

31996L0045

L 213/8

EIROPAS KOPIENU OFICIĀLAIS VĒSTNESIS

22.8.1996.

KOMISIJAS SEPTĪTĀ DIREKTĪVA 96/45/EK**(1996. gada 2. jūlijs)****attiecībā uz analīzes metodēm, kas vajadzīgas kosmētikas līdzekļu sastāva testēšanai****(dokuments attiecas uz EEZ)**

EIROPAS KOPIENU KOMISIJA,

ņemot vērā Eiropas Kopienas dibināšanas līgumu,

ņemot vērā Padomes 1976. gada 27. jūlija Direktīvu 76/768/EEK par dalībvalstu tiesību aktu tuvināšanu attiecībā uz kosmētikas līdzekļiem ⁽¹⁾, kurā jaunākie grozījumi izdarīti ar Direktīvu 95/34/EEK ⁽²⁾, un jo īpaši tās 8. panta 1. punktu,

tā kā Direktīvā 76/768/EEK ir paredzēta kosmētikas līdzekļu oficiāla testēšana, lai nodrošinātu to Kopienas noteikumos izklāstīto nosacījumu izpildi, kas attiecas uz kosmētikas līdzekļu sastāvu;

tā kā pēc iespējas īsākā laikā būtu jāparedz visas vajadzīgās analīzes metodes; tā kā dažas metodes jau ir paredzētas ar Komisijas Direktīvām 80/1335/EEK ⁽³⁾, kas grozīta ar Direktīvu 87/143/EEK ⁽⁴⁾ 82/434/EEK ⁽⁵⁾, kura savukārt grozīta ar Direktīvu 90/207/EEK ⁽⁶⁾, un ar Komisijas Direktīvām 83/514/EEK ⁽⁷⁾, 85/490/EEK ⁽⁸⁾, 93/73/EEK ⁽⁹⁾ un 95/32/EK ⁽¹⁰⁾;

tā kā 2-fenoksietanola, 1-fenoksipropān-2-ola, metil-, etil-, propil-, butil- un benzil-4-hidroksibenzoāta pierādīšana un noteikšana kosmētikas līdzekļos ir septītais pasākums;

tā kā šajā direktīvā paredzētie pasākumi ir saskaņā ar atzinumu, ko sniegusi komiteja, kura izveidota, lai Direktīvu 76/768/EEK pielāgotu tehnikas attīstībai,

IR PIEŅĒMUSI ŠO DIREKTĪVU.

1. pants

Dalībvalstīs veic visus pasākumus, kas vajadzīgi, lai kosmētikas līdzekļu oficiālajā testēšanā 2-fenoksietanolu, 1-fenoksipropān-

2-olu, metil-, etil-, propil-, butil-, un benzil-4-hidroksibenzoātu pierāda un nosaka saskaņā ar pielikumā aprakstīto metodi.

2. pants

1. Dalībvalstīs ne vēlāk kā 1997. gada 30. septembrī stājas spēkā normatīvie un administratīvie akti, kas vajadzīgi, lai izpildītu šīs direktīvas prasības. Par to dalībvalstīs tūlīt informē Komisiju.

2. Kad dalībvalstīs pieņem šos noteikumus, tajos ietver atsauci uz šo direktīvu vai arī šādu atsauci pievieno to oficiālajai publikācijai. Dalībvalstis nosaka kārtību, kā izdarīt šādas atsauces.

3. Dalībvalstis dara Komisijai zināmus tiesību aktu noteikumus, ko tās pieņem jomā, uz kuru attiecas šī direktīva.

3. pants

Šī direktīva stājas spēkā divdesmitajā dienā pēc tās publicēšanas Eiropas Kopienu Oficiālajā Vēstnesī.

4. pants

Šī direktīva ir adresēta dalībvalstīm.

Briselē, 1996. gada 2. jūlijā

Komisijas vārdā —

Komisijas locekle

Emma BONINO

⁽¹⁾ OV L 262, 27.9.1976., 169. lpp.⁽²⁾ OV L 167, 18.7.1995., 19. lpp.⁽³⁾ OV L 383, 31.12.1980., 27. lpp.⁽⁴⁾ OV L 57, 27.2.1987., 56. lpp.⁽⁵⁾ OV L 185, 30.6.1982., 1. lpp.⁽⁶⁾ OV L 108, 28.4.1990., 92. lpp.⁽⁷⁾ OV L 291, 24.10.1983., 9. lpp.⁽⁸⁾ OV L 295, 7.11.1985., 30. lpp.⁽⁹⁾ OV L 231, 14.9.1993., 34. lpp.⁽¹⁰⁾ OV L 178, 28.7.1995., 20. lpp.

PIELIKUMS

2-FENOKSIETANOLA, 1-FENOKSIPROPĀN-2-OLA, METIL-, ETIL-, PROPIL-, BUTIL- UN BENZIL-4-HIDROKSIBENZOĀTA PIERĀDĪŠANA UN NOTEIKŠANA KOSMĒTIKAS LĪDZEKĻOS

A. PIERĀDĪŠANA.

1. **Piemērošanas joma un nozare.**

Ar šo metodi nosaka TLC procedūru, kas kopā ar noteikšanas metodi, kura ir aprakstīta B iedaļā, dod iespēju pierādīt 2-fenoksietanolu, 1-fenoksipropān-2-olu, metil-4-hidroksibenzoātu, etil-4-hidroksibenzoātu, propil-4-hidroksibenzoātu, butil-4-hidroksibenzoātu un benzil-4-hidroksibenzoātu kosmētikas līdzekļos.

2. **Princips.**

Konservantus no paskābinātā kosmētikas līdzekļa parauga ekstrahē ar acetonu. Pēc filtrēšanas acetona šķīdumu sajauc ar ūdeni un sārmainā vidē nogulsnē taukskābes to kalcija sāļu veidā. Sārma acetona/ūdens maisījumu ekstrahē ar dietilēteri, lai atdalītu lipofīlas vielas. Pēc paskābināšanas konservantus ekstrahē ar dietilēteri. Dietilētera ekstrakta alikvoto daļu uznes uz silikagēla plānslāņa plates. Pēc plates attīstīšanas iegūto hromatogrammu apskata ultravioletā gaismā un padara redzamu ar Milona reāģentu.

3. **Reāģenti.**

3.1. Vispārīgi noteikumi.

Visi reāģenti ir analītiski tīri. Ūdens ir destilēts vai vismaz līdzvērtīgs.

3.2. Acetons.

3.3. Dietilēteris.

3.4. n-pentāns.

3.5. Metanols.

3.6. Ledus etiķskābe.

3.7. Sālsskābes šķīdums, $c(\text{HCl}) = 4 \text{ mol/l}$.3.8. Kālija hidroksīda šķīdums, $c(\text{KOH}) = 4 \text{ mol/l}$.3.9. Kalcija hlorīda dihidrāts ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

3.10. Noteikšanas reāģents: Milona reāģents.

Milona reāģents (dzīvsudraba (II) nitrāts) ir nopērkams lietošanai gatavs šķīdums (*Fluka 69820*).

3.11. 2-fenoksietanols.

3.12. 1-fenoksipropān-2-ols.

3.13. Metil-4-hidroksibenzoāts (metilparabens).

3.14. Etil-4-hidroksibenzoāts (etilparabens).

3.15. n-propil-4-hidroksibenzoāts (propilparabens).

3.16. n-butil-4-hidroksibenzoāts (butilparabens).

3.17. Benzil-4-hidroksibenzoāts (benzilparabens).

3.18. Standartšķīdumi.

No katras standartvielas (3.11., 3.12., 3.13., 3.14., 3.15., 3.16. un 3.17.) gatavo 0,1 % (m/V) šķīdumu metanolā.

3.19. Attīstīšanas šķīdinātājs.

Sajauc 88 tilp.v. n-pentāna (3.4.) ar 12 tilp.v. ledus etiķskābes (3.6.).

4. Aprīkojums.

Laboratorijas standartaprīkojums un:

- 4.1. Ūdens vanna, kurā var uzturēt 60 °C.
- 4.2. Attīstīšanas kamera (kas nav izklāta ar filtrpapīru).
- 4.3. Ultravioletas gaismas avots, 254 nm.
- 4.4. Plānslāņa plates, 20 cm × 20 cm, kas iepriekš pārklātas ar 0,25 mm silikagēlu 60F₂₅₄, ar koncentrēšanas zonu (Merck Nr. 11798, Darmstadt vai līdzvērtīgas).
- 4.5. Krāsns, kurā var uzturēt 105 °C.
- 4.6. Karsta gaisa fēns.
- 4.7. Vilnas krāsu rullītis apmēram 10 cm garš ar ārējo diametru aptuveni 3,5 cm. Vilnas kārtas biezums ir 2 līdz 3 mm. Ja vajadzīgs, vilnu apcērp.

Skatīt 5.2. piezīmi.

- 4.8. Stikla mēģenes, 50 ml, ar skrūvējamu vāciņu.
- 4.9. Elektriskā plītiņa ar termostatu temperatūras regulēšanai. Temperatūras uzstādījums: ap 80 °C. Elektrisko plītiņu pārklāj ar apmēram 6 mm biezu 20 cm × 20 cm alumīnija plati, lai nodrošinātu vienmērīgu sasīšanu.

5. Procedūra.

5.1. Parauga gatavošana.

Iesver aptuveni 1 g parauga 50 ml stikla mēģenē ar skrūvējamu vāciņu (4.8.). Pievieno četrus pilienus sālsskābes šķīduma (3.7.) un 40 ml acetona.

Izteikti bāziskiem kosmētikas līdzekļiem, piemēram, tualetes ziepēm, pievieno 20 pilienus sālsskābes šķīduma. Aizskrūvē mēģeni, viegli karsē maisījumu aptuveni līdz 60 °C, lai paātrinātu konservantu ekstrakciju acetona fāzē, un stipri krata vienu minūti.

Izmēra šķīduma pH ar indikatorpapīru un ar sālsskābes šķīdumu noregulē šķīduma pH uz ≤ 3. Atkal stipri krata vienu minūti.

Atdzēsē šķīdumu līdz istabas temperatūrai un izfiltrē caur filtrpapīru koniskā kolbā. Pārnes 20 ml filtrāta uz 200 ml konisku kolbu, pievieno 60 ml ūdens un sajauc. Ar kālija hidroksīdu (3.8.), lietojot pH indikatorpapīru, noregulē maisījuma pH aptuveni uz 10.

Pievieno 1 g kalcija hlorīda dihidrāta (3.9.) un stipri sakrata. Izfiltrē šķīdumu caur filtrpapīru 250 ml daļamajā piltuvē, kur ir 75 ml dietilētera, un stipri krata vienu minūti. Ļauj fāzēm atdalīties un savāc ūdens slāni koniskā 200 ml kolbā. Ar sālsskābes šķīdumu, lietojot pH indikatorpapīru, noregulē šķīduma pH aptuveni uz 2. Pēc tam pievieno 10 ml dietilētera un stipri krata vienu minūti. Ļauj fāzēm atdalīties un pārnes aptuveni 2 ml dietilētera slāņa uz 5 ml parauga mēģeni.

5.2. Plānslāņa hromatogrāfija (TLC).

Noliec TLC plati (4.4.) uz sakarsētās alumīnija plates (4.9.). Uznes 10 µl katra standartsķīduma (3.18.) un 100 µl parauga šķīduma(-u) (5.1.) uz starta līnijas TLC plates koncentrēšanas zonā.

Pēc vēlēšanās šķīdinātāja iztvaikošanu var paātrināt ar gaisa plūsmu. Noņem TLC plati no plītiņas un ļauj atdzist līdz istabas temperatūrai. Pārnes 100 ml attīstīšanas šķīdinātāja (3.19.) uz attīstīšanas kameru (4.2.).

Tūlīt liec TLC plati nepiesātinātājā kamerā un attīsta istabas temperatūrā, līdz šķīdinātāja fronte ir pavirzījusies apmēram 15 cm no sākuma līnijas. Izņem plati no attīstīšanas kameras un žāvē karsta fēna gaisa plūsmā.

Apskata plati ultravioletā gaismā (4.3.) un atzīmē plankumu izvietojumu. Karsē plati 30 minūtes krāsnī (4.5.) 100 °C, lai atdalītu etiķskābes pārākumu. Konservantus hromatogrammā padara redzamus ar Milona reaģentu (3.10.), tajā iegremdējot krāsu rullīti (4.7.) un ar to uznesot reaģentu uz TLC plates, līdz plate ir vienmērīgi samitrināta.

Piezīme. Alternatīvi plankumus var padarīt redzamus, uzmanīgi uzpilinot Milona reaģentu uz katra ultravioletajā gaismā atzīmētā plankuma.

4-hidroksibenzoskābes esterī parādās sarkanu plankumu veidā, 2-fenoksietanols un 1-fenoksipropān-2-ols - dzeltenu plankumu veidā. Tomēr pati 4-hidroksibenzoskābe, kas var būt kā konservants vai parabenu sadalīšanās produkts paraugos, arī parādās sarkana plankuma veidā. Skatīt 7.3. un 7.4.

6. Pierādīšana.

Aprēķina katra plankuma R_f vērtību. Salīdzina no parauga šķīduma iegūtos plankumus ar tiem, kas iegūti no standartšķīdumiem, salīdzinot to R_f vērtības, to raksturu ultravioletajos staros un krāsu pēc tam, kad tie ir padarīti redzami. Izdara provizoriskus secinājumus par konservantu identitāti.

Parabenu klātbūtnes gadījumā būtu jāveic HPLC procedūra, kas aprakstīta B iedaļā. Apvienojot TLC un augstas izšķirtspējas šķidrums hromatogrāfijas (HPLC) rezultātus, apstiprina 2-fenoksietanola, 1-fenoksipropān-2-ola un parabenu klātbūtni.

7. Piezīmes.

- 7.1. Tā kā Milona reaģents ir toksisks, labāk to lietot saskaņā ar vienu no aprakstītajām procedūrām. Smidzināt nav ieteicams.
- 7.2. Arī citi savienojumi, kuros ir hidroksilgrupas, var krāsoties saskarsmē ar Milona reaģentu. To krāsu un R_f vērtību tabula, ko iegūst no vairākiem konservantiem, izmantojot šo TLC procedūru, ir atrodama N. de Kruijf, 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. R_f vērtības, kas ir šajā tabulā, norāda vērtības, kādas var iegūt:

Savienojums	hR_f	Krāsa
4-hidroksibenzoskābe	11	sarkana
metilparabens	12	sarkana
etilparabens	17	sarkana
propilparabens	21	sarkana
butilparabens	26	sarkana
benzilparabens	16	sarkana
2-fenoksietanols	29	dzeltēna
1-fenoksipropān-2-ols	50	dzeltēna

- 7.4. Nav atšķirības starp 4-hidroksibenzoskābi un metilparabenu vai benzilparabenu un etilparabenu. Šo savienojumu pierādīšana būtu jāapstiprina ar HPLC metodi, kas aprakstīta B iedaļā, un salīdzinot parauga un standartu izdalīšanas laikus.

B. NOTEIKŠANA.

1. Piemērošanas joma un nozare.

Ar šo metodi nosaka procedūru 2-fenoksietanola, 1-fenoksipropān-2-ola, metil-4-hidroksibenzoāta, etil-4-hidroksibenzoāta, propil-4-hidroksibenzoāta, butil-4-hidroksibenzoāta un benzil-4-hidroksibenzoāta noteikšanai kosmētikas līdzekļos.

2. Noteikums.

Ar šo metodi noteikto konservantu daudzumu izsaka masas procentos.

3. Princips.

Paraugu paskābina, pievienojot sērskābi, un pēc tam suspendē etanola un ūdens maisījumā. Maisījumu viegli karsē, lai izkausētu lipīdu fāzi un veicinātu kvantitatīvu ekstrakciju, pēc tam maisījumu izfiltrē.

Konservantus filtrētā nosaka apgrieztas fāzes HPLC, par iekšējo standartu izmantojot izopropil-4-hidroksibenzoātu.

4. Reāģenti.

4.1. Vispārīgi noteikumi.

Visiem reāģentiem jābūt analītiski tīriem un, ja vajadzīgs, piemērotiem HPLC. Ūdens ir destilēts vai vismaz līdzvērtīgs.

4.2. Absolūtais etanols.

4.3. 2-fenoksietanols.

4.4. 1-fenoksipropān-2-ols.

- 4.5. Metil-4-hidroksibenzoāts (metilparabens).
- 4.6. Etil-4-hidroksibenzoāts (etilparabens).
- 4.7. n-propil-4-hidroksibenzoāts (propilparabens).
- 4.8. Izopropil-4-hidroksibenzoāts (izopropilparabens).
- 4.9. n-butil-4-hidroksibenzoāts (butilparabens).
- 4.10. Benzil-4-hidroksibenzoāts (benzilparabens).
- 4.11. Tetrahidrofurāns.
- 4.12. Metanols.
- 4.13. Acetonitrils.
- 4.14. Sērskābes šķīdums, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 2 \text{ mol/l}$.
- 4.15. Etanola/ūdens maisījums.
Sajauc deviņas tilpuma vienības etanola (4.2.) un vienu tilpuma vienību ūdens.
- 4.16. Iekšējā standarta šķīdums.
Precīzi nosver aptuveni 0,25 g izopropilparabena (4.8.), pārnes uz 500 ml mērkolbu, izšķīdina un uzpilda līdz zīmei ar etanola/ūdens maisījumu (4.15.).
- 4.17. Kustīgā fāze: tetrahidrofurāna/ūdens/metanola/acetonitrila maisījums.
Sajauc 5 tilpuma vienības tetrahidrofurāna, 60 tilpuma vienības ūdens, 10 tilpuma vienības metanola un 25 tilpuma vienības acetonitrila.
- 4.18. Konservanta standartšķīdums.
Precīzi iesver aptuveni 0,2 g 2-fenoksietanola, 0,2 g 1-fenoksipropān-2-ola, 0,05 g metilparabena, 0,05 g etilparabena, 0,05 g propilparabena, 0,05 g butilparabena un 0,025 g benzilparabena 100 ml mērkolbā, izšķīdina un uzpilda līdz zīmei ar etanola/ūdens maisījumu.
Glabāts ledusskapī, šķīdums saglabājas stabils vienu nedēļu.
- 4.19. Konservantu standartšķīdumi.
Attiecīgi pārnes 20,00 ml, 10,00 ml, 5,00 ml, 2,00 ml un 1,00 ml standartšķīduma (4.18.) uz 50 ml mērkolbām. Katrā kolbā pievieno 10,00 ml iekšējā standarta šķīduma (4.16.) un 1,0 ml sērskābes šķīduma (4.14.) un uzpilda līdz zīmei ar etanola/ūdens maisījumu. Šie šķīdumi būtu jāgatavo tieši pirms lietošanas.
5. **Aprīkojums.**
Laboratorijas standartaprīkojums un:
 - 5.1. Ūdens vanna, kurā var uzturēt $60 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.
 - 5.2. Augstas izšķirtspējas šķidrums hromatogrāfs ar 280 nm ultrašviļņu detektoru.
 - 5.3. Hromatogrāfijas kolonna:
Nerūsējošs tērauds, iekšējais diametrs 25 cm \times 4,6 mm (vai 12,5 cm \times 4,6 mm), *Nucleosil 5C18* vai līdzvērtīgs (skatīt 10.1.) pildījums.
 - 5.4. Stikla mēģenes, 100 ml, ar skrūvējamu vāciņu.
 - 5.5. Vārķermeņi, 2 – 4 mm karborunds vai līdzvērtīgi.
6. **Procedūra.**
 - 6.1. Parauga gatavošana.
 - 6.1.1. Parauga gatavošana, nepievienojot iekšējo standartu.
Iesver aptuveni 1,0 g parauga 100 ml stikla mēģenē ar skrūvējamu vāciņu. Ar pipeti mēģenēs iepilina 1,0 ml sērskābes šķīduma (4.14.) un 50,0 ml etanola/ūdens maisījuma (4.15.). Pievieno aptuveni 1 g vārķermeņu (5.5.), noslēdz mēģeni un spēcīgi krata, līdz rodas vienmērīga suspensija. Krata vismaz vienu minūti. Liek mēģeni uz piecām minūtēm ūdens vannā (5.1.), kur uztur $60 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, lai paātrinātu konservantu ekstrakciju etanola fāzē.
Tūlīt atdzesē mēģeni auksta ūdens strūklā un liek ekstraktu ledusskapī uz vienu stundu. Izfiltrē ekstraktu caur filtrpapīru. Pārnes aptuveni 2 ml filtrāta uz 5 ml parauga mēģeni. Liek ekstraktus ledusskapī un 24 stundās veic noteikšanu HPLC.

6.1.2. Parauga gatavošana, pievienojot iekšējo standartu.

Iesver ar precizitāti līdz trim zīmēm aiz komata 1,0 g \pm 0,1 g parauga 100 ml stikla mēģenē ar skrūvējamu vāciņu.

Ar pipeti iepilina 1,0 ml sērskābes šķīduma un 40,0 ml etanola/ūdens maisījuma mēģenē. Pievieno aptuveni 1 g vārķermeņu (5.5.) un precīzi 10,00 ml iekšējā standarta šķīduma. Noslēdz mēģeni un spēcīgi krata, līdz tiek iegūta vienmērīga suspensija. Krata vismaz vienu minūti. Liek mēģeni uz piecām minūtēm ūdens vannā, kur uztur 60 °C \pm 1 °C, lai paātrinātu konservantu ekstrakciju etanola fāzē.

Tūlīt atdzesē mēģeni auksta ūdens strūklā un liek ekstraktu ledusskapī uz vienu stundu. Izfiltrē ekstraktu caur filtrpapīru.

Pārnes aptuveni 2 ml filtrāta uz 5 ml parauga mēģeni (parauga šķīdums). Liek ekstraktu ledusskapī un 24 stundās veic noteikšanu HPLC.

6.2. Augstas izšķirtspējas šķidrums hromatogrāfija (HPLC).

6.2.1. Hromatogrāfijas apstākļi.

- Kustīgā fāze: tetrahidrofurāna/ūdens/metanola/acetoniitrila maisījums (4.17.).
- Plūsmas ātrums: 1,5 ml/minūtē.
- Noteikšanas viļņa garums: 280 nm.

6.2.2. Kalibrēšana.

Ievada 10 μ l katra konservanta standartšķīduma (4.19.). Pēc iegūtajām hromatogrammām nosaka konservantu standartšķīdumu pīķu augstumu attiecības pret iekšējā standarta pīķa augstumu. Konstruē katra konservanta līkni, attiecinot minētās attiecības pret standartšķīdumu koncentrācijām.

6.2.3. Noteikšana.

Ievada 10 μ l parauga šķīduma bez iekšējā standarta (6.1.1.) hromatogrāfā un uzņem hromatogrammu.

Ievada 10 μ l viena konservanta standarta šķīduma (4.19.) un uzņem hromatogrammu. Salīdzina iegūtās hromatogrammas.

Ja parauga ekstrakta (6.1.1.) hromatogrammā nav neviena pīķa, kura izdalīšanas laiks ir aptuveni vienāds ar izopropilparabena (ieteicamais iekšējais standarts) pīķa izdalīšanas laiku, tad ievada 10 μ l parauga šķīduma ar iekšējo standartu (6.1.2.). Uzņem hromatogrammu un izmēra pīķu augstumus.

Ja parauga šķīduma hromatogrammā ir traucējošs pīķis, kura izdalīšanas laiks ir aptuveni vienāds ar izopropilparabena pīķa izdalīšanas laiku, tad būtu jāizvēlas cits iekšējais standarts.

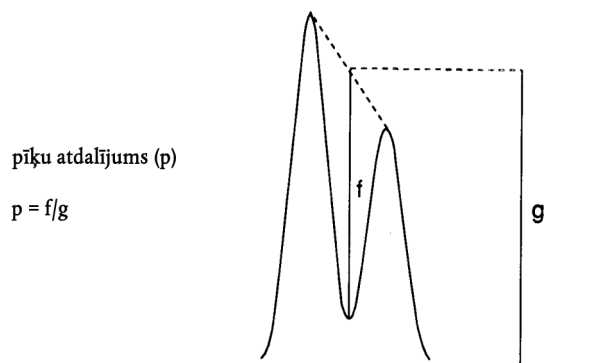
Ja kāds analizējamo konservants neparādās parauga hromatogrammā, tad šo konservantu var izmantot par alternatīvu iekšējo standartu.

Aprēķina analizējamo konservantu pīķu augstumu attiecības pret iekšējā standarta pīķa augstumu.

Pārlicinās, vai kalibrēšanā izmantoto standartšķīdumi veido taisnu līniju.

Pārlicinās, vai iegūtās standartšķīduma un parauga šķīduma hromatogrammas atbilst šādiem nosacījumiem:

- vissliktāk atdalīto pīķu pāra atdalījums ir vismaz 0,90. (Noteikumu par pīķu atdalījumu skatīt 1. attēlā.)



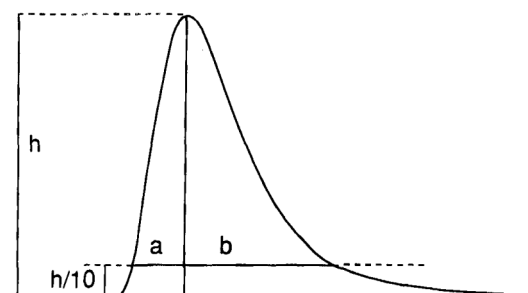
1. attēls. Pīķu atdalījums

Ja nav panākts vajadzīgais atdalījums, tad būtu jālieto efektīvāka kolonna vai jāregulē mobilās fāzes sastāvs, līdz panāk vajadzīgo atdalījumu;

- asimetrijas faktors: visi iegūtie pīķi ir no 0,9 līdz 1,5. (Noteikumu par pīķu asimetrijas faktoru skatīt 2. attēlā.) Lai uzņemtu hromatogrammu asimetrijas faktora noteikšanai, ieteicams pašrakstītāja ātrums vismaz 2 cm/minūtē;

Asimetrijas faktors (A_s)

$$A_s = b/a$$



2. attēls. Pīķu asimetrijas faktors

- iegūst vienmērīgu bāzes līniju.

7. Aprēķins.

Konservantu koncentrāciju parauga šķīdumā aprēķina pēc kalibrēšanas līknes (6.2.2.) un analizējamo konservantu pīķu augstumu attiecībā pret iekšējā standarta pīķa augstumu. Aprēķina 2-fenoksietanola, 1-fenoksi-propān-2-ola, metil-4-hidroksibenzoāta, etil-4-hidroksibenzoāta, propil-4-hidroksibenzoāta, butil-4-hidroksibenzoāta un benzil-4-hidroksibenzoāta saturu w_i masas procentos (% m/m) pēc formulas:

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

kur:

b_i = konservanta i koncentrācija ($\mu\text{g/ml}$) parauga šķīdumā, ko nolasa no kalibrēšanas līknes;

a = analizējamā daudzuma masa gramos.

8. Atkārtojamība (¹).

Skatīt piezīmes 10.5.

9. Reproducējamība (¹).

Skatīt piezīmes, 10.5.

10. Piezīmes.

10.1. Nekustīgā fāze.

Vielu izdalīšana, nosakot HPLC, lielā mērā ir atkarīga no nekustīgās fāzes veida, markas un izcelsmes. Par to, vai kolonnu var lietot analizējamo konservantu atdalīšanai, var spriest pēc rezultātiem, ko iegūst, hromatografējot standartšķīdumus (skatīt piezīmes 6.2.3.). Papildus ieteiktajam *Hypersil ODS* kolonnas pildījumam arī *Zorbax ODS* ir atzīts par piemērotu.

Alternatīvi var optimizēt ieteicamo kustīgās fāzes sastāvu, lai panāktu vajadzīgo atdalījumu.

10.2. Noteikšanas viļņa garums.

Aptuveni pārbaudot aprakstīto metodi, ir noskaidrots, ka nelielas noteikšanas viļņa garuma izmaiņas var ievērojami ietekmēt noteikšanas rezultātus.

Tāpēc šis rādītājs analīzes laikā uzmanīgi jākontrolē.

(¹) ISO 5725.

10.3. Traucējumi.

Apstākļos, kas aprakstīti šajā metodē, eluē arī daudzus citus savienojumus, piemēram, konservantus un kosmētikas piedevas. Daudzu to konservantu izdalīšanas laiki, kas minēti tās Padomes direktīvas VI pielikumā, kura attiecas uz kosmētikas līdzekļiem, ir iekļauti N. de Kruijff, M. A. H. Rijk, L. A. Pranato-Soetardhi and A. Schouten, (1989). *Determination of preservatives in cosmetic products II. High-performance liquid chromatographic identification* (J. Chromatography 469, 317-398).

10.4. Hromatogrāfijas kolonnu var aprīkot ar piemērotu aizsargkolonnu.

10.5. Metode ir pārbaudīta salīdzināmās pārbaudēs, piedaloties deviņām laboratorijām. Analizēja trīs paraugus. Šajā tabulā ir iekļauti katrā paraugā nosakāmo komponentu vidējie % m/m (m), atkārtojamība (r), reproducējamība (R):

Paraugšs		2-fenoksi-pro-pān-2-ols	1-fenoksi-pro-pān-2-ols	Metilparabens	Etilparabens	Propilparabens	Butilparabens	Benzilparabens
Vitaminizēts krēms	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	
Krēms, kas ātri iesūcas	m	1,196		0,266	0,076			
	r	0,040		0,003	0,002			
	R	0,147		0,022	0,004			
Masāžas krēms	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