

## ΕΒΔΟΜΗ ΟΔΗΓΙΑ 96/45/ΕΚ ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

της 2ας Ιουλίου 1996

σχετικά με τις μεθόδους ανάλυσης που είναι απαραίτητες για τον έλεγχο της σύνθεσης των καλλυντικών προϊόντων

(Κείμενο που παρουσιάζει ενδιαφέρον για τον ΕΟΧ)

Η ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΤΩΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ,

Έχοντας υπόψη:

τη συνθήκη για την ίδρυση της Ευρωπαϊκής Κοινότητας, την οδηγία 76/768/ΕΟΚ του Συμβουλίου, της 27ης Ιουλίου 1976, περί της προσεγγίσεως των νομοθεσιών των κρατών μελών των αναφερομένων στα καλλυντικά προϊόντα<sup>(1)</sup>, όπως τροποποιήθηκε τελευταία από την οδηγία 95/34/ΕΚ της Επιτροπής<sup>(2)</sup>, και ιδίως το άρθρο 8 παράγραφος 1,

Εκτιμώντας:

ότι η οδηγία 76/768/ΕΟΚ προβλέπει επίσημους ελέγχους των καλλυντικών προϊόντων με σκοπό να εξασφαλιστεί η τήρηση των όρων που καθορίζονται από τις κοινοτικές διατάξεις περί συνθέσεως των καλλυντικών προϊόντων

ότι όλες οι αναγκαίες μέθοδοι ανάλυσης πρέπει να καθοριστούν το συντομότερο δυνατόν· ότι έχουν ήδη εγκριθεί ορισμένες μέθοδοι με την οδηγία 80/1335/ΕΟΚ της Επιτροπής<sup>(3)</sup>, όπως τροποποιήθηκε από την οδηγία 87/143/ΕΟΚ<sup>(4)</sup>, με την οδηγία 82/434/ΕΟΚ της Επιτροπής<sup>(5)</sup>, όπως τροποποιήθηκε από την οδηγία 90/207/ΕΟΚ<sup>(6)</sup>, και με τις οδηγίες της Επιτροπής 83/514/ΕΟΚ<sup>(7)</sup>, 85/490/ΕΟΚ<sup>(8)</sup>, 93/73/ΕΟΚ<sup>(9)</sup> και 95/32/ΕΚ<sup>(10)</sup>.

ότι ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός της 2-φαινοξυαιθανόλης, της 1-φαινοξυπροπαν-2-όλης, του 4-υδροξυβενζοϊκού μεθυλεστέρα, του 4-υδροξυβενζοϊκού αιθυλεστέρα, του 4-υδροξυβενζοϊκού προπυλεστέρα, του 4-υδροξυβενζοϊκού βουτυλεστέρα και του 4-υδροξυβενζοϊκού βενζυλεστέρα σε καλλυντικά προϊόντα αποτελούν ένα έβδομο στάδιο·

ότι τα μέτρα που προβλέπονται στην παρούσα οδηγία είναι σύμφωνα με τη γνώμη της επιτροπής για την προσαρμογή στην τεχνική πρόοδο της οδηγίας 76/768/ΕΟΚ,

ΕΞΕΔΩΣΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΟΔΗΓΙΑ:

## Άρθρο 1

Τα κράτη μέλη λαμβάνουν όλα τα αναγκαία μέτρα ώστε να εξασφαλίσουν ότι κατά τον επίσημο έλεγχο των καλλυντι-

κών προϊόντων, ο ποιοτικός και ο ποσοτικός προσδιορισμός της 2-φαινοξυαιθανόλης, της 1-φαινοξυπροπαν-2-όλης, του 4-υδροξυβενζοϊκού μεθυλεστέρα, του 4-υδροξυβενζοϊκού αιθυλεστέρα, του 4-υδροξυβενζοϊκού προπυλεστέρα, του 4-υδροξυβενζοϊκού βουτυλεστέρα και του 4-υδροξυβενζοϊκού βενζυλεστέρα πραγματοποιούνται σύμφωνα με τις μεθόδους που περιγράφονται στο παράρτημα.

## Άρθρο 2

1. Τα κράτη μέλη θέτουν σε ισχύ τις αναγκαίες νομοθετικές, κανονιστικές και διοικητικές διατάξεις για να συμμορφωθούν με την παρούσα οδηγία το αργότερο έως τις 30 Σεπτεμβρίου 1997. Ενημερώνουν αμέσως την Επιτροπή σχετικά.

2. Όταν τα κράτη μέλη θεσπίζουν τις εν λόγω διατάξεις, αυτές περιλαμβάνουν παραπομπή στην παρούσα οδηγία ή συνοδεύονται από τέτοια παραπομπή κατά την επίσημη δημοσίευσή τους. Ο τρόπος της παραπομπής αυτής καθορίζεται από τα κράτη μέλη.

3. Τα κράτη μέλη ανακοινώνουν στην Επιτροπή το κείμενο των διατάξεων εσωτερικού δικαίου τις οποίες θεσπίζουν στον τομέα που διέπεται από την παρούσα οδηγία.

## Άρθρο 3

Η παρούσα οδηγία αρχίζει να ισχύει την 20ή ημέρα από τη δημοσίευσή της στην *Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων*.

## Άρθρο 4

Η παρούσα οδηγία απευθύνεται στα κράτη μέλη.

Βρυξέλλες, 2 Ιουλίου 1996.

Για την Επιτροπή

Emma BONINO

Μέλος της Επιτροπής

(<sup>1</sup>) ΕΕ αριθ. L 262 της 27. 9. 1976, σ. 169.

(<sup>2</sup>) ΕΕ αριθ. L 167 της 18. 7. 1995, σ. 19.

(<sup>3</sup>) ΕΕ αριθ. L 383 της 31. 12. 1980, σ. 27.

(<sup>4</sup>) ΕΕ αριθ. L 57 της 27. 2. 1987, σ. 56.

(<sup>5</sup>) ΕΕ αριθ. L 185 της 30. 6. 1982, σ. 1.

(<sup>6</sup>) ΕΕ αριθ. L 108 της 28. 4. 1990, σ. 92.

(<sup>7</sup>) ΕΕ αριθ. L 291 της 24. 10. 1983, σ. 9.

(<sup>8</sup>) ΕΕ αριθ. L 295 της 7. 11. 1985, σ. 30.

(<sup>9</sup>) ΕΕ αριθ. L 231 της 14. 9. 1993, σ. 34.

(<sup>10</sup>) ΕΕ αριθ. L 178 της 28. 7. 1995, σ. 20.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

**ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ 2-ΦΑΙΝΟΞΥΑΙΘΑΝΟΛΗΣ, ΤΗΣ 1-ΦΑΙΝΟΞΥ-  
ΠΡΟΠΑΝ-2-ΟΛΗΣ ΚΑΙ ΤΩΝ 4-ΥΔΡΟΞΥΒΕΝΖΟΪΚΟΥ ΜΕΘΥΛ-, ΑΙΘΥΛ-, ΠΡΟΠΥΛ-, ΒΟΥΤΥΛ- ΚΑΙ ΒΕΝΖΥΛ-  
ΕΣΤΕΡΩΝ ΣΕ ΚΑΛΛΥΝΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ**

## Α. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

## 1. Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής

Η μέθοδος αυτή περιγράφει τη διαδικασία χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC), η οποία, σε συνδυασμό με τη μέθοδο ποσοτικού προσδιορισμού που περιγράφεται στο κεφάλαιο Β, επιτρέπει την ταυτοποίηση της 2-φαινοξυαιθανόλης, 1-φαινοξυπροπαν-2-όλης και των 4-υδροξυβενζοϊκού μεθυλεστέρα, 4-υδροξυβενζοϊκού αιθυλεστέρα, 4-υδροξυβενζοϊκού προπυλεστέρα, 4-υδροξυβενζοϊκού βουτυλεστέρα και 4-υδροξυβενζοϊκού βενζυλεστέρα σε καλλυντικά προϊόντα.

## 2. Αρχή

Τα συντηρητικά εκχυλίζονται με ακετόνη, σε όξινο περιβάλλον, από το δείγμα καλλυντικού. Μετά από διήθηση, το διάλυμα ακετόνης αναμειγνύεται με νερό και σε αλκαλικό περιβάλλον τα λιπαρά οξέα καθιζάνουν υπό τη μορφή των ασβετούχων αλάτων τους. Το αλκαλικό μείγμα ακετόνης/νερού εκχυλίζεται με διαιθυλαιθέρα για την απομάκρυνση λιπόφιλων ουσιών. Μετά από οξίνιση, τα συντηρητικά εκχυλίζονται με διαιθυλαιθέρα. Μέρος του εκχυλίσματος του διαιθυλαιθέρα τοποθετείται σε πλάκα χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας με υπόστρωμα κολλοειδούς πυριτίου (silica gel). Μετά την ανάπτυξη η πλάκα παρατηρείται σε υπεριώδες φως και η εμφάνιση των κηλίδων γίνεται χρησιμοποιώντας αντιδραστήριο Millon.

## 3. Αντιδραστήρια

## 3.1. Γενικά

Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται πρέπει να είναι αναλυτικής καθαρότητας. Το νερό πρέπει να είναι απεσταγμένο ή ισοδύναμης τουλάχιστον καθαρότητας.

## 3.2. Ακετόνη

## 3.3. Διαιθυλαιθέρας

## 3.4. Κ-πεντάνιο

## 3.5. Μεθανόλη

## 3.6. Κρυσταλλικό οξικό οξύ

3.7. Διάλυμα υδροχλωρικού οξέος,  $c(\text{HCl}) = 4\text{mol/l}$  (4M)3.8. Διάλυμα υδροξειδίου του καλίου,  $c(\text{KOH}) = 4\text{mol/l}$  (4M)3.9. Δισένδρο χλωριούχο ασβέστιο ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )

## 3.10. Αντιδραστήριο εμφάνισης: αντιδραστήριο Millon

Το αντιδραστήριο Millon

[Νιτρικό άλας υδράργυρου (II)] είναι ένα πυκνό πρότυπο διάλυμα που διατίθεται στην αγορά (Fluka 69820)

## 3.11. 2-Φαινοξυαιθανόλη

## 3.12. 1-Φαινοξυπροπαν-2-όλη

## 3.13. 4-υδροξυβενζοϊκός μεθυλεστέρας (methylparaben)

## 3.14. 4-υδροξυβενζοϊκός αιθυλεστέρας (ethylparaben)

## 3.15. 4-υδροξυβενζοϊκός κ-προπυλεστέρας (propylparaben)

## 3.16. 4-υδροξυβενζοϊκός κ-βουτυλεστέρας (butylparaben)

## 3.17. 4-υδροξυβενζοϊκός βενζυλεστέρας (benzylparaben)

## 3.18. Διαλύματα αναφοράς

Παρασκευάζονται διαλύματα συγκεντρώσεως 0,1 % (m/V) καθεμιάς από τις ουσίες αναφοράς 3.11, 3.12, 3.13, 3.14, 3.15, 3.16 και 3.17 σε μεθανόλη.

## 3.19. Διαλύματα ανάπτυξης

Αναμειγνύονται 88 όγκοι κ-πεντανίου με 12 όγκους κρυσταλλικού οξικού οξέος.

#### 4. Εξοπλισμός

Συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός, και

- 4.1. Υδατόλουτρο, θερμορρυθμιζόμενο στους 60 °C
- 4.2. Θάλαμος ανάπτυξης (χωρίς να τοποθετηθεί εσωτερικά διηθητικό χαρτί)
- 4.3. Πηγή υπεριώδους φωτός, 254 nm
- 4.4. Πλάκες λεπτής στιβάδας, 20 cm × 20 cm, πάχος στιβάδος, 0,25 mm silica gel 60 F<sub>254</sub>, με συμπακωμένη ζώνη (Merck, αριθ. 11798, Darmstadt ή ανάλογες).
- 4.5. Πυριαντήριο με θερμοστάτη για θερμοκρασίες μέχρι 105 °C
- 4.6. Στεγνωτήρας μαλλιών θερμού αέρος
- 4.7. Μάλλινος κυλινδρικός χρωστήρας μήκους περίπου 10 cm, εξωτερικής διαμέτρου περίπου 3,5 cm. Το πάχος της στιβάδας μαλλιού πρέπει να είναι 2-3 mm. Ψαλιδίζεται το τρίχωμα του μαλλιού εάν χρειάζεται (Βλέπε σημείωση στο σημείο 5.2).
- 4.8. Γυάλινοι σωλήνες των 50 ml με διωτό πάμα
- 4.9. Ηλεκτρική εστία θέρμανσης, με θερμοστάτη. Θερμοκρασία: περίπου 80 °C. Η θερμή εστία πρέπει να καλύπτεται με δίσκο αλουμινίου 20 cm × 20 cm και πάχος 6 mm, για την ομοιόμορφη διάδοση της θερμότητας.

#### 5. Διαδικασία

##### 5.1. Προετοιμασία δείγματος

Ζυγίζεται περίπου 1 gr δείγματος σε γυάλινο σωλήνα 50 ml με διωτό πάμα. Προστίθενται 4 σταγόνες διαλύματος υδροχλωρικού οξέος (3.7) και 40 ml ακετόνης.

Για έντονα αλκαλικά καλλυντικά προϊόντα, όπως σάπωνες λουτρού, πρέπει να προστίθενται 20 σταγόνες διαλύματος υδροχλωρικού οξέος. Κλείνεται ο σωλήνας, θερμαίνεται ελαφρώς το μείγμα στους 60 °C περίπου για να διευκολυνθεί η εκχύλιση των συντηρητικών στη φάση της ακετόνης και ανακινείται ζωηρά για ένα λεπτό.

Μετράται το pH του διαλύματος με πεχαμετρικό χαρτί και ρυθμίζεται το pH του διαλύματος σε ≤3 με διάλυμα υδροχλωρικού οξέος. Ανακινείται ζωηρά, ξανά επί 1 λεπτό.

Ψύχεται το διάλυμα σε θερμοκρασία δωματίου και διηθείται μέσω διηθητικού χάρτου σε κωνική φιάλη. Μεταφέρονται 20 ml του διηθήματος σε κωνική φιάλη των 200 ml, προστίθενται 60 ml νερού και αναδεύεται η φιάλη. Ρυθμίζεται το pH του μείγματος περίπου στο 10 προσθέτοντας διάλυμα υδροξειδίου του καλίου (3.8) και χρησιμοποιώντας πεχαμετρικό χαρτί.

Προστίθεται 1g δισένδρου χλωριούχου ασβεστίου (3.9) και ανακινείται ζωηρά. Διηθείται το διάλυμα με διηθητικό χαρτί μέσα σε διαχωριστική χοάνη 250 ml που περιέχει 75 ml διαιθυλαιθέρα και ανακινείται ζωηρά επί 1 λεπτό. Αφήνεται το διάλυμα να ηρεμήσει για το διαχωρισμό των φάσεων και μεταγγίζεται η υδατική στιβάδα σε κωνική φιάλη 200 ml. Ρυθμίζεται το pH του διαλύματος περίπου στο 2 με την προσθήκη διαλύματος υδροχλωρικού οξέος, χρησιμοποιώντας πεχαμετρικό χαρτί. Στη συνέχεια, προστίθενται 10 ml διαιθυλαιθέρα και ανακινείται ζωηρά η φιάλη επί 1 λεπτό. Αφήνεται το διάλυμα να ηρεμήσει για το διαχωρισμό των φάσεων και μεταφέρονται περίπου 2 ml της στιβάδας του διαιθυλαιθέρα στον δοκιμαστικό σωλήνα των 5 ml.

##### 5.2. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας

Τοποθετείται η πλάκα χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (4.4) πάνω στη θερμαινόμενη πλάκα αλουμινίου (4.9). Τοποθετούνται 10 ml από κάθε ένα από τα διαλύματα αναφοράς (3.18) και 100 μl του διαλύματος του ή των δειγμάτων (5.1) πάνω στη γραμμή εκκίνησης της συμπακωμένης ζώνης της πλάκας χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας.

Εάν χρειάζεται, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ρεύμα αέρος για να διευκολυνθεί η εξάτμιση του διαλύτη. Απομακρύνεται η πλάκα χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας από τη θερμαινόμενη εστία και αφήνεται να ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου. Μεταφέρονται 100 ml του διαλύτη ανάπτυξης (3.19) στο θάλαμο ανάπτυξης (4.2). Τοποθετείται η πλάκα χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας αμέσως στον μη κορεσμένο θάλαμο και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου το μέτωπο του διαλύτη να διατρέξει περίπου 15 cm από τη γραμμή εκκίνησης. Απομακρύνεται η πλάκα από το θάλαμο ανάπτυξης και ξηραίνεται με ρεύμα θερμού αέρος με τη χρήση στεγνωτήρα μαλλιών θερμού αέρος.

Εξετάζεται η πλάκα σε υπεριώδες φως (4.3) και σημειώνεται η θέση των κηλίδων. Θερμαίνεται η πλάκα επί 30 λεπτά σε πυριαντήριο (4.5) στους 100 °C για την απομάκρυνση του πλεονάζοντος οξικού οξέος. Η εμφάνιση των συντηρητικών στο χρωματογράφημα γίνεται με αντιδραστήριο Millon (3.10), εμβαπτίζοντας τον κυλινδρικό χρωστήρα (4.7) στο αντιδραστήριο και κυλώντας τον επάνω στην πλάκα χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας έτσι ώστε να διαδραχθεί ομοιόμορφα.

**Σημείωση:** Εναλλακτικά, οι κηλίδες είναι δυνατόν να εμφανισθούν με την προσεκτική τοποθέτηση μιας σταγόνας αντιδραστήριου Millon σε κάθε κηλίδα που εντοπίζεται με υπεριώδες φως.

Οι εστέρες του 4-υδροβενζοϊκού οξέος φαίνονται ως κόκκινες κηλίδες, της 2-φαινοξυαιθανόλης και της 1-φαινοξυπροπανόλης-2 ως κίτρινες κηλίδες. Σημειώνεται ωστόσο, ότι το 4-υδροβενζοϊκό οξύ αυτό καθαυτό, το οποίο είναι δυνατόν να υπάρχει στα δείγματα ως συντηρητικό ή ως προϊόν αποσύνθεσης των εστέρων εμφανίζεται επίσης ως κόκκινη κηλίδα. Βλέπε 7.3 και 7.4.

## 6. Ταυτοποίηση

Υπολογίζεται η τιμή  $R_f$  για κάθε κηλίδα. Συγκρίνονται οι κηλίδες που προκύπτουν από το διάλυμα του δείγματος με εκείνες των διαλυμάτων αναφοράς όσον αφορά τις τιμές των  $R_f$  τη συμπεριφορά τους στην υπεριώδη ακτινοβολία και το χρώμα μετά από την εμφάνιση. Εξάγονται προκαταρκτικά συμπεράσματα σχετικά με την ταυτότητα των συντηρητικών.

Εφόσον φαίνεται να υπάρχουν εστέρες του 4-υδροξυβενζοϊκού οξέος χρησιμοποιείται η μέθοδος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) που περιγράφεται στο κεφάλαιο Β. Συνδυάζονται τα αποτελέσματα της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας και της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης για να επιβεβαιωθούν η παρουσία της 2-φαινοξυαιθανόλης, 1-φαινοξυπροπαν-2-όλης, και των εστέρων του 4-υδροξυβενζοϊκού οξέος.

## 7. Παρατηρήσεις

- 7.1. Λόγω της τοξικότητας του αντιδραστηρίου Millon, συνιστάται να χρησιμοποιείται με μία από τις μεθόδους που περιγράφονται. Να αποφεύγεται ο ψεκασμός.
- 7.2. Άλλες ουσίες που περιέχουν ομάδες υδροξυλίου είναι δυνατόν επίσης να δώσουν χρώματα με το αντιδραστήριο Millon. Ο πίνακας των χρωμάτων και των τιμών  $R_f$  που λαμβάνονται για ορισμένα συντηρητικά χρησιμοποιώντας τη μέθοδο χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας ευρίσκεται στο: N. de Kruif, M.A.H. Rijk, L.A. Pranato-Soetardhi and 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. Στον κάτωθι πίνακα αναφέρονται ενδεικτικά οι τιμές  $R_f$  που είναι δυνατόν να ληφθούν:

Συστατικά	$hR_f$	Χρώμα
4-υδροξυβενζοϊκό οξύ	11	κόκκινο
4-υδροξυβενζοϊκός μεθυλεστέρας	12	κόκκινο
4-υδροξυβενζοϊκός αιθυλεστέρας	17	κόκκινο
4-υδροξυβενζοϊκός προπυλεστέρας	21	κόκκινο
4-υδροξυβενζοϊκός βουτυλεστέρας	26	κόκκινο
4-υδροξυβενζοϊκός βενζυλεστέρας	16	κόκκινο
2-φαινοξυαιθανόλη	29	κίτρινο
1-φαινοξυπροπαν-2-όλη	50	κίτρινο

- 7.4. Δεν επιτυγχάνεται διαχωρισμός για 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ και 4-υδροξυβενζοϊκού μεθυλεστέρα ή για 4-υδροξυβενζοϊκού βενζυλεστέρα και 4-υδροξυβενζοϊκού αιθυλεστέρα. Η ταυτοποίηση αυτών των ουσιών πρέπει να επιβεβαιώνεται με την εφαρμογή της μεθόδου υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης που περιγράφεται στο κεφάλαιο Β, συγκρίνοντας τους χρόνους κατακράτησης που λαμβάνονται για το δείγμα με αυτούς των προτύπων.

## B. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

### 1. Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής

Η μέθοδος αυτή αναφέρει τη διαδικασία ποσοτικού προσδιορισμού των 2-φαινοξυαιθανόλης, 1-φαινοξυπροπαν-2-όλης, και του 4-υδροξυβενζοϊκού μεθυλ-, αιθυλ-, προπυλ-, βουτυλ- και βενζυλ-εστέρων σε καλλυντικά προϊόντα.

### 2. Ορισμός

Οι ποσότητες συντηρητικών που προσδιορίζονται με τη μέθοδο αυτή εκφράζονται σε ποσοστό μάζης επί τις εκατό.

### 3. Αρχή

Το δείγμα οξινίζεται με την προσθήκη θεικού οξέος και στη συνέχεια εναιωρείται σε μείγμα αιθανόλης και νερού. Μετά από ελαφρά θέρμανση του μείγματος για τήξη της λιπαρής φάσεως, ώστε η εκχύλιση να είναι πλήρης, το μείγμα διηθείται. Τα συντηρητικά στο διήθημα προσδιορίζεται με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης χρησιμοποιώντας 4-υδροξυβενζοϊκό ισοπροπυλ-εστέρα ως εσωτερικό πρότυπο.

### 4. Αντιδραστήρια

#### 4.1. Γενικά

Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να είναι αναλυτικής καθαρότητας και κατάλληλα για υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, όπου απαιτείται. Το νερό πρέπει να είναι απεσταγμένο, ή νερό ισοδύναμης τουλάχιστον καθαρότητας.

#### 4.2. Απόλυτη αιθανόλη

#### 4.3. 2-Φαινοξυαιθανόλη

#### 4.4. 1-Φαινοξυπροπαν-2-όλη

- 4.5. 4-υδροξυβενζοϊκός μεθυλεστέρας  
4.6. 4-υδροξυβενζοϊκός αιθυλεστέρας  
4.7. 4-υδροξυβενζοϊκός κ-προπυλεστέρας  
4.8. 4-υδροξυβενζοϊκός ισοπροπυλεστέρας  
4.9. 4-υδροξυβενζοϊκός κ-βουτυλεστέρας  
4.10. 4-υδροξυβενζοϊκός βενζυλεστέρας  
4.11. Τετραύδροφουράνιο  
4.12. Μεθανόλη  
4.13. Ακενοτριλίο  
4.14. Διάλυμα θεικού οξέος  $c(\text{H}_2\text{SO}_4)=2\text{mol/l}$  (2M)  
4.15. Μείγμα αιθανόλης/ύδατος  
Αναμειγνύονται 9 όγκοι αιθανόλης (4.2) με 1 όγκο νερού.  
4.16. Διάλυμα εσωτερικού προτύπου  
Ζυγίζονται με ακρίβεια περίπου 0,25 γραμμάρια 4-υδροξυβενζοϊκού ισοπροπυλεστέρα (4.8), μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 500 ml, διαλύονται με μείγμα αιθανόλης/νερού (4.15) και συμπληρώνεται η φιάλη μέχρι τη χαραγή.  
4.17. Κινητή φάση: μείγμα τετραύδροφουράνιου/νερού/μεθανόλης/ακετονιτριλίου  
Αναμειγνύονται 5 όγκοι τετραύδροφουράνιου, 60 όγκοι νερού, 10 όγκοι μεθανόλης και 25 όγκοι ακετονιτριλίου.  
4.18. Μητρικό διάλυμα συντηρητικού  
Ζυγίζονται με ακρίβεια περίπου 0,2 g 2-φαινοξυαιθανόλης, 0,2 g 1-φαινοξυπροπαν-2-όλης, 0,05 g 4-υδροξυμεθυλεστέρα, 0,05 g 4-υδροξυαιθυλεστέρα, 0,05 g 4-υδροξυπροπυλεστέρα, 0,05 g 4-υδροξυβουτυλεστέρα και 0,025 g 4-υδροξυβενζυλεστέρα σε ογκομετρική φιάλη 100 ml, διαλύονται και συμπληρώνεται η φιάλη ως τη χαραγή με μείγμα αιθανόλης/νερού.  
Το διάλυμα διατηρείται στο ψυγείο και είναι σταθερό για μία εβδομάδα.  
4.19. Πρότυπα διαλύματα συντηρητικών  
Από το μητρικό διάλυμα (4.18) λαμβάνονται 20,00 ml, 10,00 ml, 5,00 ml, 2,00 ml και 1,00 ml και φέρονται σε ισόριθμες ογκομετρικές φιάλες των 50 ml. Σε κάθε φιάλη, προστίθενται 10,00 ml διαλύματος εσωτερικού προτύπου (4.16) και 1,0 ml διαλύματος θεικού οξέος (4.14) και συμπληρώνεται η φιάλη ως τη χαραγή με μείγμα αιθανόλης/νερού. Τα διαλύματα αυτά πρέπει να έχουν παρασκευασθεί πρόσφατα.
5. **Εξοπλισμός**  
Συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός, και  
5.1. Υδατόλουτρο, ρυθμιζόμενο στους  $60^\circ\text{C}\pm 1^\circ\text{C}$ .  
5.2. Συσκευή γρήρης χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας, μήκους κύματος 280 nm.  
5.3. Στήλη:  
Από ανοξειδωτο χάλυβα, μήκους 25 ή 12,5 cm, εσωτερικής διαμέτρου 4,6 mm που έχει πληρωθεί με Nucleosil 5C18, ή ανάλογο προσροφητικό υλικό (βλέπε 10.1).  
5.4. Γυάλινοι σωλήνες των 100 ml με διωτό πάμα.  
5.5. Σφαιρίδια θρασμού από ανθρακοπυρίτιο, μεγέθους 2-4 mm, ή ανάλογα.
6. **Διαδικασία**  
6.1. Προετοιμασία δείγματος  
6.1.1. Προετοιμασία δείγματος χωρίς προσθήκη εσωτερικού προτύπου  
Ζυγίζεται περίπου 1,0 g δείγματος σε γυάλινο σωλήνα 100 ml με διωτό πάμα. Στο γυάλινο σωλήνα φέρονται με σιφόνιο 1,0 ml διαλύματος θεικού οξέος (4.14) και 50,0 ml μείγματος αιθανόλης/νερού (4.15).  
Προστίθενται περίπου 1 g σφαιρίδια θρασμού (5.5), κλείνεται ο σωλήνας και ανακινείται ζωρή έως ότου επιτευχθεί ομοιογενές εναιώρημα.  
Ανακινείται τουλάχιστον για 1 λεπτό. Ο σωλήνας τοποθετείται επί 5 λεπτά σε υδατόλουτρο (5.1) που έχει ρυθμισθεί στους  $60^\circ\text{C}\pm 1^\circ\text{C}$  για να διευκολυνθεί η εκχύλιση των συντηρητικών στη φάση της αιθανόλης.  
Ο σωλήνας ψύχεται αμέσως με τρεχούμενο νερό και το εκχύλισμα τοποθετείται στο ψυγείο επί μία ώρα. Ακολουθεί διήθηση του εκχυλίσματος με διηθητικό χαρτί. Περίπου 2 ml του διηθήματος μεταφέρονται σε δοκιμαστικό σωλήνα των 5 ml. Το εκχύλισμα φυλάσσεται στο ψυγείο και πραγματοποιείται ο ποσοτικός προσδιορισμός με γρήγη χρωματογραφία υψηλής απόδοσης εντός 24 ωρών από την παρασκευή του.

## 6.1.2. Προετοιμασία δείγματος με προσθήκη εσωτερικού προτύπου

Ζυγίζονται με ακρίβεια τριών δεκαδικών ψηφίων  $1,0 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$  δείγματος (α gr) σε υάλινο σωλήνα των 100 ml με διωτικό πάμα.

Μεταφέρονται με σιφόνιο 1,0 ml διαλύματος θειικού οξέος και 40,0 ml μείγματος αιθανόλης/νερού στο σωλήνα. Προστίθενται περίπου 1 g σφαιρίδια βρασμού και ακριδώς 10,00 ml εσωτερικού προτύπου διαλύματος. Κλείνεται ο σωλήνας και ανακινείται ζωηρά έως ότου επιτευχθεί ομοιογενές εναιώρημα. Ανακινείται τουλάχιστον για 1 λεπτό. Τοποθετείται ο σωλήνας επί 5 λεπτά σε υδατόλουτρο που έχει ρυθμισθεί στους  $60 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  για τη να διευκόλυνση της εκχύλισης των συντηρητικών στη φάση της αιθανόλης.

Ο σωλήνας ψύχεται αμέσως με τρεχούμενο νερό και το εκχύλισμα φυλάσσεται στο ψυγείο επί μία ώρα. Ακολουθεί διήθηση του εκχυλίσματος με διηθητικό χαρτί.

Περίπου 2 ml του διηθήματος μεταφέρονται σε δοκιμαστικό σωλήνα των 5 ml (συγκριτικό διάλυμα). Το εκχύλισμα φυλάσσεται στο ψυγείο και πραγματοποιείται ο ποσοτικός προσδιορισμός με γρήχη χρωματογραφία υψηλής απόδοσης εντός των επομένων 24 ωρών.

## 6.2. Γρήχη χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

## 6.2.1. Συνθήκες χρωματογραφίας

- Κινητή φάση: μείγμα τετραϋδροφουράνιου/νερού/μεθανόλης/ακετονιτρίλιου (4.17)
- Ταχύτητα ροής: 1,5 ml/λεπτό
- Μήκος κύματος ανίχνευσης: 280 nm

## 6.2.2. Βαθμονόμηση

Εισάγονται (στον υγρό χρωματογράφο) 10 μl από κάθε πρότυπο διάλυμα συντηρητικών (4.19). Από τα λαμβανόμενα χρωματογραφήματα προσδιορίζονται οι λόγοι των υψών των κορυφών που αντιστοιχούν στα πρότυπα διαλύματα των συντηρητικών, προς το ύψος της κορυφής που αντιστοιχεί στο εσωτερικό πρότυπο. Για κάθε συντηρητικό σχεδιάζεται η καμπύλη που παριστά τους λόγους αυτούς συναρτήσει της συγκεντρώσεως κάθε προτύπου διαλύματος.

## 6.2.3. Προσδιορισμός

Εισάγονται στον υγρό χρωματογράφο 10 μl του διαλύματος του δείγματος χωρίς εσωτερικό πρότυπο (6.1.1) και καταγράφεται το χρωματογράφημα.

Εισάγονται 10 μl προτύπου διαλύματος συντηρητικών (4.19) και καταγράφεται το χρωματογράφημα. Συγκρίνονται τα δύο χρωματογραφήματα.

Εάν στο χρωματογράφημα του εκχυλίσματος του δείγματος (6.1.1) δεν εμφανίζεται κορυφή με τον ίδιο περίπου χρόνο κατακράτησης όπως ο 4-υδροξυβενζοϊκός ισοπροπυλεστέρας (το συνιστάμενο εσωτερικό πρότυπο), εισάγονται στον χρωματογράφο 10 μl διαλύματος δείγματος με εσωτερικό πρότυπο (6.1.2). Καταγράφεται το χρωματογράφημα και μετρώνται τα ύψη των κορυφών.

Αν στο χρωματογράφημα του διαλύματος του δείγματος παρεμβάλλεται κορυφή που έχει τον ίδιο περίπου χρόνο κατακράτησης όπως ο 4-υδροξυβενζοϊκός ισοπροπυλεστέρας θα πρέπει να επιλεγεί ένα άλλο εσωτερικό πρότυπο.

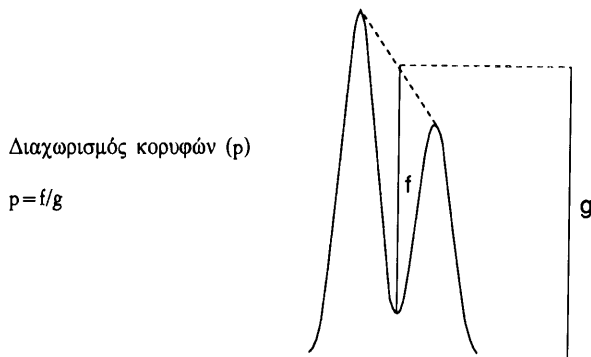
Εάν, κάποιο από τα υπό εξέταση συντηρητικά δεν εμφανίζεται στο χρωματογράφημα του δείγματος, το συντηρητικό αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτικό εσωτερικό πρότυπο.

Υπολογίζονται οι λόγοι των υψών των κορυφών των υπό εξέταση συντηρητικών προς το ύψος της κορυφής του εσωτερικού προτύπου.

Εξακριβώνεται ότι η καμπύλη που λαμβάνεται για τα πρότυπα διαλύματα που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία βαθμονόμησης είναι γραμμική.

Εξακριβώνεται ότι τα χρωματογραφήματα που λαμβάνονται από το πρότυπο διάλυμα και το διάλυμα δείγματος πληρούν τις ακόλουθες απαιτήσεις:

- ο διαχωρισμός των κορυφών προκειμένου για το ζεύγος κορυφών με τον ασαφέστερο διαχωρισμό είναι τουλάχιστον 0,90 (για τον ορισμό του διαχωρισμού των κορυφών, βλέπε σχήμα 1).



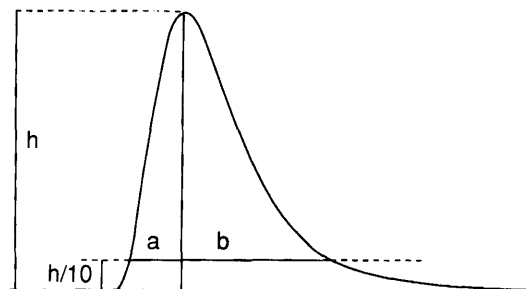
Σχήμα 1: Διαχωρισμός κορυφών

Εάν δεν επιτυγχάνεται ο απαιτούμενος διαχωρισμός, θα πρέπει είτε να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικότερη στήλη είτε να ρυθμιστεί η σύνθεση της κινητής φάσης, έτσι ώστε να ικανοποιείται η απαίτηση.

- ο συντελεστής ασυμμετρίας  $A_s$  για όλες τις λαμβανόμενες κορυφές κυμαίνεται μεταξύ 0,9 και 1,5 (για τον ορισμό του συντελεστή ασυμμετρίας κορυφών, βλέπε σχήμα 2). Κατά την καταγραφή του χρωματογραφήματος για τον προσδιορισμό του συντελεστή ασυμμετρίας, συνιστάται ταχύτητα χαρτιού 2 cm/λεπτό τουλάχιστον.

Συντελεστής ασυμμετρίας ( $A_s$ )

$(A_s) = b/a$



**Σχήμα 2:** Συντελεστής ασυμμετρίας κορυφής

- πρέπει να λαμβάνεται σταθερή γραμμική δάσης.

## 7. Υπολογισμός

Χρησιμοποιείται η καμπύλη βαθμονόμησης (6.2.2) και οι λόγοι των υψών των κορυφών των υπό εξέταση συντηρητικών σε σχέση με το ύψος της κορυφής του εσωτερικού προτύπου για να υπολογισθεί η συγκέντρωση των συντηρητικών στο διάλυμα δείγματος. Υπολογίζονται οι περιεκτικότητες των 2-φαινοξυαιθανόλη, 1-φαινοξυπροπαν-2-όλη, 4-υδροξυδενζοϊκού μεθυλεστέρα, 4-υδροξυδενζοϊκού αιθυλεστέρα, 4-υδροξυδενζοϊκού προπυλεστέρα, 4-υδροξυδενζοϊκού βουτυλεστέρα και 4-υδροξυδενζοϊκού βενζυλεστέρα,  $w_i$ , σε εκατοστιαία αναλογία κατά μάζα (% m/m) χρησιμοποιώντας τον τύπο:

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

όπου:

$b_i$  = η συγκέντρωση (μg/ml) του συντηρητικού  $i$  στο υπό εξέταση διάλυμα όπως προκύπτει από την καμπύλη βαθμονόμησης, και

$a$  = η μάζα (g) του δείγματος δοκιμής (6.1.2).

## 8. Επαναληψιμότητα (1)

Βλέπε παρατηρήσεις 10.5

## 9. Αναπαραγωγιμότητα (1)

Βλέπε παρατηρήσεις 10.5

## 10. Παρατηρήσεις

### 10.1. Στάσιμη φάση

Η συμπεριφορά κατακράτησης των διαλυμένων ουσιών κατά τους ποσοτικούς προσδιορισμούς με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης εξαρτάται από τη μορφή, τον τύπο και το ιστορικό της στάσιμης φάσης. Συμπέρασμα για το κατά πόσον μία στήλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό των υπό εξέταση συντηρητικών, μπορεί να συναχθεί από τα αποτελέσματα που λαμβάνονται κατά την εξέταση των προτύπων διαλυμάτων (βλέπε παρατηρήσεις 6.2.3). Εκτός από το προτεινόμενο υλικό πλήρωσης της στήλης, τα Hypersil ODS και Zorbax ODS κρίθηκαν επίσης κατάλληλα.

Εναλλακτικά, η προτεινόμενη σύνθεση κινητής φάσης μπορεί να τροποποιηθεί με στόχο να ληφθεί ο απαιτούμενος διαχωρισμός.

### 10.2. Μήκος κύματος ανίχνευσης

Η δοκιμή ανθεκτικότητας της περιγραφόμενης μεθόδου έχει δείξει ότι μία μικρή μεταβολή του μήκους κύματος ανίχνευσης μπορεί να έχει σημαντική επίπτωση στα αποτελέσματα του προσδιορισμού.

Ως εκ τούτου, η παράμετρος αυτή πρέπει να ελέγχεται προσεκτικά κατά τη διάρκεια της ανάλυσης.

(1) ISO 5725.

## 10.3. Παρεμβολές

Στις συνθήκες που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο εκλύονται επίσης πολλά άλλα συστατικά, όπως συντηρητικά και πρόσθετα καλλυντικών. Οι χρόνοι κατακράτησης μεγάλου αριθμού συντηρητικών που αναφέρονται στο παράρτημα VI της οδηγίας του Συμβουλίου σχετικά με τα καλλυντικά προϊόντα παρατίθενται στο N. de Kruif, A., Schouten, M.A.H. Rijk και L.A. Pranato-Soetardhi (1989) Determination of preservatives in cosmetic products II. High-performance liquid chromatographic identification (J. Chromatography 469, 317-398).

10.4. Για την προστασία της στήλης μπορεί να χρησιμοποιηθεί κατάλληλη προστήλη.

10.5. Η μέθοδος έχει ερευνηθεί σε διεργαστηριακή δοκιμασία στην οποία συμμετείχαν 9 εργαστήρια. Αναλύθηκαν τρία δείγματα. Στον κάτωθι πίνακα αναφέρονται, για κάθε ένα από τα τρία δείγματα, ο μέσος όρος σε % m/m (m), η επαναληψιμότητα (r) και η αναπαραγωγιμότητα (R), που προσδιορίστηκαν για τις ουσίες που περιέχονταν.

δείγμα		2-φαινο- ξυαιθανόλη	1-φαινο- ξυπροπαν-2-όλη	methylparaben	ethylparaben	propylparaben	butylparaben	benzylparaben
διταμινούχος κρέμα	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	
κρέμα καθαρισμού	m	1,196		0,266	0,076			
	r	0,040		0,003	0,002			
	R	0,147		0,022	0,004			
κρέμα μάλαξης	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