pokazuje srednje vrijednosti masenih udjela u % m/m (m), ponovljivostima (r), obnovljivostima (R) koje su dobivene za analite koje su sadržavali:

Uzorak		2-fenoksi etanol	1-fenoksi propan-2-ol	Metilparaben	Etilparaben	Propilparaben	Butilparaben	Benzilparaben
Vitaminska krema	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	
Krema za čišćenje	m	1,196		0,266	0,076			
	r	0,040		0,003	0,022			
	R	0,147		0,002	0,004			
Krema za masažu	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