

31996L0045

L 213/8

DZIENNIK URZĘDOWY WSPÓLNOT EUROPEJSKICH

22.8.1996

SIÓDMA DYREKTYWA KOMISJI 96/45/WE**z dnia 2 lipca 1996 r.****odnosząca się do metod analizy niezbędnych do kontroli składu produktów kosmetycznych****(Tekst mający znaczenie dla EOG)**

KOMISJA WSPÓLNOT EUROPEJSKICH,

uwzględniając Traktat ustanawiający Wspólnotę Europejską,

uwzględniając dyrektywę Rady 76/768/EWG z dnia 27 czerwca 1976 r. w sprawie zbliżenia ustawodawstw Państw Członkowskich odnoszących się do produktów kosmetycznych⁽¹⁾, ostatnio zmienioną dyrektywą Komisji 95/34/WE⁽²⁾, w szczególności jej art. 8 ust. 1,

a także mając na uwadze, co następuje:

dyrektywa 76/768/EWG przewiduje urzędowe badanie produktów kosmetycznych mające na celu zapewnienie, że spełnione zostały warunki ustanowione przez przepisy wspólnotowe dotyczące składu produktów kosmetycznych;

wszelkie niezbędne metody analizy muszą zostać ustanowione możliwie szybko; niektóre metody zostały już przyjęte w dyrektywie Komisji⁽³⁾ 80/1335/EWG, zmienionej dyrektywą 87/143/EWG⁽⁴⁾, dyrektywą Komisji⁽⁵⁾ 82/434/EWG, zmienionej dyrektywą 90/207/EWG⁽⁶⁾ i dyrektywami Komisji 83/514/EWG⁽⁷⁾, 85/490/EWG⁽⁸⁾, 93/73/EWG⁽⁹⁾ i 95/32/WE⁽¹⁰⁾;

identyfikowanie i oznaczanie w produktach kosmetycznych 2-fenoksyetanolu, 1-fenoksypropan-2-olu, 4-hydroksybenzoesanów metylu, etylu, propylu, butylu i benzylu stanowią siódmy etap;

środki przewidziane w niniejszym rozporządzeniu są zgodne z opinią Komitetu ds. Dostosowania Dyrektywy (EWG) 76/768 dotyczącej postępu technicznego,

PRZYJMUJE NINIEJSZĄ DYREKTYWĘ:

Artykuł 1

Państwa Członkowskie podejmują wszelkie niezbędne działania dla zapewnienia, że podczas urzędowego badania produktów

kosmetycznych, identyfikowanie i oznaczanie 2-fenoksyetanolu, 1-fenoksypropan-2-olu, 4-hydroksybenzoesanów metylu, etylu, propylu, butylu i benzylu jest przeprowadzane zgodnie z metodami opisanymi w załączniku.

Artykuł 2

1. Państwa Członkowskie wprowadzą w życie przepisy ustawowe, wykonawcze i administracyjne niezbędne do wykonania niniejszej dyrektywy najpóźniej do dnia 30 września 1997 r. i niezwłocznie powiadomią o tym Komisję.

2. Przepisy przyjęte przez Państwa Członkowskie zawierają odniesienie do niniejszej dyrektywy lub odniesienie takie towarzyszy ich urzędowej publikacji. Metody dokonywania takiego odniesienia są określane przez Państwa Członkowskie.

3. Państwa Członkowskie przekażą Komisji teksty przepisów prawa krajowego, przyjętych w dziedzinach objętych niniejszą dyrektywą.

Artykuł 3

Niniejsza dyrektywa wchodzi w życie dwudziestego dnia po jej opublikowaniu w *Dzienniku Urzędowym Wspólnot Europejskich*.

Artykuł 4

Niniejsza dyrektywa skierowana jest do Państw Członkowskich.

Sporządzono w Brukseli, dnia 2 lipca 1996 r.

W imieniu Komisji

Emma BONINO

Członek Komisji

⁽¹⁾ Dz.U. L 262 z 7.9.1976, str. 169.

⁽²⁾ Dz.U. L 167 z 18.7.1995, str. 19.

⁽³⁾ Dz.U. L 383 z 31.12.1980, str. 27.

⁽⁴⁾ Dz.U. L 57 z 27.2.1987, str. 56.

⁽⁵⁾ Dz.U. L 185 z 30.6.1982, str. 1.

⁽⁶⁾ Dz.U. L 108 z 28.4.1990, str. 92.

⁽⁷⁾ Dz.U. L 291 z 24.10.1983, str. 9.

⁽⁸⁾ Dz.U. L 295 z 7.11.1985, str. 30.

⁽⁹⁾ Dz.U. L 231 z 14.9.1983, str. 34.

⁽¹⁰⁾ Dz.U. L 178 z 28.7.1995, str. 20.

ZAŁĄCZNIK

IDENTYFIKOWANIE I OZNACZANIE 2-FENOKSYETANOLU, 1-FENOKSYPROPAN-2-OLU, 4-HYDROKSYBENZOEANÓW METYLU, ETYLU, PROPYLU, BUTYLU I BENZYLU W PRODUKTACH KOSMETYCZNYCH**A. IDENTYFIKOWANIE****1. Przedmiot i zakres stosowania**

W metodzie określa się procedurę TLC, która w połączeniu z metodą oznaczania opisaną w sekcji B, pozwala na identyfikowanie 2-fenoksyetanolu, 1-fenoksypropan-2-olu, 4-hydroksybenzoesanu metylu, 4-hydroksybenzoesanu etylu, 4-hydroksybenzoesanu propylu, 4-hydroksybenzoesanu butylu i 4-hydroksybenzoesanu benzylu w produktach kosmetycznych.

2. Zasada

Środki konserwujące ekstrahuje się acetonem z zakwaszonej próbki kosmetyku. Po przesączeniu roztwór acetonowy miesza się z wodą i w środowisku alkalicznym kwasy tłuszczowe zostają strącone w postaci soli wapnia. Alkaliczną mieszaninę aceton/woda ekstrahuje się eterem dietylowym w celu usunięcia substancji lipofilowych. Po zakwaszeniu środki konserwujące ekstrahuje się eterem dietylowym. Próbkę ekstraktu w eterze dietylowym nanosi się na płytkę do chromatografii cienkowarstwowej pokrytą żelą krzemionkowym. Po rozwinięciu chromatogram otrzymany na płycie obserwuje się w świetle UV i wywołuje używając odczynnika Millona.

3. Odczynniki**3.1. Ogólne**

Wszystkie używane odczynniki posiadają czystość analityczną. Woda jest wodą destylowaną lub wodą co najmniej równej czystości.

3.2. Aceton**3.3. Eter dietylowy****3.4. n-Pentan****3.5. Metanol****3.6. Kwas octowy, lodowaty****3.7. Kwas solny, roztwór $c(\text{HCl}) = 4 \text{ mol/l}$** **3.8. Wodorotlenek potasu, roztwór $c(\text{KOH}) = 4 \text{ mol/l}$.****3.9. 2-hydrat chlorku wapnia ($\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$)****3.10. Odczynnik wywołujący: odczynnik Millona**

Odczynnik Millona [azotan rtęci (II)] to fabrycznie przygotowany roztwór, dostępny w handlu (Fluka 69820).

3.11. 2-Fenoksyetanol**3.12. 1-Fenoksypropan-2-ol****3.13. 4-Hydroksybenzoesan metylu (metyloparaben)****3.14. 4-Hydroksybenzoesan etylu (etyloparaben)****3.15. 4-Hydroksybenzoesan n-propylu (propyloparaben)****3.16. 4-Hydroksybenzoesan n-butylu (butyloparaben)****3.17. 4-Hydroksybenzoesan benzylu (benzyloparaben)****3.18. Roztwory odniesienia**

Przygotować 0,1 % (m/V) roztwory wszystkich substancji odniesienia z ppkt 3.11, 3.12, 3.13, 3.14, 3.15, 3.16, i 3.17 w metanolu.

3.19. Rozpuszczalnik rozwijający

Zmieszać 88 objętości n-pentanu (ppkt 3.4) z 12 objętościami kwasu octowego lodowatego (ppkt 3.6).

4. Aparatura

Standardowe wyposażenie laboratoryjne oraz:

- 4.1. Łaźnia wodna, z możliwością utrzymania temperatury 60 °C
- 4.2. Komora chromatograficzna (nie wyłożona bibułą filtracyjną)
- 4.3. Źródło światła ultrafioletowego, 254 nm
- 4.4. Płytki do chromatografii cienkowarstwowej, 20 cm × 20 cm, pokryte fabrycznie 0,25 mm warstwą żelu krzemionkowego 60 F254ze strefą nanoszenia (Merck nr 11798 lub równoważne)
- 4.5. Suszarka z możliwością utrzymania temperatury 105 °C
- 4.6. Suszarka do suszenia włosów gorącym powietrzem
- 4.7. Wełniany wałek do malowania, długość około 10 cm, średnica zewnętrzna około 3,5 cm. Grubość wełnianej warstwy powinna wynosić 2–3 mm. Jeżeli konieczne należy przyciąć wełnianą warstwę.
(patrz uwaga w ppkt 5.2)
- 4.8. 50 ml szklana rurka z gwintowanym korkiem
- 4.9. Płytką ogrzewaną elektrycznie z termostatyczną kontrolą temperatury. Nastawienie temperatury około 80 °C. Płytką grzejącą jest pokryta płytka aluminiowa o wymiarach 20 cm × 20 cm i o grubości 6 mm, dla uzyskania równomiernego rozprowadzania ciepła.

5. Procedura

5.1. Przygotowanie próbek

Odważyć około 1 g próbki w 50 ml szklanej rurce z gwintowanym korkiem (ppkt 4.8.). Dodać cztery krople roztworu kwasu solnego (ppkt 3.7.) i 40 ml acetonu.

Do produktów kosmetycznych silnie alkalicznych, takich jak mydło toaletowe, dodaje 20 kropli roztworu kwasu solnego. Zamknąć rurkę, łagodnie ogrzewać mieszaninę do około 60 °C dla ułatwienia ekstrakcji środków konserwujących do fazy acetonowej i wytrząsać energicznie przez jedną minutę.

Zmierzyć pH roztworu papierkiem wskaźnikowym pH i dostosować kwas solny do $\text{pH} \leq 3$. Wytrząsać energicznie ponownie przez jedną minutę.

Schłodzić roztwór do temperatury pokojowej i przesączyć przez bibułę filtracyjną do kolby stożkowej. Przenieść 20 ml przesącza do 200 ml kolby stożkowej, dodać 60 ml wody i wymieszać. Doprowadzić odczyn mieszaniny do pH 10 dodając wodorotlenek potasu (3.8.), używając papierka wskaźnikowego pH.

Dodać 1 g 2-hydratu chlorku wapnia (ppkt 3.9.) i wytrząsać energicznie. Przesączyć roztwór przez bibułę filtracyjną do 250 ml lejka rozdzielczego zawierającego 75 ml eteru dietylowego i wytrząsać energicznie przez jedną minutę. Pozostawić warstwy do rozdzielenia i zebrać warstwę wodną w 200 ml kolbie stożkowej. Doprowadzić odczyn roztworu do pH około 2 dodając roztwór kwasu solnego, używając papierka wskaźnikowego pH. Następnie dodać 10 ml eteru dietylowego i wytrząsać energicznie przez jedną minutę. Pozostawić do rozdzielenia warstw i przenieść około 2 ml warstwy eteru dietylowego do 5 ml fiołki na próbkę.

5.2. Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)

Umieścić płytkę do chromatografii cienkowarstwowej (ppkt 4.4.) na ogrzewanej płytce aluminiowej (ppkt 4.9.). Nanieść po 10 ul kolejno wszystkich roztworów odniesienia (ppkt 3.18.) i 100 pl roztworu (roztworów) próbki (próbek) (ppkt 5.1.) na linię początkową w strefie nanoszenia na płytce do chromatografii cienkowarstwowej.

Jeżeli jest to porządane, można użyć strumienia powietrza dla ułatwienia odparowania rozpuszczalnika. Zdjąć płytkę TLC z ogrzewanej płytki i pozostawić do schłodzenia do temperatury pokojowej. Przenieść 100 ml rozpuszczalnika rozwijającego (ppkt 3.19.) do komory chromatograficznej (ppkt 4.2.).

Niezwłocznie umieścić płytkę TLC w nienasyconej komorze i rozwijać w temperaturze pokojowej do chwili gdy czoło rozpuszczalnika osiągnie odległość około 15 cm od linii bazowej. Wyjąć płytkę z komory chromatograficznej i wysuszyć w strumieniu gorącego powietrza przy pomocy suszarki do włosów z gorącym powietrzem.

Zbadać płytkę w świetle UV (ppkt 4.3.) i zaznaczyć położenie plam. Ogrzewać płytkę w ciągu 30 minut w suszarce (ppkt 4.5.) w 100 °C dla usunięcia nadmiaru kwasu octowego. Wywołać plamy środków konserwujących na chromatogramie odczynnikami Millona (ppkt 3.10.) przez zanurzenie wałka do malowania (ppkt 4.7.) w odczynniku i przesunięcie po płytce TLC do równomiernego nawilżenia.

Uwaga: Alternatywnie plamy można wywołać przez staranne spryskanie odczynnikiem Milona wszystkich plam zaznaczonych w świetle UV.

Estry kwasu 4-hydroksybenzoesowego pojawiają się jako czerwone plamy, 2-fenoksyetanol i 1-fenoksypropan-2-ol jako żółte plamy. Jednak należy zauważyć, że sam kwas 4-hydroksybenzoesowy, który może znajdować się w próbkach jako środek konserwujący lub produkt rozkładu parabenu, pojawi się również jako czerwona plama. (ppkt 7.3. i 7.4.).

6. Identyfikowanie

Obliczyć wartości R_f dla wszystkich plam. Porównać plamy otrzymane z roztworu próbki z plamami roztworów odniesienia ze względu na ich wartości R_f , zachowanie w promieniowaniu UV i kolor po wywołaniu. Wyciągnąć wstępne wnioski dotyczące identyfikowania środków konserwujących.

Jeżeli zachodzi przypuszczenie, że parabeny znajdują się w próbce, należy zastosować chromatografię cieczową HPLC opisaną w sekcji B. Połączyć wyniki otrzymane z TLC i wysokosprawną chromatografią cieczową (HPLC) dla potwierdzenia obecności 2-fenoksyetanolu, l-fenoksypropan-2-olu i parabenów.

7. Uwagi

- 7.1. Ze względu na toksyczne działanie odczynnika Millona najlepszym sposobem jego stosowania jest jedna z opisanych procedur. Spryskiwanie nie jest polecane.
- 7.2. Inne związki zawierające grupy hydroksylowe mogą również dawać barwne plamy z odczynnikiem Milona. Tablicę kolorów i wartości R_f otrzymanych dla pewnej liczby środków konserwujących z użyciem procedury TLC można znaleźć w: de Kruijf. N., Rijk M. A. H., Pranato-Soetardhi L. A. i Schouten A; Determination of preservatives in cosmetic product I: Thin-layer chromatographic procedure for the identification of preservatives in cosmetic products (*J. Chromatography* 410, 395–411).
- 7.3. Wartości R_f podane w tabeli poniżej służą jako wskazówka do identyfikacji plam.

Związek	$R_f \times 100$	Barwa
kw. 4-hydroksybenzoesowy	11	czerwona
metyloparaben	12	czerwona
etyloparaben	17	czerwona
propyloparaben	21	czerwona
butyloparaben	26	czerwona
benzyloparaben	16	czerwona
2-fenoksyetanol	29	żółta
l -fenoksypropan-2-ol	50	żółta

- 7.4. Nie uzyskuje się rozdzielenia kwasu 4-hydroksybenzoesowego i metyloparabenu lub benzyloparabenu i etyloparabenu. Identyfikowanie tych związków powinno być potwierdzone przez przeprowadzenie analizy metodą HPLC opisaną w sekcji B i porównanie czasów retencji otrzymanych dla próbki z czasami dla norm.

B. OZNACZANIE

1. Przedmiot i zakres zastosowania

Metodę tę stosuje się do oznaczania 2-fenoksyetanolu, l-fenoksypropan-2-olu, 4-hydroksybenzoesanu metylu, 4-hydroksybenzoesanu etylu, 4-hydroksybenzoesanu propylu, 4-hydroksybenzoesanu butylu i 4-hydroksybenzoesanu benzylu w produktach kosmetycznych.

2. Definicje

Ilości środków konserwujących oznaczone tą metodą są wyrażone w procentach masowych.

3. Zasada

Próbkę zakwasza się dodając kwas siarkowy i następnie dysperguje w mieszaninie alkoholu etylowego i wody. Po łagodnym podgrzaniu, mieszaninę filtruje się w celu stopienia fazy ciekłej dla poprawienia ilościowej ekstrakcji.

Środki konserwujące w przesączu oznacza się metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) na odwróconych fazach stosując 4-hydroksybenzoesan izopropylu jako standard wewnętrzny.

4. Odczynniki

4.1. Ogólne

Wszystkie odczynniki muszą posiadać czystość analityczną i być odpowiednie do HPLC gdzie stosowane. Woda powinna być wodą destylowaną lub wodą co najmniej równej czystości.

4.2. Alkohol etylowy, absolutny

4.3. 2-Fenoksyetanol

4.4. l-Fenoksybenzoesan-2-ol

- 4.5. 4-Hydroksybenzoesan metylu (metyloparaben)
- 4.6. 4-Hydroksybenzoesan etylu (etyloparaben)
- 4.7. 4-Hydroksybenzoesan n-propylu (propyloparaben)
- 4.8. 4-Hydroksybenzoesan izopropylu (izopropyloparaben)
- 4.9. 4-Hydroksybenzoesan n-butyłu (butyloparaben)
- 4.10. 4-Hydroksybenzoesan benzylu (benzyloparaben)
- 4.11. Tetrahydrofuran
- 4.12. Metanol
- 4.13. Acetonitryl
- 4.14. Kwas siarkowy, roztwór $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 2 \text{ mole/l}$
- 4.15. Mieszanina alkohol etylowy/woda
Zmieszać dziewięć objętości alkoholu etylowego (ppkt 4.2.) i jedną objętość wody.
- 4.16. Roztwór wewnętrzny standardu
Odważyć dokładnie około 0,25 g izopropyloparabenu (ppkt 4.8.), przenieść do 500 ml kolby miarowej, rozpuścić i uzupełnić objętość mieszaniną alkohol etylowy/woda (ppkt 4.15.).
- 4.17. Faza ruchoma: mieszanina tetrahydrofuran/woda/metanol/acetonitryl
Zmieszać 5 objętości tetrahydrofuranu, 60 objętości wody, 10 objętości metanolu i 25 objętości acetonitrylu.
- 4.18. Bazowy roztwór środków konserwujących
Do 100 ml kolby miarowej odważyć dokładnie około 0,2 g 2-fenoksyetanolu, 0,2 g 1-fenoksypropan-2-olu, 0,05 g metyloparabenu, 0,05 g etyloparabenu, 0,05 g propyloparabenu, 0,05 g butyloparabenu i 0,025 g benzyloparabenu, rozpuścić i uzupełnić objętość mieszaniną etanol/woda.
Roztwór przechowywany w lodówce jest trwały przez jeden tydzień.
- 4.19. Standardowe roztwory środków konserwujących.
Z roztworu bazowego (ppkt 4.18.) przenieść odpowiednio 20,00 ml, 10,00 ml, 5,00 ml, 2,00 ml i 1,00 ml do 50-ml kolb miarowych. Do każdej kolby dodać po 10,00 ml roztworu wewnętrznego standardu (ppkt 4.16.) i 1,0 ml roztworu kwasu siarkowego (ppkt 4.14.) i uzupełnić objętość mieszaniną alkohol etylowy/woda. Roztwory te powinny być świeżo przygotowane.

5. Aparatura

Standardowe wyposażenie laboratoryjne oraz:

- 5.1. Łaźnia wodna, z możliwością utrzymania temperatury $60 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.
- 5.2. Wysokosprawny chromatograf cieczowy z detektorem UV o długości fali 280 nm
- 5.3. Kolumna analityczna:
Stal kwasoodporna, długość 25 cm, średnica wewnętrzna 4,6 mm (lub długość 12,5 cm, średnica wewnętrzna 4,6 mm) z wypełnieniem Nucleosil 5C18 lub równoważne (patrz ppkt 10.1).
- 5.4. 100-ml szklane rurki z gwintowanym korkiem
- 5.5. Kamyki wrzenne, z karborundu, o wymiarach 2 do 4 mm lub równoważne

6. Procedura

- 6.1. Przygotowanie próbki
- 6.1.1. Przygotowanie próbki bez dodatku wewnętrznego standardu

Do 100 ml szklanej rurki z gwintowanym korkiem odważyć około 1,0 g próbki. Pipetą dodać do rurki 1,0 ml roztworu kwasu siarkowego (ppkt 4.14.) i 50 ml mieszaniny alkohol etylowy/woda (ppkt 4.15.). Dodać około 1 g kamyków wrzennych (ppkt 5.5.), zamknąć rurkę i wytrząsać energicznie aż do otrzymania homogenicznej zawiesiny. Wytrząsać co najmniej przez jedną minutę. Umieścić rurkę na okres pięciu minut w łaźni wodnej (ppkt 5.1.) utrzymywanej w temperaturze $60 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ dla ułatwienia ekstrakcji środków konserwujących do fazy etanolowej.

Niezwłocznie schłodzić rurkę w strumieniu zimnej wody i przechowywać ekstrakt w lodówce przez jedną godzinę. Przesączyć ekstrakt przez bibułę filtracyjną. Przenieść około 2 ml przesącza do 5 ml fiołki na próbkę. Ekstrakty należy przechowywać w lodówce i oznaczyć skład metodą HPLC w ciągu 24 godzin.

6.1.2. Przygotowanie próbki z dodatkiem wewnętrznego standardu

Do 100-ml szklanej rurki z gwintowanym korkiem odważyć z dokładnością do trzeciego miejsca dziesiętnego $1,0 \pm 0,1$ g próbki.

Do rurki pipetować 1,0 ml roztworu kwasu siarkowego i 40,0 ml mieszaniny alkoholu etylowego/woda. Dodać około 1 g kamyków wrzennych (ppkt 5.5.) i dokładnie 10,00 ml roztworu wewnętrznego standardu. Zamknąć rurkę i wstrząsać energicznie aż do otrzymania homogenicznej zawiesiny. Wstrząsać przez co najmniej jedną minutę. Umieścić rurkę na okres pięciu minut w łaźni wodnej utrzymywanej w temperaturze $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ w celu ułatwienia ekstrakcji środków konserwujących do fazy etanolowej.

Niezwłocznie schłodzić rurkę w strumieniu bieżącej zimnej wody i przechowywać ekstrakt w lodówce przez jedną godzinę. Przesączyć ekstrakt przez bibułę filtracyjną.

Przenieść około 2 ml przesącza do 5 ml fiołki na próbę (roztwór testowy). Przechowywać ekstrakt w lodówce i wykonać oznaczenia metodą HPLC w ciągu 24 godzin.

6.2. Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC)

6.2.1. Warunki analizy chromatograficznej

- Faza ruchoma: mieszanina tetrahydrofuran/woda/metanol/acetonitryl (ppkt 4.17)
- Szybkość przepływu: 1,5 ml/minutę
- Długość fali detekcji: 280 nm

6.2.2. Kalibrowanie

Wstrzyknąć po 10 μl wszystkich standardowych roztworów środków konserwujących (ppkt 4.19.). Z otrzymanych chromatogramów oznaczyć stosunki wysokości szczytu standardowych roztworów środków konserwujących do wysokości szczytu wewnętrznego standardu. Wykreślić krzywą dla każdego środka konserwującego odnosząc te stosunki do stężeń roztworów standardowych.

6.2.3. Oznaczanie

Wstrzyknąć po 10 μl roztworu próbki bez wewnętrznego standardu (ppkt 6.1.1.) do chromatografu i zarejestrować chromatogram.

Wstrzyknąć 10 μl jednego ze standardowych roztworów środków konserwujących (ppkt 4.19.) i zarejestrować chromatogram. Porównać otrzymane chromatogramy.

Jeżeli na chromatogramie ekstraktu próbki (ppkt 6.1.1.) nie ma żadnego szczytu mającego w przybliżeniu ten sam czas retencji jak izopropylparaben (polecany standard wewnętrzny), kontynuować wprowadzając strzykawką 10 μl roztworu próbki z wewnętrznym standardem (ppkt 6.12.). Zarejestrować chromatogram i zmierzyć wysokości szczytu.

Jeżeli na chromatogramie roztworu próbki występuje szczyt przeszkadzający o takim samym czasie retencji jak izopropylparaben, należy wybrać inny wewnętrzny standard.

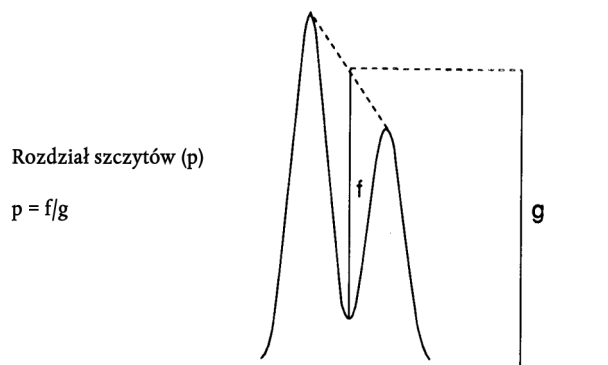
Jeżeli jeden ze środków konserwujących poddawanych badaniu jest nieobecny na chromatogramie, ten środek można stosować jako alternatywny wewnętrzny standard.

Obliczyć stosunki wysokości szczytów badanych środków konserwujących do wysokości szczytu wewnętrznego standardu.

Upewnić się, że dla roztworów standardowych stosowanych w procedurze kalibrowania otrzymuje się liniową zależność.

Upewnić się, że chromatogramy otrzymane dla roztworu standardowego i roztworu próbki odpowiadają następującym wymaganiom:

- rozdział szczytów najgorzej rozdzielonej pary powinien wynosić co najmniej 0,90 (definicję rozdziału pików przedstawiono na rys. I).



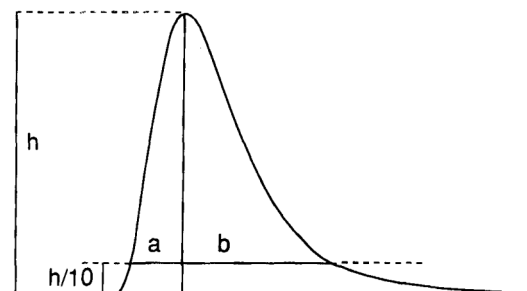
Rys. I. Rozdział szczytów

Jeżeli nie uzyskano wystarczającego rozdzielania, można zastosować zarówno kolumnę o większej rozdzielczości jak i poprawiać skład fazy ruchomej aż do spełnienia wymagań.

- współczynniki asymetrii A_s wszystkich otrzymanych szczytów znajdują się w zakresie 0,9–1,5 (definicję współczynnika asymetrii przedstawiono na rys. 2) Do zarejestrowania chromatogramu w celu oznaczenia współczynnika asymetrii zaleca się szybkość przesuwu papieru co najmniej 2 cm/min.

Współczynnik
asymetrii (A_s)

$$A_s = b/a$$



Rys. 2. Współczynnik asymetrii szczytu A_s

- Powinno się otrzymać stałą linię podstawową.

7. Obliczenie

Zastosować krzywą odwzorowania (ppkt 6.2.2.) i stosunki wysokości szczytów badanych środków konserwujących do wysokości szczytu wewnętrznego standardu do obliczenia stężenia środków konserwujących w roztworze próbki. Obliczyć zawartość 2-fenoksyetanolu, 1-fenoksypropan-2-olu, 4-hydroksybenzoesanu metylu, 4-hydroksybenzoesanu etylu, 4-hydroksybenzoesanu propylu, 4-hydroksybenzoesanu butylu i 4-hydroksybenzoesanu benzylu, w_i w procentach masowych (% m/m), stosując wzór:

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

w którym:

b_i = stężenie (µg/ml) środka konserwującego „i” w roztworze badanym, odczytane z krzywej odwzorowania; oraz

a = masa (g) analizowanej próbki.

8. Powtarzalność ⁽¹⁾

Patrz: uwagi, ppkt 10.5.

9. Odtwarzalność ⁽¹⁾

Patrz: uwagi, pkt 10.5.

10. Uwagi

10.1. Faza spoczynkowa

Zachowanie retencyjne roztworu przy oznaczaniu metodą HPLC zależy w dużym stopniu od rodzaju, gatunku i przygotowania fazy spoczynkowej. O tym czy kolumnę można zastosować do rozdzielania badanych środków konserwujących, można wnioskować na podstawie wyników otrzymanych dla roztworów standardowych (patrz uwagi w ppkt 6.2.3.). Stwierdzono, że poza proponowanymi już materiałami do wypełnienia kolumn, również Hypersil ODS i Zorbax ODS są odpowiednie.

Także skład polecanej fazy ruchomej można optymalizować w celu uzyskania wymaganego rozdzielania.

10.2. Długość fali detekcji

Badanie chropowatości opisanej metody wykazało, że niewielka zmiana w długości fali detekcji może mieć znaczący wpływ na wyniki oznaczenia.

Dlatego parametr ten musi być starannie kontrolowany podczas analizy.

⁽¹⁾ ISO 5725.

10.3. Zakłócenia

W warunkach opisanych w tej metodzie wiele innych różnych związków, takich jak środki konserwujące i dodatki do kosmetyków, ulega równie dobrze eluowaniu. Czasy retencji wielu środków konserwujących wymienionych w załączniku VI do dyrektywy Rady dotyczącej produktów kosmetycznych można znaleźć w: de Kruijff N., Rijk M. A. H., Pranato-Soetardhi L. A. i Schouten A. Determination of preservatives in cosmetic products II. Highperformance liquid chromatographic identification. (*J. Chromatography*, 1989, 469, str. 317–398).

10.4. Do zamontowanej kolumny analitycznej można użyć odpowiedniej kolumny zabezpieczającej.

10.5. Metodę sprawdzono we wspólnym doświadczeniu z udziałem dziewięciu laboratoriów. Analizowano trzy próbki. Poniższa tabela podaje zawartość w% m/m (m), powtarzalność (r) i odtwarzalność (R) substancji obecnych we wszystkich trzech próbkach:

Próbka		2-fenoksyeta- nol	1-enoksy-pro- pan-2-ol	metrylo-para- ben	etylo-paraben	propylo-para- ben	butylo-paraben	benzylo-para- ben
Krem witaminowy	m	1,124		0,250	0,0628	0,0310	0,0906	
	r	0,016		0,018	0,0035	0,0028	0,0044	
	R	0,176		0,030	0,0068	0,0111	0,0034	
Krem nawilżający	m	1,196		0,266	0,076			
	r	0,040		0,003	0,002			
	R	0,147		0,022	0,004			
Krem do masażu	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