

**SETTIMA DIRETTIVA 96/45/CE DELLA COMMISSIONE**  
**del 2 luglio 1996**  
**relativa ai metodi di analisi necessari alla verifica della composizione dei**  
**prodotti cosmetici**

(Testo rilevante ai fini del SEE)

LA COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE,  
visto il trattato che istituisce la Comunità europea,  
vista la direttiva 76/768/CEE del Consiglio, del 27 luglio 1976, sul ravvicinamento della legislazione degli Stati membri relativa ai prodotti cosmetici <sup>(1)</sup>, modificata da ultimo dalla direttiva 95/34/CE della Commissione <sup>(2)</sup>, ed in particolare l'articolo 8, paragrafo 1,

considerando che la direttiva 76/768/CEE prevede una verifica ufficiale dei prodotti cosmetici nell'intento di garantire che vengano soddisfatte le condizioni stabilite dalle disposizioni comunitarie relative alla composizione dei prodotti cosmetici;

considerando che occorre stabilire quanto prima tutti i necessari metodi di analisi; considerando che taluni metodi sono già stati adottati dalle direttive 80/1335/CEE della Commissione <sup>(3)</sup>, modificata dalla direttiva 87/143/CEE <sup>(4)</sup>, dalla direttiva 82/434/CEE della Commissione <sup>(5)</sup>, modificata dalla direttiva 90/207/CEE <sup>(6)</sup> e dalle direttive della Commissione 83/514/CEE <sup>(7)</sup>, 85/490/CEE <sup>(8)</sup>, 93/73/CEE <sup>(9)</sup> e 95/32/CE <sup>(10)</sup>;

considerando che l'identificazione e la determinazione del 2-fenossietanolo, 1-fenossipropan-2-olo, metile, etile, propile, butile e benzile 4-idrossibenzoato nei prodotti cosmetici costituiscono un settimo passo;

considerando che i provvedimenti previsti dalla presente direttiva concordano con il parere del comitato sull'adattamento della direttiva 76/768/CEE al progresso tecnico,

HA ADOTTATO LA PRESENTE DIRETTIVA:

*Articolo 1*

Gli Stati membri devono intraprendere tutti i passi necessari per far sì che in sede di verifica ufficiale dei prodotti cosmetici, l'identificazione e la determinazione del 2-

fenossietanolo, 1-fenossipropan-2-olo, metile, etile, propile, butile e benzile 4-idrossibenzoato vengano effettuate secondo il metodo descritto in allegato.

*Articolo 2*

1. Gli Stati membri applicano le leggi, i regolamenti e le disposizioni amministrative necessari per conformarsi alla direttiva entro e non oltre il 30 settembre 1997. Essi ne informano immediatamente la Commissione.

2. Quando gli Stati membri adottano tali disposizioni, queste ultime devono contenere un riferimento alla direttiva o essere corredate di tale riferimento all'atto della loro pubblicazione ufficiale. La procedura relativa a tale riferimento è adottata dagli Stati membri.

3. Gli Stati membri comunicano alla Commissione le disposizioni da essi adottate nel campo di applicazione della direttiva.

*Articolo 3*

La presente direttiva entra in vigore il ventesimo giorno dopo la sua pubblicazione nella *Gazzetta ufficiale delle Comunità europee*.

*Articolo 4*

La presente direttiva è destinata agli Stati membri.

Fatto a Bruxelles, il 2 luglio 1996.

*Per la Commissione*

Emma BONINO

*Membro della Commissione*

<sup>(1)</sup> GU n. L 262 del 27. 9. 1976, pag. 169.

<sup>(2)</sup> GU n. L 167 del 18. 7. 1995, pag. 19.

<sup>(3)</sup> GU n. L 383 del 31. 12. 1980, pag. 27.

<sup>(4)</sup> GU n. L 57 del 27. 2. 1987, pag. 56.

<sup>(5)</sup> GU n. L 185 del 30. 6. 1982, pag. 1.

<sup>(6)</sup> GU n. L 108 del 28. 4. 1990, pag. 92.

<sup>(7)</sup> GU n. L 291 del 24. 10. 1983, pag. 9.

<sup>(8)</sup> GU n. L 295 del 7. 11. 1985, pag. 30.

<sup>(9)</sup> GU n. L 231 del 14. 9. 1993, pag. 34.

<sup>(10)</sup> GU n. L 178 del 28. 7. 1995, pag. 20.

## ALLEGATO

**IDENTIFICAZIONE E DETERMINAZIONE DEL 2-FENOSSIETANOLO, 1-FENOSSIPROPAN-2-OLO, METILE, ETILE, PROPILE, BUTILE E BENZILE 4-IDROSSIBENZOATO NEI PRODOTTI COSMETICI**

## A. IDENTIFICAZIONE

1. **Oggetto e campo di applicazione**

Il metodo presenta una procedura di cromatografia a strato sottile (TLC) che, in combinazione con il metodo di determinazione descritto nella parte B di questo documento, consente l'identificazione delle seguenti sostanze: 2-fenossietanolo, 1-fenossipropan-2-olo, metile 4-idrossibenzoato, etile 4-idrossibenzoato, propile 4-idrossibenzoato, butile 4-idrossibenzoato e benzile 4-idrossibenzoato nei prodotti cosmetici.

2. **Principio**

I conservanti sono estratti dal campione di prodotto cosmetico acidificato con acetone. Dopo filtraggio, la soluzione di acetone è diluita in acqua e gli acidi grassi sono fatti precipitare in un mezzo alcalino, sotto forma dei loro sali di calcio. La miscela alcalina acetone/acqua è estratta con dietilere per asportare le sostanze lipofile. Dopo acidificazione, i conservanti sono estratti con dietilere e una parte della soluzione così ottenuta è depositata su una lastra per cromatografia rivestita di gel di silice. Dopo aver sviluppato la lastra, il cromatogramma ottenuto è osservato alla luce UV ed è visualizzato mediante il reagente di Millon.

3. **Reagenti**3.1. **Aspetti generali.**

Tutti i reagenti impiegati devono essere della purezza richiesta per analisi. Si dovrà impiegare acqua distillata, oppure acqua di purezza almeno equivalente.

## 3.2. Acetone.

## 3.3. Dietilere.

## 3.4. n-Pentano.

## 3.5. Metanolo.

## 3.6. Acido acetico glaciale.

3.7. Soluzione di acido cloridrico,  $c(\text{HCl})=4\text{mol/l}$ .3.8. Soluzione di idrossido di potassio,  $c(\text{KOH})=4\text{mol/l}$ .3.9. Cloruro di calcio di idrato ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ).

## 3.10. Reagente di rilevamento: reagente di Millon

Il reagente di Millon (nitrato di mercurio II) è una soluzione pronta all'uso, disponibile in commercio (Fluka 69820).

## 3.11. 2-Fenossietanolo.

## 3.12. 1-Fenossipropan-2-olo.

## 3.13. Metile 4-Idrossibenzoato (metilparaben).

## 3.14. Etile 4-Idrossibenzoato (etilparaben).

## 3.15. n-Propile 4-Idrossibenzoato (propilparaben).

## 3.16. n-Butile 4-Idrossibenzoato (butilparaben).

## 3.17. Benzile 4-Idrossibenzoato (benzilparaben).

## 3.18. Soluzioni di riferimento

Preparare soluzioni allo 0,1 % (m/V) in metanolo di ciascuna delle sostanze di riferimento di cui ai punti: 3.11, 3.12, 3.13, 3.14, 3.15, 3.16 e 3.17.

## 3.19. Solvente di sviluppo

Mescolare 88 volumi di n-pentano con 12 volumi di acido acetico glaciale.

#### 4. Apparecchiature

Attrezzature per impiego normale in laboratorio e

- 4.1. Bagno (ad acqua) in grado di mantenere una temperatura di 60 °C.
- 4.2. Vaschetta di sviluppo (non rivestita di carta da filtro).
- 4.3. Sorgente di luce ultravioletta, 254 nm.
- 4.4. Lastre a strato sottile 20 cm × 20 cm, prerivestite con gel di silice dello spessore di 0,25 mm del tipo 60 F<sub>254</sub>, con zona di concentrazione (Merck, n. 11798, Darmstadt, o equivalenti).
- 4.5. Forno in grado di mantenere temperature fino a 105 °C.
- 4.6. Asciugacapelli ad aria calda.
- 4.7. Rullo da pittura in lana della lunghezza di circa 10 cm e con diametro esterno di circa 3,5 cm. Lo spessore della lana dovrà essere pari a 2-3 mm. Ridurre lo spessore originario di lana, se necessario.  
(Cfr. la nota al punto 5.2).
- 4.8. Provette in vetro da 50 ml con tappo a vite.
- 4.9. Piastra elettrica con regolatore termostatico della temperatura.

Regolare la temperatura a circa 80 °C. Porre sulla piastra elettrica una piastra di alluminio da 20 cm × 20 cm e dello spessore di circa 6 mm per ottenere una distribuzione uniforme del calore.

#### 5. Procedura

##### 5.1. Preparazione del campione

Pesare circa 1 g di campione in una provetta in vetro da 50 ml con tappo a vite. Aggiungere 4 gocce della soluzione di acido cloridrico (3.7) e 40 ml di acetone.

Se si tratta di prodotti cosmetici fortemente basici, quali i saponi da toilette, aggiungere 20 gocce di soluzione di acido cloridrico. Chiudere la provetta, riscaldare gradatamente la miscela fino a portarla a circa 60 °C per facilitare l'estrazione dei conservanti nella fase contenente acetone e agitare vigorosamente per un minuto.

Misurare il pH della soluzione con una cartina di tornasole e aggiustare il pH della soluzione a < = 3, con la soluzione di acido cloridrico. Agitare di nuovo, vigorosamente per un minuto.

Lasciare che la soluzione si raffreddi a temperatura ambiente e filtrarla su filtro di carta in una beuta conica. Trasferire 20 ml del filtrato in una beuta conica da 200 ml, aggiungere 60 ml di acqua e mescolare. Aggiustare il pH della miscela a circa 10, con la soluzione di idrossido di potassio (3.8), servendo sempre della cartina di tornasole.

Aggiungere 1g di cloruro di calcio diidrato (3.9) e agitare vigorosamente. Filtrare la soluzione su filtro di carta in un imbuto separatore da 250 ml, contenente 75 ml di dietiletere e agitare vigorosamente per un minuto. Lasciare che le fasi si separino e raccogliere lo strato acquoso in una beuta conica da 200 ml.

Aggiustare il pH della soluzione a circa 2, con la soluzione di acido cloridrico, usando la cartina di tornasole. In seguito, aggiungere 10 ml di dietiletere e agitare vigorosamente per un minuto. Lasciare che le fasi si separino e trasferire circa 2 ml della fase contenente dietiletere in una provetta da 5 ml.

##### 5.2. Cromatografia su strato sottile

Porre la piastra per TLC (4.4) sulla piastra di alluminio riscaldata (4.9). Depositare 100 µl di ciascuna delle soluzioni di riferimento (3.18) e 100 µl della/delle soluzione/i (5.1) sulla linea di partenza nella zona di concentrazione della piastra per TLC. Se lo si ritiene opportuno, si può impiegare una corrente d'aria per facilitare l'evaporazione del solvente. Togliere la piastra per TLC dalla piastra riscaldante e lasciarla raffreddare a temperatura ambiente. Trasferire 100 ml del solvente di sviluppo (3.19) in una vaschetta per sviluppo (4.2).

Porre la piastra TLC immediatamente nella camera insatura e sviluppare a temperatura ambiente fino a quando il fronte del solvente si è spostato di circa 15 cm dalla linea di partenza. Togliere la piastra dalla vaschetta di sviluppo e asciugare sotto corrente d'aria calda, servendosi di un asciugacapelli.

Esaminare la lastra sotto luce UV (4.3) e segnare la posizione delle macchie. Riscaldare la piastra per 30 minuti in forno (4.5) a 100 °C per rimuovere l'acido acetico in eccesso. Visualizzare i conservanti nel cromatogramma con il reagente di Millon (3.10), intingendo il rullo da pittura (4.7) nel reagente e facendolo scorrere sulla piastra TLC fino a che essa sia bagnata in modo uniforme.

*Nota:* Alternativamente, le macchie possono essere visualizzate applicando con attenzione una goccia di reagente di Millon su ciascuna delle macchie rilevate sotto luce UV.

Gli esteri dell'acido 4-idrossibenzoico si evidenziano come macchie rosse, quelli del 2-fenossietanolo e del 1-fenossipropan-2-olo come macchie gialle. Si noti, però, che anche l'acido 4-idrossibenzoico, che può essere presente nei campioni sia come conservante che come prodotto di decomposizione dei parabeni, potrà apparire anch'esso sotto forma di macchia rossa. (Cfr. 7.3 e 7.4).

## 6. Identificazione

Calcolare il valore  $R_f$  per ciascuna macchia. Paragonare le macchie ottenute dalla soluzione campione con quelle delle soluzioni di riferimento, rispetto ai loro valori di  $R_f$ , al loro comportamento sotto luce UV e al loro colore dopo visualizzazione. Trarre conclusioni preliminari riguardo all'identità dei conservanti.

Se si rileva la presenza di parabeni, si dovrà porre in atto la procedura di HPLC descritta nella parte B. Combinare i risultati ottenuti con TLC e HPLC per confermare la presenza del 2-fenossietanolo, del 1-fenossipropan-2-olo e dei parabeni.

## 7. Osservazioni

- 7.1. Data la tossicità del reagente di Millon, è opportuno applicarlo secondo uno dei metodi sopra descritti. È invece da evitare di applicarlo a spruzzo.
- 7.2. Anche altri composti contenenti gruppi idrossilici possono combinarsi con il reagente di Millon e formare chiazze colorate. Una tabella di colori e di valori  $R_f$  ottenuti per vari conservanti seguendo questa procedura di TLC sono presentati in: N. de Kruijf, M.A.H. Rijk, L.A. Pranato-Soetardhi e 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. I valori di  $R_f$  elencati nella tabella seguente servono come indicazione di quelli che possono essere ottenuti:

Composto	$hR_f$	Colore
Acido 4-idrossibenzoico	11	rosso
metilparaben	12	rosso
etilparaben	17	rosso
propilparaben	21	rosso
butilparaben	26	rosso
benzilparaben	16	rosso
2-fenossietanolo	29	giallo
1-fenossipropan-2-olo	50	giallo

- 7.4. Non si ottiene alcuna separazione per l'acido 4-idrossibenzoico, il metilparaben, il benzilparaben e l'etilparaben. L'identificazione di questi composti deve essere confermata eseguendo l'indagine con il metodo di cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) descritto nella parte B e paragonando i tempi di ritenzione ottenuti dal campione con quelli standard.

## B. DETERMINAZIONE

### 1. Oggetto e campo di applicazione

Questo metodo ha per oggetto una procedura per la determinazione di: 2-fenossietanolo, 1-fenossipropan-2-olo, metile 4-idrossibenzoato, etile 4-idrossibenzoato, propile 4-idrossibenzoato, butile 4-idrossibenzoato e benzile 4-idrossibenzoato nei prodotti cosmetici.

### 2. Definizione

Le quantità di conservanti determinate con questo metodo sono espresse come percentuale rispetto alla massa.

### 3. Principio

Il campione è acidificato mediante aggiunta di acido solforico ed è successivamente sospeso in una miscela di etanolo ed acqua. Dopo aver riscaldato gradatamente la miscela fino ad ottenere la dissoluzione della fase lipidica per facilitarne l'estrazione, si procede al filtraggio della miscela stessa.

I conservanti nel filtrato sono determinati mediante HPLC in fase inversa, con l'impiego di isopropile 4-idrossibenzoato come standard interno.

### 4. Reagenti

#### 4.1. Generalità

Tutti i reagenti devono avere il grado di purezza richiesto per analisi e devono essere adatti alla HPLC, se del caso. Si dovrà impiegare acqua distillata, oppure acqua di purezza almeno equivalente.

#### 4.2. Etanolo assoluto.

#### 4.3. 2-Fenossietanolo.

#### 4.4. 1-Fenossipropan-2-olo.

- 4.5. Metile 4-idrossibenzoato (metilparaben).
- 4.6. Etile 4-idrossibenzoato (etilparaben).
- 4.7. n-Propile 4-idrossibenzoato (propilparaben).
- 4.8. Isopropile 4-idrossibenzoato (isopropilparaben).
- 4.9. n-Butile 4-idrossibenzoato (butilparaben).
- 4.10. Benzile 4-idrossibenzoato (benzilparaben).
- 4.11. Tetraidrofurano.
- 4.12. Metanolo.
- 4.13. Acetonitrile.
- 4.14. Soluzione di acido solforico,  $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 2\text{mol/l}$
- 4.15. Miscela etanolo/acqua  
Mescolare 9 volumi di etanolo (4.2) e 1 volume di acqua.
- 4.16. Soluzione standard interno  
Pesare accuratamente circa 0,25 g di isopropilparaben (4.8), trasferirlo in un matraccio da 500 ml, sciogliere e completare a volume con la miscela etanolo/acqua (4.15).
- 4.17. Fase mobile: miscela tetraidrofurano/acqua/metanolo/acetonitrile  
Mescolare 5 volumi di tetraidrofurano, 60 volumi d'acqua, 10 volumi di metanolo e 25 volumi di acetonitrile.
- 4.18. Soluzione di riferimento dei conservanti  
Pesare con cura circa 0,2 g di 2-fenossietanolo, 0,2 g di 1-fenossipropan-2-olo, 0,05 g di metilparaben, 0,05 g di etilparaben, 0,05 g di propilparaben, 0,05 g di butilparaben e 0,025 g di benzilparaben in una beuta da 100 ml, sciogliere e completare a volume con la miscela etanolo/acqua.  
La soluzione è stabile per una settimana se conservata in frigorifero.
- 4.19. Soluzioni standard di conservanti  
Dalla soluzione di riferimento (4.18) trasferire rispettivamente 20,00 ml, 10,00 ml, 5,00 ml, 2,00 ml e 1,00 ml in provette graduate da 50 ml. Aggiungere a ciascuna di esse 10,00 ml di soluzione standard interno (4.16) e 1,0 ml di soluzione di acido solforico (4.14), indi completare a volume con la miscela etanolo/acqua. Queste soluzioni devono essere preparate al momento.
5. **Apparecchiature**  
Attrezzature per uso normale di laboratorio.
  - 5.1. Bagno (ad acqua) in grado di mantenere una temperatura di  $60^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ .
  - 5.2. Apparecchio per cromatografia liquida ad alte prestazioni con rilevatore a luce UV, fissato alla lunghezza d'onda di 280 nm.
  - 5.3. Colonna per analisi:  
Acciaio inossidabile 25 cm  $\times$  4,6 mm d. i. (o 12,5 cm  $\times$  4,6 mm d. i.) riempita di Nucleosil 5C18, o equivalente (cfr. 10.1).
  - 5.4. Provette in vetro da 100 ml, con tappo a vite.
  - 5.5. Granuli ebullioscopici in carborundum, dimensione 2-4 mm, o equivalenti.
6. **Procedura**
  - 6.1. Preparazioni dei campioni
    - 6.1.1. Preparazione dei campioni senza aggiunta dello standard interno  
Pesare circa 1,0 g di campione in una provetta da 100 ml con tappo a vite. Pipettare 1,0 ml di soluzione di acido solforico (4.14) e 50,0 ml di miscela etanolo/acqua (4.15) nelle provette. Aggiungere circa 1 g di granuli ebullioscopici (5.5), tappare la provetta e agitare vigorosamente fino ad ottenere una sospensione omogenea.  
Agitare per almeno un minuto. Porre la provetta per cinque minuti in bagno d'acqua calda (5.1) mantenuto a  $60^\circ\text{C} + 1^\circ\text{C}$  per facilitare l'estrazione dei conservanti nella fase etanolica.  
Raffreddare immediatamente la provetta sotto acqua fredda e riporre l'estratto in frigorifero per un'ora. Filtrare l'estratto su filtro in carta. Trasferire circa 2 ml di filtrato in una provetta da 5 ml. Conservare gli estratti in frigorifero ed eseguire la determinazione mediante HPLC entro 24 ore.

### 6.1.2. Preparazione del campione compresa aggiunta dello standard interno

Pesare alla terza cifra decimale  $1,0 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$  di campione (a grammi) in una provetta in vetro da 100 ml, con tappo a vite.

Pipettare 1,0 ml di soluzione di acido solforico e 40,0 ml di miscela etanolo/acqua nella provetta. Aggiungere circa 1 g di granuli ebullioscopici ed esattamente 10,00 ml di soluzione standard interno. Tappare la provetta e agitare vigorosamente fino ad ottenere una sospensione omogenea.

Agitare per almeno un minuto. Porre la provetta per cinque minuti in bagno d'acqua mantenuta a  $60 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  per facilitare l'estrazione dei conservanti nella fase etanolica.

Raffreddare immediatamente la provetta sotto acqua fredda e riporre l'estratto in frigorifero per un'ora. Filtrare l'estratto servendosi di un filtro in carta.

Trasferire circa 2 ml del filtrato in una provetta da 5 ml (soluzione test). Riporre l'estratto in frigorifero ed eseguire le determinazioni mediante HPLC entro 24 ore.

### 6.2. Cromatografia liquida ad alte prestazioni.

#### 6.2.1. Condizioni per la cromatografia

- Fase mobile: miscela tetraidrofurano/acqua/metanolo/acetoneitrile (4.17)
- Flusso: 1,5 ml/minuto
- Lunghezza d'onda di rilevamento: 280 nm.

#### 6.2.2. Taratura

Iniettare 10  $\mu\text{l}$  di ciascuna delle soluzioni standard di conservanti (4.19). In base ai cromatogrammi ottenuti determinare i rapporti fra le altezze dei picchi delle soluzioni di conservanti sotto indagine e l'altezza del picco della soluzione standard di riferimento interno. Tracciare, per ciascun conservante, un grafico che esprima questi rapporti con le concentrazioni delle soluzioni standard.

#### 6.2.3. Determinazione

Iniettare 10  $\mu\text{l}$  della soluzione campione senza standard interno (6.1.1) nel cromatografo e registrare il cromatogramma.

Iniettare 10  $\mu\text{l}$  di una delle soluzioni standard di conservanti (4.19) e registrare il cromatogramma. Paragonare i cromatogrammi ottenuti. Se, nel cromatogramma dell'estratto del campione (6.1.1), non è presente alcun picco che abbia approssimativamente lo stesso tempo di ritenzione dell'isopropilparaben (standard interno raccomandato), continuare iniettando 10  $\mu\text{l}$  di soluzione campione con standard interno (6.1.2). Registrare il cromatogramma e misurare le altezze dei picchi.

Se si rileva un picco interferente nel cromatogramma della soluzione campione, avente all'incirca lo stesso tempo di ritenzione dell'isopropilparaben, si dovrà scegliere un altro standard interno. Se uno dei conservanti in esame è assente nel cromatogramma del campione, tale conservante può essere impiegato come standard interno alternativo.

Calcolare i rapporti delle altezze dei picchi dei conservanti in esame rispetto all'altezza di picco dello standard interno.

Accertare che si ottenga una risposta lineare per le soluzioni standard impiegate nella procedura di taratura.

Accertare che i cromatogrammi ottenuti per una soluzione standard e per la soluzione campione soddisfino le seguenti esigenze:

- la separazione dei picchi della coppia meno ben separata deve essere pari ad almeno 0,90 (per la definizione di «separazione dei picchi», cfr. figura 1).

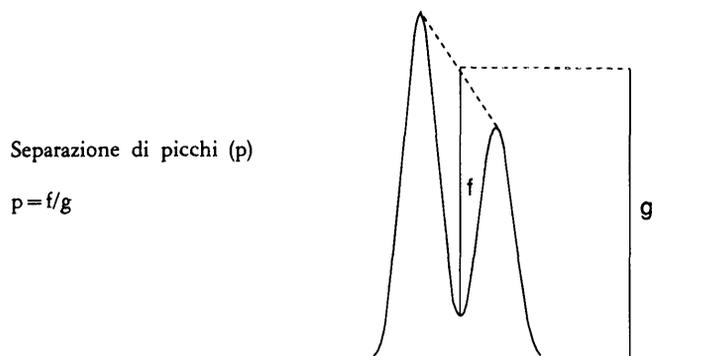


Figura 1: Separazione dei picchi

Se la separazione richiesta non è ottenuta, sarà necessario impiegare una colonna più efficiente, oppure si dovrà mettere a punto la composizione della fase mobile fino ad ottenere i risultati desiderati.

- Il fattore di asimmetria  $A_s$  di tutti i picchi ottenuti deve variare fra 0,9 e 1,5. (Per la definizione di «fattore di asimmetria di picco», cfr. figura 2). Per registrare il cromatogramma ai fini della determinazione del fattore di asimmetria, si raccomanda una velocità della carta pari ad almeno 2 cm/minuto.

Fattore di asimmetria ( $A_s$ )

$$A_s = b/a$$

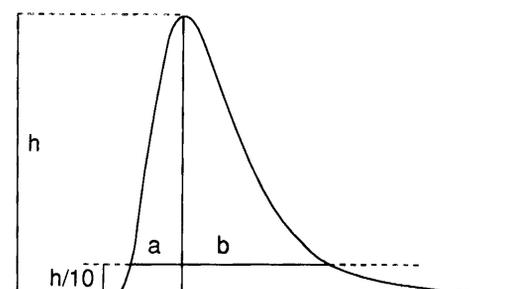


Figura 2: Fattore di asimmetria di picco

- Dovrà essere ottenuta una linea di base stabile.

#### 7. Calcolo

Servirsi della curva di taratura (6.2.2) e dei rapporti fra le altezze dei picchi dei conservanti in esame rispetto all'altezza di picco dello standard interno per calcolare la concentrazione dei conservanti presenti nella soluzione campione. Calcolare i contenuti ( $w_i$ ) di: 2-fenossietanolo, 1-fenossipropan-2-olo, metile 4-idrossibenzoato, etile 4-idrossibenzoato, propile 4-idrossibenzoato, butile 4-idrossibenzoato e benzile 4-idrossibenzoato, come percentuale in peso (% m/m) in base alla seguente formula:

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

dove:

$b_i$  = concentrazione ( $\mu\text{g/ml}$ ) del conservante  $i$  nella soluzione test, quale si desume mediante lettura dal grafico di taratura;

$a$  = massa (g) prelevata per il test.

#### 8. Ripetibilità (1)

Cfr. osservazioni al punto 10.5.

#### 9. Riproducibilità (1)

Cfr. osservazioni al punto 10.5.

#### 10. Osservazioni

##### 10.1. Fase stazionaria

Il comportamento di ritenzione dei soluti nelle determinazioni mediante HPLC dipende in forte misura dal tipo, dalla marca e dagli impieghi precedenti della fase stazionaria. È possibile stabilire se una colonna può essere impiegata per la separazione dei conservanti in esame, in base ai risultati ottenuti per le soluzioni standard (cfr. osservazioni al punto 6.2.3). Oltre al materiale proposto per il riempimento della colonna, può essere anche impiegato il materiale dei tipi seguenti: Hypersil ODS e Zorbax ODS.

In alternativa, la composizione raccomandata della fase mobile può essere ottimizzata allo scopo di ottenere la separazione richiesta.

##### 10.2. Lunghezza d'onda di rilevamento

Una ruggedness test eseguito in rapporto al metodo sopra descritto ha consentito di stabilire che un leggero cambiamento della lunghezza d'onda di rilevamento può avere effetti significativi sui risultati della determinazione.

Sarà quindi importante controllare con la massima attenzione questo parametro durante l'analisi.

(1) ISO 5725.

## 10.3. Interferenze

Nelle condizioni descritte in questo metodo ha luogo una eluizione anche di molti altri composti, come i conservanti e gli additivi presenti nei cosmetici. I tempi di ritenzione di un gran numero di conservanti citati nell'allegato VI della direttiva del Consiglio riguardante i prodotti cosmetici figurano in: N. de Kruijff, A. Schouten, M.A.H. Rijk, L.A. Pranato-Soetardhi (1989). *Determination of preservatives in cosmetic products II. High-performance liquid chromatographic identification* (J. Chromatography 469, 317-398).

10.4. Può essere opportuno impiegare una colonna di protezione per salvaguardare la colonna di analisi.

10.5. Il metodo è stato sperimentato in una ricerca eseguita in collaborazione fra nove laboratori. Sono stati analizzati tre campioni. Nella seguente tabella figurano, per ciascuno dei tre esempi, le medie in % m/m (m), la ripetibilità (r), la riproducibilità (R), determinate per le sostanze prese in esame:

Campione		2-fenossi- etanolo	1-fenossi- propan-2-olo	metilparaben	etilparaben	propilparaben	butilparaben	benzilparaben
Crema alla vitamine	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	
Crema evanescente	m	1,196		0,266	0,076			
	r	0,040		0,003	0,002			
	R	0,147		0,022	0,004			
Crema per massaggi	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