

31996L0045

L 213/8

ÚRADNÝ VESTNÍK EURÓPSKÝCH SPOLOČENSTIEV

22.8.1996

SIEDMA SMERNICA KOMISIE 96/45/ES

z 2. júla 1996

vzťahujúca sa na metódy analýzy potrebné na kontrolu zloženia kozmetických výrobkov

(Text s významom pre EHP)

KOMISIA EURÓPSKÝCH SPOLOČENSTIEV,

so zreteľom na Zmluvu o založení Európskeho spoločenstva,

so zreteľom na smernicu Rady 76/768/EHS z 27. júla 1976 o aproximácii právnych predpisov členských štátov vzťahujúcich sa na kozmetické výrobky⁽¹⁾, naposledy zmenenú a doplnenú smernicou Komisie 95/34/EC⁽²⁾, najmä na jej článok 8 ods. 1,

keďže smernica 76/768/EHS ustanovuje vykonávať úradné testy kozmetických výrobkov s cieľom zabezpečiť plnenie podmienok určených ustanoveniami spoločenstva týkajúcimi sa zloženia kozmetických výrobkov;

keďže by mali byť čo najskôr určené všetky potrebné metódy analýzy; keďže niektoré metódy už boli prijaté smernicami Komisie: 80/1335/EHS⁽³⁾, naposledy zmenenou a doplnenou smernicou 87/143/EHS⁽⁴⁾, 82/434/EHS⁽⁵⁾, naposledy zmenenou a doplnenou smernicou 90/207/EHS⁽⁶⁾ a smernicami Komisie 83/514/EHS⁽⁷⁾, 85/490/EHS⁽⁸⁾, 93/73/EHS⁽⁹⁾ a 95/32/ES⁽¹⁰⁾;

keďže zistenie prítomnosti a stanovenie obsahu 2-fenoxyetanolu, 1-fenoxypropan-2-olu, metylu, etylu, propylu, butylu a benzyl 4-hydroxybenzoátu v kozmetických výrobkoch predstavuje siedmy krok;

keďže opatrenia ustanovené v tejto smernici sú v súlade so stanoviskom Výboru pre prispôsobenie smernice 76/768/EHS technickému pokroku,

PRIJALA TÚTO SMERNICU:

Článok 1

Členské štáty vykonávajú všetky potrebné opatrenia, ktorými zabezpečia, že počas úradných testov kozmetických výrobkov

sa zisťuje prítomnosť a určovanie obsahu 2-fenoxyetanolu, 1-fenoxypropan-2-olu, metylu, etylu, propylu, butylu a benzyl 4-hydroxybenzoátu vykonávať v súlade s metódou popísanou v prílohe.

Článok 2

1. Členské štáty prijímú zákony, iné právne predpisy a správne opatrenia potrebné na dosiahnutie súladu s touto smernicou najneskôr 30. septembra 1997. Okamžite o tom budú informovať Komisiu.

2. Keď členské štáty prijímú tieto ustanovenia, musia v čase úradného uverejnenia obsahovať odkaz na túto smernicu, alebo musia byť takýmto odkazom sprevádzané. Členské štáty prijímú postup pre zaraďovanie takéhoto odkazu.

3. Členské štáty oznámia Komisii tie ustanovenia vnútroštátneho práva, ktoré prijímú v oblasti, na ktorú sa vzťahuje táto smernica.

Článok 3

Táto smernica nadobudne účinnosť 20. deň odo dňa jej uverejnenia v Úradnom vestníku Európskych spoločenstiev.

Článok 4

Táto smernica je adresovaná členským štátom.

V Bruseli 2. júla 1996

Za Komisiu

Emma BONINO

členka Komisie

⁽¹⁾ Ú. v. ES L 262, 27. 9. 1976, s. 169.

⁽²⁾ Ú. v. ES L 167, 18. 7. 1995, s. 19.

⁽³⁾ Ú. v. ES L 383, 31. 12. 1980, s. 27.

⁽⁴⁾ Ú. v. ES L 57, 27. 2. 1987, s. 56.

⁽⁵⁾ Ú. v. ES L 185, 30. 6. 1982, s. 1.

⁽⁶⁾ Ú. v. ES L 108, 28. 4. 1990, s. 92.

⁽⁷⁾ Ú. v. ES L 291, 24. 10. 1983, s. 9.

⁽⁸⁾ Ú. v. ES L 295, 7. 11. 1985, s. 30.

⁽⁹⁾ Ú. v. ES L 231, 14. 9. 1993, s. 34.

⁽¹⁰⁾ Ú. v. ES L 178, 28. 7. 1995, s. 20.

PRÍLOHA

ZISTENIE PRÍTOMNOSTI A STANOVENIE OBSAHU 2-FENOXYETANOLU, 1-FENOXYPROPAN-2-OLU, METYL 4-HYDROXYBENZOÁTU, ETYL 4-HYDROXYBENZOÁTU, PROPYL 4-HYDROXYBENZOÁTU, BUTYL 4-HYDROXYBENZOÁTU A BENZYL 4-HYDROXYBENZOÁTU V KOZMETICKÝCH VÝROBKOCH**A. ZISTENIE PRÍTOMNOSTI****1. Rozsah a oblasť pôsobnosti**

Táto metóda určuje postup chromatografie v tenkej vrstve (TLC), ktorý v spojení s metódou stanovenia obsahu popísanou v oddieli B, umožňuje zistiť prítomnosť 2-fenoxyetanolu, 1-fenoxypropan-2-olu, metyl 4-hydroxybenzoátu, etyl 4-hydroxybenzoátu, propyl 4-hydroxybenzoátu, butyl 4-hydroxybenzoátu a benzyl 4-hydroxybenzoátu v kozmetických výrobkoch.

2. Princíp

Konzervačné látky sa extrahujú z okyslenej vzorky kozmetického výrobku acetónom. Acetónový roztok sa po filtrácii zmieša s vodou a v alkalickom prostredí sa mastné kyseliny vyzrážajú vo forme solí vápnika. Alkalická zmes acetónu s vodou sa extrahuje dietyléterom, čím sa odstráni lipofilické látky. Po okyslení sa konzervačné látky extrahujú dietyléterom. Alikvótna časť dietyléterového extraktu sa zachytí v podobe škvrín na tenkovrstvovej platni pokrytej silikagelom. Po vyvolaní platne sa získaný chromatogram pozoruje v ultrafialovom svetle a zviditeľní sa pomocou Millonovho činidla.

3. Činidlá**3.1. Všeobecne**

Všetky činidlá musia mať analytickú čistotu. Voda musí byť destilovaná, alebo musí mať aspoň rovnakú čistotu.

3.2. Acetón**3.3. Dietyléter****3.4. n-Pentán****3.5. Metanol****3.6. Kyselina octová, ľadová****3.7. Roztok kyseliny chlorovodíkovej $c(\text{HCl}) = 4 \text{ mol/l}$** **3.8. Roztok hydroxidu draselného $c(\text{KOH}) = 4 \text{ mol/l}$** **3.9. Dihydrát chloridu vápenatého ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)****3.10. Detekčné činidlo: Millonovo činidlo**

Millonovo činidlo (dusičnan ortuťnatý (II)) je priemyselne vyrábaný obchodne dostupný roztok (Fluka 69820).

3.11. 2-Fenoxyetanol**3.12. 1-Fenoxypropan-2-ol****3.13. Metyl 4-hydroxybenzoát (metylparabén)****3.14. Etyl 4-hydroxybenzoát (etylparabén)****3.15. n-Propyl 4-hydroxybenzoát (propylparabén)****3.16. n-Butyl 4-hydroxybenzoát (butylparabén)****3.17. Benzyl 4-hydroxybenzoát (benzylparabén)****3.18. Referenčné roztoky**

Pripravte 0,1 % (m/V) roztoky každej z referenčných látok 3.11, 3.12, 3.13, 3.14, 3.15, 3.16 a 3.17 v metanole.

3.19. Vyvolávacie rozpúšťadlo

Zmiešajte 88 objemových jednotiek n-pentánu (3.4) s 12 objemovými jednotkami ľadovej kyseliny octovej (3.6).

4. Prístroje

Normálne laboratórne vybavenie a:

- 4.1. Vodný kúpeľ schopný udržiavať teplotu 60 °C
- 4.2. Vyvolávacia nádoba (nevystlaná filtračným papierom)
- 4.3. Zdroj ultrafialového svetla, 254 nm
- 4.4. Tenkovrstvové platne, 20 cm x 20 cm, vopred pokryté 0,25 mm hrubou vrstvou silikagelu 60F₂₅₄, s koncentračnou zónou (Merck č. 11798, Darmstadt alebo ekvivalentnou)
- 4.5. Piecka schopná udržiavať teplotu až 105 °C
- 4.6. Horúcovzdušný sušič vlasov
- 4.7. Vlnený maliarsky valec dlhý približne 10 cm, vonkajší priemer približne 3,5 cm. Hrúbka vlnenej vrstvy musí byť 2 až 3 mm. Ak treba, vlnu zastrihnite.

Pozri poznámku 5.2

- 4.8. Sklené skúmavky s objemom 50 ml a so skrutkovacím viečkom.
- 4.9. Elektrická výhrevná platňa s termostatickým regulátorom teploty. Nastavenie teploty: asi 80 °C. Horúca platňa musí byť zakrytá hliníkovou platňou s rozmermi 20 cm x 20 cm a hrúbkou asi 6 mm, vďaka ktorej sa získa rovnomerné rozloženie tepla.

5. Postup

5.1. Príprava vzorky

Odvážte približne 1 g vzorky v 50 ml skúmavke so skrutkovacím viečkom (4.8). Pridajte štyri kvapky roztoku kyseliny chlorovodíkovej (3.7) a 40 ml acetónu.

V prípade silne zásaditých kozmetických výrobkov, ako je toaletné mydlo, je potrebné pridať 20 kvapiek roztoku kyseliny chlorovodíkovej. Uzavrite skúmavku, zmes pomaly ohrejte približne na 60 °C, čím uľahčíte extrakciu konzervačných látok do acetónovej fázy a minútu silno traste.

Zmerajte pH roztoku lakmusovým papierom a pomocou roztoku kyseliny chlorovodíkovej upravte pH roztoku na hodnotu ≤ 3. Znova minútu silno traste.

Ochlaďte roztok na izbovú teplotu a prefiltrujte ho cez filtračný papier do kužeľovej banky. Preneste 20 ml filtrátu do 200 ml kužeľovej banky, pridajte 60 ml vody a premiešajte. Pomocou hydroxidu draselného (3.8) upravte pH roztoku približne na hodnotu 10 a použite pritom lakmusový papier.

Pridajte 1 g dihydrátu chloridu vápenatého (3.9) a silno potraсте. Prefiltrujte roztok cez filtračný papier do 250 ml separačného lievika, ktorý obsahuje 75 ml dietyléteru a minútu silno traste. Počkajte, kým sa fázy separujú a odoberte vodnú vrstvu do 200 ml kužeľovej banky. Pomocou roztoku kyseliny chlorovodíkovej upravte pH roztoku približne na hodnotu 2 a použite pritom lakmusový papier. Potom pridajte 10 ml dietyléteru a minútu silno traste. Počkajte, kým sa fázy separujú a preneste približne 2 ml z dietyléterovej vrstvy do fľaštičky na vzorky s objemom 5 ml.

5.2. Chromatografia v tenkej vrstve (TLC)

Položte TLC platňu (4.4) na ohriatu hliníkovú platňu (4.9). Nalejte 10 µl z každého z referenčných roztokov (3.18) a 100 µl roztoku (roztokov) vzorky (5.1) na štartovú čiaru v koncentračnej zóne TLC platne.

Ak sa to vyžaduje, je možné kvôli uľahčeniu odparovania rozpúšťadla použiť prúd vzduchu. Vezmite TLC platňu z ohrievacej platne a nechajte ju vychladnúť na izbovú teplotu. Preneste 100 ml vyvolávacieho rozpúšťadla (3.19) do vyvolávacej nádoby (4.2).

Rýchlo vložte TLC platňu do nenasytenej komory a vyvolávajte pri izbovej teplote dovtedy, kým sa čelo rozpúšťadla neposunie do vzdialenosti asi 15 cm od štartovej čiary. Vyberte platňu z vyvolávacej nádoby a vysušte ju v prúde horúceho vzduchu pomocou horúcovzdušného sušiča na vlasy.

Preskúmajte platňu v ultrafialovom svetle (4.3) a vyznačte polohu škvŕn. Ohrievajte platňu 30 minút v piecke (4.5) pri teplote 100 °C, čím sa odstráni nadbytočná kyselina octová. Zviditeľnite konzervačné látky na chromatograme pomocou Millonovho činidla (3.10) tak, že ponoríte maliarsky valec (4.7) do činidla a prechádzate ním po TLC platni, kým sa rovnomerne nenavlhčí.

Poznámka: Škvŕny je možné alternatívne zviditeľniť opatrným kvapnutím jednej kvapky Millonovho činidla na každú zo škvŕn vyznačenú v ultrafialovom svetle.

Estery kyseliny 4-hydroxybenzoovej sa javia ako červené škvŕny, 2-fenoxyetanol a 1-fenoxypropan-2-ol ako žlté škvŕny. Zapamätajte si však, že samotná kyselina 4-hydroxybenzoová, ktorá môže byť prítomná vo vzorkách ako konzervačná látka alebo ako produkt rozkladu parabénov, sa tiež môže javiť ako červená škvŕna. Pozri 7.3 a 7.4.

6. Zistenie prítomnosti

Pre každú škvrnu vypočítajte hodnotu R_f . Porovnajte škvrny získané z roztoku vzorky so škvrnami získanými z referenčných roztokov vzhľadom na ich hodnoty R_f , ich správanie v ultrafialovom žiarení a farbu po zviditeľnení. Sformulujte predbežné závery o identite konzervačných látok.

Ak sa ukazuje, že v roztoku sú prítomné parabény, mal by sa vykonať postup HPLC popísaný v oddieli B. Kvôli potvrdeniu prítomnosti 2-fenoxyetanolu, 1-fenoxypropan-2-olu a parabénov spojte výsledky metódy chromatografie v tenkej vrstve (TLC) a metódy výkonnej kvapalinovej chromatografie (HPLC).

7. Poznámky

- 7.1. V dôsledku toxicity Millonovho činidla je najlepšie aplikovať toto činidlo jedným z popísaných postupov. Neodporúča sa rozprašovať ho.
- 7.2. Aj iné zlúčeniny obsahujúce hydroxylové skupiny sa môžu pri reakcii s Millonovým činidlom sfarbovať. Tabuľku farieb a hodnôt R_f získaných TLC postupom pre niektoré konzervačné látky je možné nájsť v publikácii: N. de Kruijf, M. A. H. Rijk, L. A. Pranato-Soetardhi a A. Schouten (1987): Stanovenie obsahu konzervačných látok v kozmetických výrobkoch I: Postup chromatografie v tenkej vrstve pre potreby zistenia prítomnosti konzervačných látok (*Chromatografia - J. Chromatography* 410, 395-411).
- 7.3. Hodnoty R_f uvedené v nasledujúcej tabuľke slúžia ako indikácia hodnôt, ktoré je možné získať:

Zlúčenina	hR_f	Farba
kyselina 4-hydroxybenzoová	11	červená
Metylparabén	12	červená
Etylparabén	17	červená
Propylparabén	21	červená
Butylparabén	26	červená
Benzylparabén	16	červená
2-fenoxyetanol	29	žltá
1-fenoxypropan-2-ol	50	žltá

- 7.4. Medzi kyselinou 4-hydroxybenzoovou a metylparabénom alebo medzi benzylparabénom a etylparabénom nepride k separácii. Prítomnosť týchto zlúčenín by sa mala potvrdiť pomocou metódy HPLC popísanej v oddieli B a porovnaním dôb zadržania získaných zo vzorky s dobami zadržania získanými zo štandardných roztokov.

B. URČENIE OBSAHU**1. Rozsah a oblasť pôsobnosti**

Táto metóda určuje postup stanovenia obsahu 2-fenoxyetanolu, 1-fenoxypropan-2-olu, metyl 4-hydroxybenzoátu, etyl 4-hydroxybenzoátu, propyl 4-hydroxybenzoátu, butyl 4-hydroxybenzoátu a benzyl 4-hydroxybenzoátu v kozmetických výrobkoch.

2. Definícia

Množstvá konzervačných látok stanovené touto metódou sú vyjadrené v hmotnostných percentách.

3. Princíp

Vzorka sa okyslí pridaním kyseliny sírovej a potom sa rozptýli v zmesi etanolu a vody. Po pomalom ohriatí tejto zmesi na teplotu, pri ktorej sa roztopí fáza lipidov, čím sa podporí kvantitatívna extrakcia, sa zmes prefiltruje.

Množstvo konzervačných látok vo filtráte sa stanoví metódou HPLC s obrátenou fázou, pričom ako vnútorný štandardný roztok sa použije izopropyl 4-hydroxybenzoát.

4. Činidlá**4.1. Všeobecne**

Všetky činidlá musia mať analytickú čistotu a podľa potreby musia byť vhodné pre metódu HPLC. Voda musí byť destilovaná, alebo musí mať aspoň rovnakú čistotu.

4.2. Etanol, absolútny**4.3. 2-fenoxyetanol****4.4. 1-fenoxypropan-2-ol**

- 4.5. Metyl 4-hydroxybenzoát (metylparabén)
- 4.6. Etyl 4-hydroxybenzoát (etylparabén)
- 4.7. n-Propyl 4-hydroxybenzoát (propylparabén)
- 4.8. Izopropyl-4-hydroxybenzoát (izopropylparabén)
- 4.9. n-Butyl 4-hydroxybenzoát (butylparabén)
- 4.10. Benzyl 4-hydroxybenzoát (benzylparabén)
- 4.11. Tetrahydrofurán
- 4.12. Metanol
- 4.13. Acetonitril
- 4.14. Roztok kyseliny sírovej $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 2 \text{ mol/l}$
- 4.15. Zmes etanolu a vody
Zmiešajte 9 objemových jednotiek etanolu (4.2) a 1 objemovú jednotku vody.
- 4.16. Vnútorň štandardný roztok
Presne odvážte približne 0,25 g izopropylparabénu (4.8), preneste ho do 500 ml odmernej banky, rozpustite a doplňte do plného objemu zmesou etanolu a vody (4.15).
- 4.17. Mobilná fáza: zmes tetrahydrofuránu, vody, metanolu a acetonitrilu
Zmiešajte 5 objemových jednotiek tetrahydrofuránu, 60 objemových jednotiek vody, 10 objemových jednotiek metanolu a 25 objemových jednotiek acetonitrilu.
- 4.18. Zásobný roztok konzervačnej látky
Presne odvážte približne 0,2 g 2-fenoxyetanolu, 0,2 g 1-fenoxypropán-2-olu, 0,05 g metylparabénu, 0,05 g etylparabénu, 0,05 g propylparabénu, 0,05 g butylparabénu a 0,025 g benzylparabénu v 100 ml odmernej banke, rozpustite a doplňte do plného objemu zmesou etanolu a vody.
Roztok uložený v chladničke zostane ustálený jeden týždeň.
- 4.19. Štandardné roztoky konzervačných látok
Preneste postupne 20,00 ml, 10,00 ml, 5,00 ml, 2,00 ml a 1,00 ml zásobného roztoku (4.18) do 50 ml odmerných baniek. Do každej odmerky pridajte 10,00 ml vnútorného štandardného roztoku (4.16) a 1,0 ml roztoku kyseliny sírovej (4.14) a doplňte do plného objemu zmesou etanolu a vody. Tieto roztoky by mali byť čerstvo pripravené.

5. Prístroje

Normálne laboratórne vybavenie a:

- 5.1. Vodný kúpeľ schopný udržiavať teplotu $60 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.
- 5.2. Výkonný kvapalinový chromatograf s detektorom ultrafialového žiarenia, vlnová dĺžka 280 nm
- 5.3. Analytický stĺpec:
Nerezová oceľ, 25 cm x vnútorný priemer 4,6 mm (alebo 12,5 cm x vnútorný priemer 4,6 mm) plnená Nucleosilom 5C18 alebo ekvivalentnou látkou (pozri 10.1)
- 5.4. 100 ml sklené skúmavky so skrutkovacím viečkom
- 5.5. Varné kamienky, karborundum, veľkosť 2 až 4 mm, alebo ekvivalentné

6. Postup

- 6.1. Príprava vzorky
- 6.1.1. Príprava vzorky bez pridania vnútorného štandardného roztoku

Odvážte približne 1,0 g vzorky v 100 ml skúmavke so skrutkovacím viečkom. Pipetou preneste do skúmavky 1,0 ml roztoku kyseliny sírovej (4.14) a 50,0 ml zmesi etanolu a vody (4.15). Pridajte približne 1 g varných kamienkov (5.5), skúmavku uzavrite a silno traste dovtedy, kým nezískate homogénnu zmes. Traste najmenej minútu. Kvôli uľahčeniu extrakcie konzervačných látok do etanolovej fázy vložte skúmavku asi na päť minút do vodného kúpeľa (5.1) udržiavaného na teplote $60 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Skúmavku rýchlo ochlaďte prúdom studenej vody a extrakt uložte na hodinu do chladničky. Prefiltrujte extrakt cez filtračný papier. Preneste približne 2 ml filtrátu do fľaštičky na vzorky s objemom 5 ml. Uložte extrakt do chladničky a do 24 hodín stanovte obsah metódou HPLC.

6.1.2. Príprava vzorky s pridaním vnútorného štandardného roztoku

Odvážte s presnosťou na tri desatinné miesta $1,0 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$ vzorky v 100 ml skúmavke so skrutkovacím viečkom.

Pipetou preneste do skúmavky 1,0 ml roztoku kyseliny sírovej a 40,0 ml zmesi etanolu a vody. Pridajte približne 1 g varných kamienkov (5.5) a presne 10,00 ml vnútorného štandardného roztoku. Skúmavku uzavrite a silno traste dovtedy, kým nezískate homogénnu zmes. Traste najmenej minútu. Kvôli uľahčeniu extrakcie konzervačných látok do etanolovej fázy vložte skúmavku asi na päť minút do vodného kúpeľa udržiavaného na teplote $60 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Skúmavku rýchlo ochlaďte prúdom studenej vody z vodovodu a extrakt uložte na hodinu do chladničky. Prefiltrujte extrakt cez filtračný papier.

Preneste približne 2 ml filtrátu do fľaštičky na vzorky s objemom 5 ml (testovací roztok). Uložte extrakt do chladničky a do 24 hodín stanovte obsah metódou HPLC.

6.2. Výkonná kvapalinová chromatografia (HPLC)

6.2.1. Chromatografické podmienky

- Mobilná fáza: zmes tetrahydrofuránu, vody, metanolu a acetonitrilu (4.17)
- Prietok: 1,5 ml/minútu
- Detekčná vlnová dĺžka: 280 nm

6.2.2. Kalibrácia

Vstreknite 10 μl každého zo štandardných roztokov konzervačných látok (4.19). Zo získaných chromatogramov stanovte pomery výšok vrcholu od štandardných roztokov konzervačných látok k výške vrcholu od vnútorného štandardného roztoku. Nakreslite krivku každej konzervačnej látky vyjadrujúcu vzťah medzi týmito pomermi a koncentráciami štandardných roztokov.

6.2.3. Stanovenie obsahu

Vstreknite do chromatografu 10 μl roztoku vzorky bez vnútorného štandardného roztoku (6.1.1) a vyhotovte chromatogram.

Vstreknite 10 μl jedného zo štandardných roztokov konzervačných látok (4.19) a vyhotovte chromatogram. Porovnajte obidva získané chromatogramy.

Ak sa na chromatograme extraktu vzorky (6.1.1) nenachádza žiadny vrchol s približne rovnakou dobou zadržania akú má izopropylparabén (odporúčaný vnútorný štandardný roztok), pokračujte a vstreknite 10 μl vzorky roztoku s vnútorným štandardným roztokom (6.1.2). Vyhotovte chromatogram a odmerajte výšky vrcholu.

Ak na chromatograme roztoku vzorky pozorujete rušivý vrchol s približne rovnakou dobou zadržania akú má izopropylparabén, mali by ste vybrať iný vnútorný štandardný roztok.

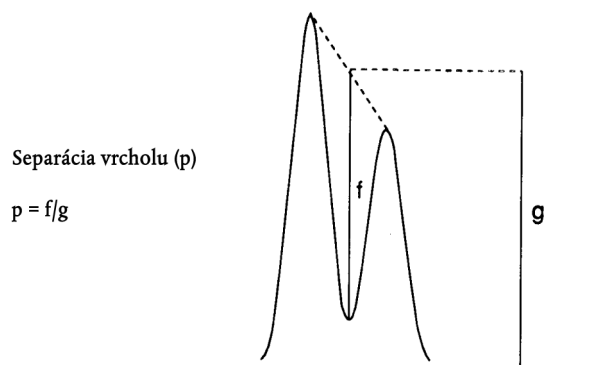
Ak jedna zo skúmaných konzervačných látok chýba v chromatograme vzorky táto konzervačná látka môže byť použitá ako alternatívny štandardný roztok.

Vypočítajte pomery výšok vrcholu od preskúmaných konzervačných látok k výške vrcholu do vnútorného štandardného roztoku.

Presvedčte sa, že pre štandardné roztoky použité počas postupu kalibrácie je odozva lineárna.

Presvedčte sa, či chromatogramy získané pre niektorý štandardný roztok a roztok vzorky spĺňajú tieto požiadavky:

- separácia vrcholu najhoršie separovanej dvojice musí byť najmenej 0,90. (Definícia separácie vrcholu je znázornená na Obrázku 1).



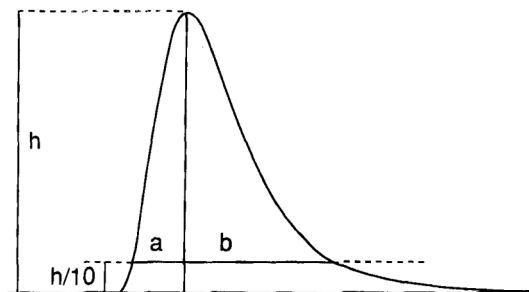
Obrázok 1: Separácia vrcholu

Ak požadovaná separácia nebola dosiahnutá, použije sa citlivejší stĺpec, alebo by sa malo upravovať zloženie mobilnej fázy dovtedy, kým sa táto požiadavka nesplní.

- hodnota faktora asymetrie všetkých získaných vrcholov A_s by mala byť z rozsahu od 0,9 do 1,5. (Definícia faktora asymetrie vrcholu je znázornená na Obrázku 2.) Kvôli vyhotoveniu chromatogramu potrebného na určenie hodnoty faktora asymetrie sa odporúča nastaviť rýchlosť posuvu záznamového papiera najmenej na 2 cm/minútu.

Faktor asymetrie (A_s)

$$A_s = b/a$$



Obrázok 2: Faktor asymetrie vrcholu

- musí sa dosiahnuť stabilná základňa.

7. Výpočet

Na výpočet koncentrácie konzervačných látok v roztoku vzorky použite kalibračnú krivku (6.2.2) a pomery výšok vrcholu od preskúvaných konzervačných látok k výške vrcholu do vnútorného štandardného roztoku. Vypočítajte hodnoty obsahu 2-fenoxyetanolu, 1-fenoxypropan-2-olu, metyl 4-hydroxybenzoátu, etyl 4-hydroxybenzoátu, propyl 4-hydroxybenzoátu, butyl 4-hydroxybenzoátu a benzyl 4-hydroxybenzoátu, w_i , ako hmotnostné percentá (% m/m) pomocou vzorca:

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

kde:

b_i = koncentrácia ($\mu\text{g/ml}$) i -tej konzervačnej látky v testovacom roztoku odčítaná z kalibračnej krivky; a

a = hmotnosť (g) testovacieho roztoku.

8. Opakovateľnosť ⁽¹⁾

Pozri poznámky 10.5.

9. Reprodukovateľnosť ⁽¹⁾

Pozri poznámky 10.5.

10. Poznámky

10.1. Stacionárna fáza

Zadržiavacie správanie roztokov pri stanovovaní obsahu metódou HPLC silne závisí od typu, značky a histórie stacionárnej fázy. Záver o tom, či je možné použiť niektorý stĺpec na separáciu preskúvaných konzervačných látok, možno urobiť na základe výsledkov získaných pre štandardné roztoky (pozri poznámky v 6.2.3). Ukázalo sa, že okrem navrhovaných plniacich materiálov sú vhodné aj Hypersil ODS a Zorbax ODS.

Kvôli dosiahnutiu požadovanej separácie je alternatívne možné optimalizovať odporúčané zloženie mobilnej fázy.

10.2. Detekčná vlnová dĺžka

Test robustnosti popísanej metódy ukázal, že i veľmi malá zmena detekčnej vlnovej dĺžky môže mať významný vplyv na výsledky stanovenia obsahu.

Preto sa tento parameter musí v priebehu analýzy starostlivo kontrolovať.

⁽¹⁾ ISO 5725

10.3. Rušenie

Aj mnohé iné zlúčeniny, ako sú konzervačné látky a kozmetické prísady, sa v podmienkach popísaných v tejto metóde dobre rozpúšťajú. Doby zadržania veľkého počtu konzervačných látok sú uvedené v publikácii: N. de Kruijf, M. A. H. Rijk, L. A. Pranato-Soetardhi a A. Schouten (1989): Stanovenie obsahu konzervačných látok v kozmetických výrobkoch II: Zistenie prítomnosti výkonnou kvapalinovou chromatografiou (*Časopis Chromatografia - J. Chromatography* 469, 317-398).

10.4. Je možné použiť vhodný ochranný stĺpec, ktorý bude prečnievať nad analytickým stĺpcom..

10.5. Táto metóda bola preskúmaná formou spoločne vykonávaných experimentálnych skúšok, na ktorých sa zúčastnilo deväť laboratórií. Boli analyzované tri vzorky. V nasledujúcej tabuľke sú pre každú z troch vzoriek uvedené zistené hodnoty koncentrácie v % m/m (m), opakovateľnosti (r), reprodukovateľnosti (R) pre tie analyzované látky, ktoré tieto vzorky obsahovali:

Vzorka	2-fenoxy-eta-nol		1-fenoxy-pro-pan-2-ol	Metyl- parabén	Etyl-parabén	Propyl-parabén	Butyl-parabén	Benzyl-parabén
Vitamínový krém	m	1,124		0,250	0,0628	0,031	0,0906	
	r	0,016		0,018	0,0035	0,0028	0,0044	
	R	0,176		0,030	0,0068	0,0111	0,0034	
Čistiaci krém	m	1,196		0,266	0,076			
	r	0,040		0,003	0,002			
	R	0,147		0,022	0,004			
Masážny krém	m		0,806			0,180	0,148	0,152
	r		0,067			0,034	0,013	0,015
	R		0,112			0,078	0,012	0,016