

31996L0045

L 213/8

EUROPOS BENDRIJŲ OFICIALUSIS LEIDINYS

1996 8 22

SEPTINTOJI TARYBOS DIREKTYVA 96/45/EB

1996 m. liepos 2 d.

susijusi su analizės metodais, kurie yra būtini kosmetikos gaminių sudėčiai tikrinti

(tekstas svarbus EEE)

EUROPOS BENDRIJŲ KOMISIJA,

atsižvelgdama į Europos Bendrijos steigimo sutartį,

atsižvelgdama į 1976 m. liepos 27 d. Tarybos direktyvą 76/768/EEB dėl valstybių narių teisės aktų, susijusių su kosmetikos gaminiiais, suderinimo ⁽¹⁾, su paskutiniais pakeitimais, padarytais Komisijos direktyva 95/34/EB ⁽²⁾, ypač į jos 8 straipsnio 1 dalį,

kadangi Direktyvoje 76/768/EEB numatyta oficialiai tirti kosmetikos gaminius, užtikrinant, kad bus laikomasi sąlygų, kurios nustatytos Bendrijos nuostatose dėl kosmetikos gaminių sudėties;

kadangi visi reikalingi analizės metodai turėtų būti kaip galima greičiau parengti; kadangi tam tikri metodai jau buvo priimti Komisijos direktyvoje 80/1335/EEB ⁽³⁾ su paskutiniais pakeitimais, padarytais Direktyva 87/143/EEB ⁽⁴⁾, Komisijos direktyvoje 82/434/EEB ⁽⁵⁾ su paskutiniais pakeitimais, padarytais Direktyva 90/207/EEB ⁽⁶⁾, ir Komisijos direktyvomis 83/514/EEB ⁽⁷⁾, 85/490/EEB ⁽⁸⁾, 93/73/EEB ⁽⁹⁾ ir 95/32/EB ⁽¹⁰⁾;

kadangi 2-fenoksietanolio, 1-fenoksipropan-2-olio, metil-, etil-, propil-, butil- ir benzil-4-hidroksibenzoato atpažinimas ir kiekio nustatymas kosmetikos gaminiuose sudaro septintąjį žingsnį;

kadangi šioje direktyvoje nustatytos priemonės atitinka Direktyvos 76/768/EEB derinimo su technikos pažanga komiteto nuomonę,

PRIĖMĖ ŠIĄ DIREKTYVĄ:

1 straipsnis

Valstybės narės imasi būtinų priemonių užtikrinti, kad oficialiai tiriant kosmetikos gaminius 2-fenoksietanolio, 1-fenoksipropan-

2-olio, metil-, etil-, propil-, butil- ir benzil-4-hidroksibenzoato atpažinimas ir kiekio nustatymas būtų atliekami taikant priede aprašytus metodus.

2 straipsnis

1. Valstybės narės priima įstatymus ir kitus teisės aktus, kurie, įsigalioję ne vėliau kaip iki 1997 m. rugsėjo 30 d., įgyvendina šią direktyvą. Apie tai jos nedelsdamos praneša Komisijai.

2. Valstybės narės, priimdamos šias nuostatas, daro jose nuorodą į šią direktyvą arba tokia nuoroda daroma jas yra oficialiai skelbiant. Nuorodos darymo tvarką nustato valstybės narės.

3. Valstybės narės pateikia Komisijai šios direktyvos taikymo srityje priimtų nacionalinės teisės aktų nuostatų tekstus.

3 straipsnis

Ši direktyva įsigalioja dvidešimtą dieną po jos paskelbimo *Europos Bendrijų oficialiajame leidinyje*.

4 straipsnis

Ši direktyva skirta valstybėms narėms.

Priimta Briuselyje, 1996 m. liepos 2 d.

Komisijos vardu

Emma BONINO

Komisijos narys

⁽¹⁾ OL L 262, 1976 9 27, p. 169.

⁽²⁾ OL L 167, 1995 7 18, p. 19.

⁽³⁾ OL L 383, 1980 12 31, p. 27.

⁽⁴⁾ OL L 57, 1987 2 27, p. 56.

⁽⁵⁾ OL L 185, 1982 6 30, p. 1.

⁽⁶⁾ OL L 108, 1990 4 28, p. 92.

⁽⁷⁾ OL L 291, 1983 10 24, p. 9.

⁽⁸⁾ OL L 295, 1985 11 7, p. 30.

⁽⁹⁾ OL L 231, 1993 9 14, p. 34.

⁽¹⁰⁾ OL L 178, 1995 7 28, p. 20.

PRIEDAS

2-FENOKSIETANOLIO, 1-FENOKSIPROPAN-2-OLIO, METIL-, ETIL-, PROPIL-, BUTIL- IR BENZIL-4-HIDROKSIBENZOATO ATPAŽINIMAS IR KIEKIO NUSTATYMAS KOSMETIKOS GAMINIUOSE**A. ATPAŽINIMAS****1. Apimtis ir taikymo sritis**

Čia apibrėžtu plonasluoksnės chromatografijos (TLC) metodu kartu su B skirsnyje aprašytu kiekio nustatymo metodu galima atpažinti 2-fenoksietanolį, 1-fenoksipropan-2-olį, metil-4-hidroksibenzoatą, etil-4-hidroksibenzoatą, propil-4-hidroksibenzoatą, butil-4-hidroksibenzoatą ir benzil-4-hidroksibenzoatą kosmetikos gaminiuose.

2. Metodo esmė

Iš parūgštinto kosmetikos bandinio konservantai ekstrahuojami acetonu. Po filtravimo acetono tirpalas yra maišomas su vandeniu ir šarminėje terpėje riebalų rūgštys nusodinamos kalcio druskų pavidalu. Šarminis acetono ir vandens mišinys ekstrahuojamas dietileteriu, kad būtų pašalintos lipofilinės medžiagos. Parūgštintus konservantai ekstrahuojami dietileteriu. Ant silikageliu dengtos plonasluoksnės plokštelės užlašinama alikvotinė dietileterinio ekstrakto dalis. Plokštelę išryškinus, gauta chromatograma stebima UV šviesoje ir vizualizuojama naudojant Millono reagentą.

3. Reagentai**3.1. Bendroji dalis**

Turi būti naudojami analiziškai grynai reagentai. Vanduo turi būti naudojamas distiliuotas arba lygiavercio grynumo.

3.2. Acetonas**3.3. Dietileteris****3.4. n-pentanas****3.5. Metanolis****3.6. Acto rūgštis, ledinė****3.7. Vandenilio chlorido tirpalas, $c(\text{HCl}) = 4 \text{ mol/l}$** **3.8. Kalio hidroksido tirpalas, $c(\text{KOH}) = 4 \text{ mol/l}$** **3.9. Kalcio chlorido dihidratas ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)****3.10. Vizualizavimo reagentas: Millono reagentas**

Millono reagentas (gyvsidabrio (II) nitratas) yra visiškai paruoštas tirpalas, kurį galima įsigyti prekyboje (*Fluka* 69820).

3.11. 2-fenoksietanolis**3.12. 2-fenoksipropan-2-olis****3.13. Metil-4-hidroksibenzoatas (metilparabenas)****3.14. Etil-4-hidroksibenzoatas (etilparabenas)****3.15. n-propil-4-hidroksibenzoatas (propilparabenas)****3.16. n-butil-4-hidroksibenzoatas (butilparabenas)****3.17. Benzil-4-hidroksibenzoatas (benzilparabenas)****3.18. Etaloniniai tirpalai**

Paruošiami kiekvienos etaloninės medžiagos 3.11, 3.12, 3.13, 3.14, 3.15, 3.16 ir 3.17 0,1 % (m/t) tirpalai metanolyje.

3.19. Judančiosios fazės tirpiklis

Sumaišomos 88 tūrio dalys n-pentano (3.4) su 12 tūrio dalių ledinės acto rūgšties (3.6).

4. Priemonės

Įprasta laboratorinė įranga ir:

- 4.1. vandens vonia, kurioje palaikoma 60 °C temperatūra
- 4.2. ryškinimo kamera (be filtravimo popieriaus)
- 4.3. ultravioletinės šviesos šaltinis, 254 nm
- 4.4. plonasluoksnės plokštelės, 20 cm x 20 cm, iš anksto padengtos 0,25 mm silikagelio 60F₂₅₄ sluoksniu, su koncentravimo zona (Merk Nr. 11798, Darmstadt arba atitinkmuo)
- 4.5. džiovavimo spinta, palaikanti iki 105 °C temperatūrą
- 4.6. karšto oro plaukų džiovintuvas
- 4.7. vilnonis dažų volelis, apytikriai 10 cm ilgio ir 3,5 cm išorinio skersmens. Vilnos sluoksnio storis 2–3 mm. Jeigu reikia, vilnos sluoksnis apkarpos.

Žr. 5.2 punkto pastabą

- 4.8. 50 ml stiklo mėgintuvėliai su užsukamu dangteliu
- 4.9. elektrinė kaitinamoji plokštė su termostatinu regulatoriumi. Temperatūra nustatoma apie 80 °C. Kad vienodai pasiskirstytų šiluma, kaitinamoji plokštė uždengiama 20 cm x 20 cm dydžio, apie 6 mm storio aliuminio plokšte.

5. Darbo eiga

5.1. Mėginio paruošimas

50 ml stiklo mėgintuvėlyje su užsukamu dangteliu (4.8) pasverama apie 1 g bandinio. Įlašinami keturi lašai vandenilio chlorido tirpalo (3.7) ir įpilama 40 ml acetono.

Didelio šarmingumo kosmetikos gaminiais, pavyzdžiui, tualetiniam muilui, įlašinama 20 lašų vandenilio chlorido tirpalo. Mėgintuvėlis uždaromas, mišinys atsargiai kaitinamas iki apytikriai 60 °C, kad konservantai lengviau ekstrahuotųsi į acetono fazę, po to smarkiai kratomas vieną minutę.

Tirpalo pH matuojamas indikatoriniu popieriumi, tirpalo pH nustatomas 3, lašinant vandenilio chlorido tirpalą. Dar vieną minutę smarkiai kratoma.

Tirpalas atvėsina iki kambario temperatūros ir filtruojamas per filtravimo popierių į kūginę kolbą. Į 200 ml kūginę kolbą įpilama 20 ml filtrato, 60 ml vandens ir išmaišoma. Lašinant kalio hidroksido tirpalą (3.8), mišinio pH nustatomas apie 10, tikrinama pH indikatoriniu popieriumi.

Įdedama 1 g kalcio chlorido dihidrato (3.9) ir smarkiai kratoma. Tirpalas filtruojamas per filtravimo popierių į 250 ml dalijamąjį piltuvą, kuriame yra 75 ml dietileterio, ir smarkiai kratoma vieną minutę. Leidžiama fazėms atsiskirti, vandeninis sluoksnis surenkamas į 200 ml kūginę kolbą. Lašinant vandenilio chlorido tirpalą, tirpalo pH nustatomas apytikriai ties 2, tikrinama pH indikatoriniu popieriumi. Po to įpilama 10 ml dietileterio ir stipriai 1 minutę purtoma. Leidžiama fazėms atsiskirti ir apie 2 ml dietileterio sluoksnio įpilama į 5 ml mėginio buteliuką.

5.2. Plonasluoksnė chromatografija (TLC)

Plonasluoksnės chromatografijos plokštelė (4.4) dedama ant įkaitintos aliuminio plokštės (4.9). Užlašinama po 10 µl kiekvieno etaloninio tirpalo (3.18) ir 100 µl mėginio tirpalo (-ų) (5.1) ant TLC plokštelės koncentracijos zonos pradinės linijos.

Jeigu norima, gali būti naudojama oro srovė, kad būtų lengviau išgarinti tirpiklį. TLC plokštelė nukeliama nuo elektrinės kaitinamosios plokštės ir atvėsina iki kambario temperatūros. Į ryškinimo kamerą (4.2) įpilama 100 ml judančiosios fazės tirpiklio (3.19).

Plokštelė nedelsiant dedama į neprisotintą kamerą ir ryškinama kambario temperatūroje, kol tirpiklio frontas nuo pagrindinės linijos pasislinks 15 cm. Plokštelė išimama iš ryškinimo kameros ir džiovinama plaukų džiovintuvu karšto oro srove.

Plokštelė apžiūrima UV šviesoje (4.3) ir pažymimos dėmių vietos. Plokštelė 30 minučių kaitinama džiovavimo spintoje (4.5) 100 °C temperatūroje, siekiant pašalinti acto rūgšties perteklių. Chromatogramoje konservantai vizualizuojami Millono reagentu (3.10), panardinant dažų volelį (4.7) į reagentą ir traukiant jį per plonasluoksnės chromatografijos plokštelę, kol ji vienodai sudrėks.

Pastaba: dėmės taip pat gali būti vizualizuojamos atsargiai užlašinant vieną lašą Millono reagento ant kiekvienos dėmės, išryškėjusios UV šviesoje.

4-hidroksibenzenkarboksirūgšties esteriai išryškėja raudonomis dėmėmis, 2-fenoksietanolis ir 1-fenoksipropan-2-olis – geltonomis dėmėmis. Tačiau būtina atkreipti dėmesį į tai, kad pati 4-hidroksibenzenkarboksirūgštis, kuri gali būti bandiniuose, kaip konservantas arba parabenų skilimo produktas, taip pat išryškėja raudona dėme. Žr. 7.3 ir 7.4 punktus.

6. Atpažinimas

Apskaičiuojamos kiekvienos dėmės R_f vertės. Mėginio tirpalo dėmės palyginamos su etaloninių tirpalų dėmėmis, lyginant jų R_f vertes, jų charakteristikas UV spinduliuotėje ir spalvą po vizualizavimo. Daromos preliminaros išvados apie konservantų tapatumą.

Jeigu išaiškėja, kad parabenų yra, turi būti atliekama B skirsnyje aprašyta HPLC. Remiantis plonasluoksnės chromatografijos ir didelio slėgio skysčių chromatografijos rezultatais, patvirtinamas 2-fenoksietanolio, 1-fenoksipropan-2-olio ir parabenų buvimas.

7. Pastabos

- 7.1. Kadangi Millono reagentas yra toksiškas, jį geriausia naudoti vienu iš aprašytų būdų. Nerekomenduojama purkšti.
- 7.2. Kiti junginiai, kuriuose yra hidroksilo grupės, Millono reagento paveikti, taip pat gali keisti spalvą. Spalvų ir R_f verčių, gautų tam tikriems konservantams naudojant šią plonasluoksnės chromatografijos darbo eigą, lentelę galima rasti leidinyje: N. de Kruijf, M. A. H. Rijk, L. A. Pranato-Soetardhi ir 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. Toliau pateiktoje lentelėje išvardytos R_f vertės naudojamos kaip nuoroda į vertes, kurias galima gauti:

Junginys	hR_f	Spalva
4-hidroksibenzenkarboksirūgštis	11	Raudona
metilparabenas	12	Raudona
etilparabenas	17	Raudona
propilparabenas	21	Raudona
butilparabenas	26	Raudona
benzilparabenas	16	Raudona
2-fenoksietanolis	29	Geltona
1-fenoksipropan-2-olis	50	Geltona

- 7.4. 4-hidroksibenzenkarboksirūgštis ir metilparabenas arba benzilparabenas ir etilparabenas neatskiriami. Šių junginių atpažinimas turi būti patvirtinamas didelio slėgio skysčių chromatografijos (HPLC) metodu, aprašytu B skirsnyje, bei bandinio sulaikymo trukmės palyginant su etaloninių medžiagų sulaikymo trukmėmis.

B. KIEKIO NUSTATYMAS

1. Apimtis ir taikymo sritis

Šiuo metodu nustatomas 2-fenoksietanolio, 1-fenoksipropan-2-olio, metil-4-hidroksibenzoato, etil-4-hidroksibenzoato, propil-4-hidroksibenzoato, butil-4-hidroksibenzoato ir benzil 4-hidroksibenzoato kiekis kosmetikos gaminiuose.

2. Apibrėžimas

Šiuo metodu nustatytų konservantų kiekiai išreiškiami masės procentais.

3. Metodo esmė

Bandinys parūgštinamas sieros rūgštimi ir po to suspenduojamas etanolio ir vandens mišinyje. Mišinys šiek tiek pakaitinamas, kad ištirptų lipidų fazė ir vyktų kiekybinis ekstrahavimas, po to mišinys filtruojamas.

Konservantai, esantys filtrate, nustatomi atvirkštinių fazių didelio slėgio skysčių chromatografijos (HPLC) metodu, vidiniu etalonu naudojant izopropil-4-hidroksibenzoatą.

4. Reagentai

4.1. Bendroji dalis

Turi būti naudojami analiziškai grynai reagentai ir jie turi būti tinkami didelio slėgio skysčių chromatografijai. Vanduo turi būti naudojamas distiliuotas arba lygiavertis grynumo.

4.2. Etanolis, absoliutusias

4.3. 2-fenoksietanolis

4.4. 1-fenoksipropan-2-olis

- 4.5. Metil-4-hidroksibenzoatas (metilparabenas)
- 4.6. Etil-4-hidroksibenzoatas (etilparabenas)
- 4.7. n-propil-4-hidroksibenzoatas (propilparabenas)
- 4.8. Izopropil-4-hidroksibenzoatas (izopropilparabenas)
- 4.9. n-butil - 4-hidroksibenzoatas (butilparabenas)
- 4.10. Benzil-4-hidroksibenzoatas (benzilparabenas)
- 4.11. Tetrahidrofuranas
- 4.12. Metanolis
- 4.13. Acetonitrilas
- 4.14. Sieros rūgšties tirpalas $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 2 \text{ mol/l}$
- 4.15. Etanolio ir vandens mišinys
- Sumaišomos devynios tūrio dalys etanolio (4.2) ir viena tūrio dalis vandens.
- 4.16. Vidinis etaloninis tirpalas
- Tiksliai pasveriami apie 0,25 g izopropilparabeno (4.8), perpilama į 500 ml matavimo kolbą, ištirpinama ir praskiedžiama iki žymės etanolio ir vandens mišiniu (4.15).
- 4.17. Judančiosios fazės tirpiklis: tetrahidrofurano, vandens, metanolio, acetonitrilo mišinys
- Sumaišomos 5 tūrio dalys tetrahidrofurano, 60 tūrio dalių vandens, 10 tūrio dalių metanolio ir 25 tūrio dalys acetonitrilo.
- 4.18. Pradinis konservanto tirpalas
- 100 ml matavimo kolboje tiksliai pasveriami apie 0,2 g 2-fenoksietanolio, 0,2 g 1-fenoksipropan-2-olio, 0,05 g metilparabeno, 0,05 g etilparabeno, 0,05 g propilparabeno, 0,05 g butilparabeno ir 0,025 g benzilparabeno, ištirpinama etanolio ir vandens mišinyje ir skiedžiama juo iki žymės.
- Tirpalas, laikomas šaldytuve, yra patvarus vieną savaitę.
- 4.19. Etaloniniai konservanto tirpalai
- Į 50 ml matavimo kolbas įpilama 20,00 ml, 10,00 ml, 5,00 ml, 2,00 ml ir 1,00 ml pradinio tirpalo (4.18). Į kiekvieną kolbą įpilama 10,00 ml vidinio etaloninio tirpalo (4.16) ir 1,0 ml sieros rūgšties tirpalo (4.14), pripilama iki žymės etanolio ir vandens mišinio. Šie tirpalai turėtų būti paruošti prieš pat naudojimą.
5. **Priemonės**
- Įprasta laboratorinė įranga ir:
- 5.1. vandens vonia, kurioje palaikoma $60 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ temperatūra
- 5.2. didelio slėgio skysčių chromtografas su UV detektoriumi, bangos ilgis – 280 nm
- 5.3. analizinė kolonėlė:
- nerūdijančio plieno, vidinis skersmuo 25 cm x 4,6 mm (arba 12,5 cm x 4,6 mm), įkrauta *Nucleosil 5C18* arba jo atitikmeniu (žr. 10.1 punktą)
- 5.4. 100 ml stiklo mėgintuvėliai su užsukamais dangteliais
- 5.5. netolygų kunkuliavimą slopinančios granulės, karborundas, 2–4 mm dydžio, arba jo atitikmuo
6. **Darbo eiga**
- 6.1. Mėginio paruošimas
- 6.1.1. Mėginio paruošimas, nepriedant vidinio etaloninio tirpalo
- 100 ml stiklo mėgintuvėlyje su užsukamu dangteliu pasveriami apie 1,0 g bandinio. Pipete įpilama 1,0 ml sieros rūgšties tirpalo (4.14) ir 50,0 ml etanolio ir vandens mišinio (4.15). Pridedama apie 1 g netolygų kunkuliavimą slopinančių granulių (5.5), mėgintuvėlis uždaromas ir smarkiai kratomas, kol bus gauta vienalytė suspensija. Kratoma ne trumpiau kaip vieną minutę. Mėgintuvėlis penkioms minutėms dedamas į $60 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ temperatūros vandens vonią (5.1), kad konservantai lengviau ekstrahuotųsi į etanolio fazę.
- Mėgintuvėlis nedelsiant atvėsinaamas šalto vandens srovėje, ekstraktas laikomas šaldytuve vieną valandą. Ekstraktas filtruojamas per filtravimo popierių. Į 5 ml mėginio buteliuką įpilama apie 2 ml filtrato. Ekstraktai laikomi šaldytuve, HPLC metodu analizuojama per 24 valandas.

6.1.2. Mėginio paruošimas, pridedant vidinio etaloninio tirpalo

100 ml stiklo mėgintuvėlyje su užsukamu dangteliu vienos tūkstantosios gramų dalies tikslumu pasverama $1,0 \pm 0,1$ g bandinio.

Į mėgintuvėlį pipete įpilama 1,0 ml sieros rūgšties tirpalo ir 40,0 ml etanolio ir vandens mišinio. Pridedama apie 1 g netolygų kunkuliavimą slopinančių granulių (5.5) ir įpilama lygiai 10,00 ml vidinio etaloninio tirpalo. Mėgintuvėlis uždaromas ir smarkiai kratomas, kol bus gauta vienalytė suspensija. Kratoma ne trumpiau kaip vieną minutę. Mėgintuvėlis penkioms minutėms dedamas į $60 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūros vandens vonią, kad konservantai lengviau ekstrahuotųsi į etanolio fazę.

Mėgintuvėlis nedelsiant atvėsinaamas šalto vandens srovėje, ekstraktas laikomas šaldytuve vieną valandą. Ekstraktas filtruojamas per filtravimo popierių.

Į 5 ml mėginio buteliuką įpilama apie 2 ml filtrato (mėginio tirpalas). Ekstraktas laikomas šaldytuve. Didelio slėgio skysčių chromatografinis nustatymas atliekamas 24 valandų laikotarpiu.

6.2. Didelio slėgio skysčių chromatografija (HPLC)

6.2.1. Chromatografijos sąlygos

- Judančiosios fazės tirpiklis: tetrahidrofurano, vandens, metanolio, acetonitrilo mišinys (4.17)
- Srauto greitis: 1,5 ml/min.
- Aptikimo bangos ilgis: 280 nm

6.2.2. Kalibravimas

Išvirkščiama po 10 μl kiekvieno etaloninio konservanto tirpalo (4.19). Iš gautų chromatogramų nustatomi etaloninių konservantų tirpalų smailių aukščių ir vidinio etaloninio tirpalo smailės aukščio santykiai. Kiekvienam konservantui brėžiama šių santykių priklausomybės nuo etaloninių tirpalų koncentracijų kreivė.

6.2.3. Kiekio nustatymas

Į chromatografą išvirkščiama 10 μl mėginio tirpalo be vidinio etaloninio tirpalo (6.1.1) ir užrašoma chromatograma.

Išvirkščiama 10 μl vieno iš etaloninių konservantų tirpalų (4.19) ir užrašoma chromatograma. Gautos chromatogramos palyginamos.

Jeigu bandinio ekstrakto (6.1.1) chromatogramoje nėra smailės, turinčios beveik tokią pačią sulaikymo trukmę kaip izopropilparabeno (rekomenduojamosios vidinės etaloninės medžiagos), po to išvirkščiama 10 μl mėginio tirpalo su vidine etalonine medžiaga (6.1.2). Užrašoma chromatograma ir matuojami smailių aukščiai.

Jeigu bandinio tirpalo chromatogramoje matoma trukdžių smailė, kurios sulaikymo trukmė beveik tokia pati kaip izopropilparabeno, turi būti parenkama kita vidinė etaloninė medžiaga.

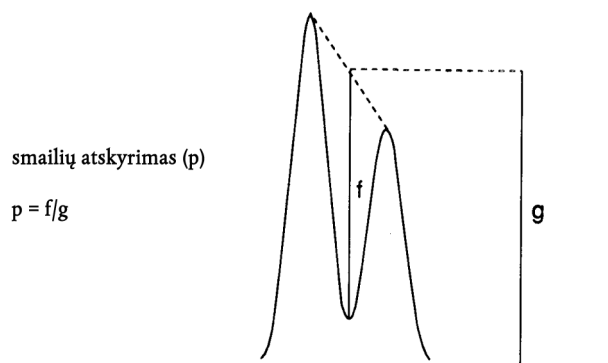
Jeigu mėginio chromatogramoje nėra vieno iš tiriamųjų konservantų, šį konservantą galima naudoti pakaitine vidine etalonine medžiaga.

Apskaičiuojamas tiriamųjų konservantų smailių aukščių ir vidinės etaloninės medžiagos smailės aukščio santykis.

Išitikinama, kad etaloniniams tirpalams, naudotiems kalibravimui, yra gauta tiesinė priklausomybė.

Išitikinama, ar gautos etaloninio tirpalo ir bandinio tirpalo chromatogramos atitinka šiuos reikalavimus:

- mažiausiai atskirtos poros smailių atskyrimas yra ne mažesnis kaip 0,90. (Smailių atskyrimas nustatomas taip, kaip parodyta 1 pav.)

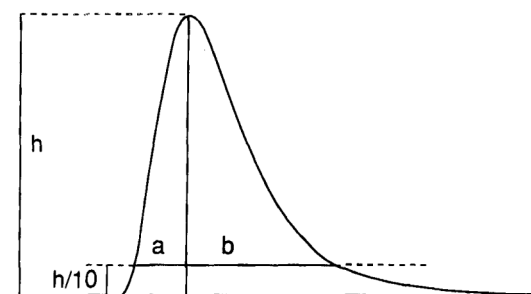


Jeigu negauta reikalingo smailių atskyrimo, turėtų būti naudojama arba labiau tinkanti kolonėlė, arba judančiosios fazės tirpalo sudėtis turėtų būti derinama, kol atitiks reikalavimus.

- Visų gautų smailių asimetrijos koeficientas A_s turi svyruoti tarp 0,9 ir 1,5. (Smailių asimetrijos koeficientas nustatomas taip, kaip parodyta 2 pav.) Rekomenduojama, kad savirašio greitis užrašant asimetrijos koeficiento nustatymo chromatogramą, būtų ne mažesnis kaip 2 cm/min.

Asimetrijos
koeficientas (A_s)

$$A_s = b/a$$



2 pav. Smailių asimetrijos koeficientas

- Turi būti gaunama nekintama pagrindinė linija.

7. Apskaičiavimas

Kalibracinė kreivė (6.2.2) ir tiriamųjų konservantų smailių aukščių ir vidinės etaloninės medžiagos smailės aukščio santykiai tirpalo yra naudojami konservantų koncentracijoms bandinio tirpale apskaičiuoti. 2-fenoksietanolio, 1-fenoksipropan-2-olio, metil-4-hidroksibenzoato, etil-4-hidroksibenzoato, propil-4-hidroksibenzoato, butil-4-hidroksibenzoato ir benzil-4-hidroksibenzoato kiekiai w_i bandinyje apskaičiuojami masės procentais (% m/m) pagal formulę:

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

čia:

b_i – konservanto i koncentracija mėginio tirpale, gauta iš kalibracinės kreivės (μg/ml);

a – mėginio masė (g).

8. Pasikartojamumas ⁽¹⁾

Žr. pastabas 10.5 punkte.

9. Rezultatų atitikimas ⁽¹⁾

Žr. pastabas 10.5 punkte.

10. Pastabos

10.1. Nuostovioji fazė

Tirpinių sulaikymo charakteristika vykdant didelio slėgio skysčių chromatografiją (HPLC) priklauso nuo nuostoviosios fazės tipo, klasės ir kitimo laike. Ar kolonėlė gali būti naudojama tiriamųjų konservantų atskyrimui, gali būti sprendžiama remiantis duomenimis, gautais etaloniniams tirpalams (žr. 6.2.3 punkto aprašymą). Nustatyta, kad kolonėlei tinka naudoti ne tik pasiūlytą įkrovos medžiagą, bet ir *Hypersil ODS* ir *Zorbax ODS*.

Norint gauti reikalingą atskyrimą, gali būti optimizuojama judančiosios fazės tirpalo sudėtis.

10.2. Aptikimo bangos ilgis

Aprašyto metodo rezultatų pastovumo tyrimo rezultatai parodė, kad nedidelis aptikimo bangos ilgio pakeitimas gali turėti didelės įtakos nustatymo rezultatams.

Todėl analizės metu šis parametras turi būti atidžiai kontroliuojamas.

⁽¹⁾ ISO 5725.

10.3. Trukdžiai

Esant šiame metode apibūdintoms sąlygoms, dauguma kitų sudedamųjų dalių, pavyzdžiui, konservantai ir kosmetiniai priedai, taip pat yra išplaunami. Daugumos konservantų, paminėtų Tarybos direktyvos, susijusios su kosmetikos gaminiais, VI priede, sulaikymo trukmės yra išvardytos leidinyje: N. de Kruijf, M. A. H. Rijk, L. A. Pranato-Soetardhi ir A. Schouten (1989): *Determination of preservatives in cosmetic products II. High performance liquid chromatographic identification* (J. Chromatography 469, 317–398).

10.4. Numatant analizinę kolonėlę, gali būti numatyta ir tinkama apsauginė kolonėlė.

10.5. Šis metodas buvo nagrinėjamas bendrame bandyme, kuriame dalyvavo devynios laboratorijos. Buvo išanalizuoti trys bandiniai. Toliau esančioje lentelėje pateikiamos trijuose bandiniuose nustatytos analizių kiekio % m/m (m), rezultatų pasikartojamumo (r), rezultatų atitikimo (R) vidutinės reikšmės:

Bandinys		2-fenoksieta- nolis	1-fenoksipro- pan-2-olis	Metilparabenas	Etilparabenas	Propilparabe- nas	Butilparabenas	Benzilparabe- nas
Vitaminizuotas kremas	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	
Greitai susigeriantis kremas	m	1,196		0,266	0,076			
	r	0,040		0,003	0,002			
	R	0,147		0,022	0,004			
Masažo kremas	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