

31996L0045

L 213/8

IL-ĠURNAL UFFIĊJALI TAL-KOMUNITAJIET EWROPEJ

22.8.1996

IS-SEBA' DIRETTIVA TAL-KUMMISSJONI 96/45/KE**tat-12 ta' Lulju 1996****dwar il-metodi ta' analiżi meħtieġa għall-kontroll tal-kompożizzjoni tal-prodotti kosmetiċi****(Test b'rilevanza għaż-ŻEE)**

IL-KUMMISSJONI TAL-KOMUNITAJIET EWROPEJ,

Wara li kkunsidrat it-Trattat li jstabbilixxi l-Komunità Ewropea,

Wara li kkunsidrat id-Direttiva tal-Kunsill 76/768/KEE tas-27 ta' Lulju 1976 dwar l-approssimazzjoni tal-liġijiet ta' l-Istati Membri li għandhom x'jaqsmu mal-prodotti kosmetiċi ⁽¹⁾, kif l-aħhar emendata bid-Direttiva 95/34/KEE ⁽²⁾, u b'mod partikolari l-Artikolu 8 tagħha,

Billi d-Direttiva 76/768/KEE tipprovdi għall-ittestjar uffiċjali tal-prodotti kosmetiċi bil-għan li tiżgura li l-kondizzjonijiet stabbiliti bid-dispożizzjonijiet tal-Komunità dwar il-kompożizzjoni tal-prodotti kosmetiċi jiġu sodisfatti;

Billi l-metodi ta' analiżi kollha meħtieġa għandhom jiġu stabbiliti mill-iktar fis possibbli; billi ċerti metodi diġà ġew adottati fid-Direttivi tal-Kummissjoni 80/1335/KEE ⁽³⁾, kif emendati bid-Direttiva 87/143/KEE ⁽⁴⁾, 82/434/KEE ⁽⁵⁾, kif emendati bid-Direttiva 90/207/KEE ⁽⁶⁾, u bid-Direttivi tal-Kummissjoni 83/514/KEE ⁽⁷⁾, 85/490/KEE ⁽⁸⁾, 93/73/KEE ⁽⁹⁾ u 95/32/KE ⁽¹⁰⁾;

Billi l-identifikazzjoni u d-determinazzjoni ta' 2-phenoxyethenol, 1-phenoxypropan-2-ol, methyl, ethyl, propyl, butyl u benzyl 4-hydroxybenzoate fil-prodotti kosmetiċi jikkostitwixxu s-seba' pass;

Billi l-miżuri li għalihom hemm provdut f'din id-Direttiva huma skond l-opinjoni tal-Kumitat dwar l-addattament tad-Direttiva 76/768/KEE għall-progress tekniku,

ADOTTAT DIN ID-DEĊIŻJONI:

L-Artikolu 1

L-Istati Membri għandhom jiehdu l-passi kollha meħtieġa biex jiżguraw li matul l-ittestjar uffiċjali ta' prodotti kosmetiċi, l-identifikazzjoni u d-determinazzjoni ta' 2-phenoxyethenol, 1-

pneoxypropan-2-ol, methyl, ethyl, propyl, butyl u benzyl 4-hydroxybenzoate jitwettqu skond il-metodu deskritt fl-Anness.

L-Artikolu 2

1. L-Istati Membri għandhom idahhlu fis-seħh il-liġijiet, ir-regolamenti u d-dispożizzjonijiet amministrattivi meħtieġa biex jikkonformaw ma' din id-Direttiva sa mhux iktar tard mit-30 ta' Settembru 1997. Huma għandhom jinformat minnufih lill-Kummissjoni b'dan.

2. Meta l-Istati Membri jadottaw dawn id-dispożizzjonijiet, huma għandhom ikollhom referenza għal din id-Direttiva jew għandhom ikunu akkumpanjati b'tali referenza fiż-żmien tal-pubblikazzjoni uffiċjali tagħhom. Il-proċedura għal referenza bħal din għandha tiġi adottata mill-Istati Membri.

3. L-Istati Membri għandhom jikkomunikaw lill-Kummissjoni id-dispożizzjonijiet tal-liġi nazzjonali li huma jadottaw fil-qasam kopert minn din id-Direttiva.

L-Artikolu 3

Din id-Direttiva għandha tidhol fis-seħh fl-20 jum mill-pubblikazzjoni tagħha fil-Ġurnal Uffiċjali tal-Komunitajiet Ewropej.

L-Artikolu 4

Din id-Direttiva hija indirizzata lill-Istati Membri.

Magħmula fi Brussel, fit-2 ta' Lulju 1996.

Għall-Kummissjoni

Emma BONINO

Membri tal-Kummissjoni⁽¹⁾ ĠU L 262, tas-27.9.1976, p. 169.⁽²⁾ ĠU L 167, tat-18.7.1995, p. 19.⁽³⁾ ĠU L 383, tal-31.12.1980, p. 27.⁽⁴⁾ ĠU L 57, tas-27.2.1987, p. 56.⁽⁵⁾ ĠU L 185, tat-30.6.1982, p. 1.⁽⁶⁾ ĠU L 108, tat-28.4.1990, p. 92.⁽⁷⁾ ĠU L 291, ta' l-24.10.1983, p. 9.⁽⁸⁾ ĠU L 295, tas-7.11.1985, p. 30.⁽⁹⁾ ĠU L 231, ta' l-14.9.1993, p. 34.⁽¹⁰⁾ ĠU L 178, tat-28.7.1995, p. 20.

L-ANNEX

IDENTIFIKAZZJONI U DETERMINAZZJONI TA' 2-PHENOXYETHANOL, 1-PHENOXYPROPAN-2-OL, METHYL, ETHYL, PROPYL, BUTYL U BENZYL 4-HYDROXYBENZOATE FI PRODOTTI KOSMETIĊI

A. IDENTIFIKAZZJONI

1. **Għan u qasam ta' applikazzjoni**

Dan il-metodu jispeċifika proċedura TLC li, f'kombinazzjoni mal-metodu ta' determinazzjoni deskritt fis-Sezzjoni B, jippermetti l-identifikazzjoni ta' 2-phenoxyethanol, 1-phenoxypropan-2-ol, methyl 4-hydroxybenzoate, ethyl 4-hydroxybenzoate, propyl 4-hydroxybenzoate, butyl 4-hydroxybenzoate u benzyl 4-hydroxybenzoate fi prodotti kosmetiċi.

2. **Prinċipju**

Il-preservattivi huma estratti mill-kampjun kosmetiku aċidifat bl-aċetun. Wara l-filtrazzjoni, is-soluzzjoni ta' l-aċetun hija mħallta bl-ilma, u f'sustanza alkalinika, l-aċidi grassi kif ukoll l-imluħa tal-kalċju tagħhom jissolidifikaw ruħhom. It-tahlita aċetun alkalinika/ilma hija estratta bid-diethylether biex jitneħħew is-sustanzi lipofiliċi. Wara l-aċidifikazzjoni, l-preservattivi huma estratti bid-diethylether. Alikwott ta' l-estratt tad-diethylether huwa spottjat fuq platt miksi b'saff irqiq ta' ġel tas-silika. Wara l-iżvilupp tal-platt, il-kromatogramma miksuba hija osservata taħt dawl UV u viżwalizzata bl-użu ta' reagent ta' Millon.

3. **Reaġenti**3.1. **Ġenerali**

Ir-reaġenti kollha użati għandhom ikunu ta' purità analitika. L-ilma għandu jkun ilma iddistillat, jew ilma ta' purità li tkun għallinqas ugwali.

3.2. **Aċetun.**3.3. **Diethylether**3.4. **n-Pentane**3.5. **Methanol**3.6. **Aċidu aċetiku, glaċjali**3.7. **Soluzzjoni ta' l-aċidu idrokloriku, c(HCl)=4mol/l**3.8. **Soluzzjoni ta' l-idrossidu tal-potassju, c(KOH)=4mol/l**3.9. **Kloru tal-kalċju diidrat (CaCl₂ - 2H₂O)**3.10. **Reaġenti ta' wiri (detection reagent): Ir-reaġent ta' Millon**

Ir-reaġent ta' Millon (nitrat tal-Merkurju (II)) huwa soluzzjoni diġà ippreparata li hija disponibbli kummerċjalment (Fluka 69820).

3.11. **2-Phenoxyethanol**3.12. **1-Phenoxypropan-2-ol**3.13. **Methyl 4-hydroxybenzoate (methylparaben)**3.14. **Ethyl 4-hydroxybenzoate (ethylparaben)**3.15. **n-Propyl 4-hydroxybenzoate (propylparaben)**3.16. **n-Butyl 4-hydroxybenzoate (butylparaben)**3.17. **Benzyl 4-hydroxybenzoate (benzylparaben)**3.18. **Soluzzjonijiet ta' riferenza**

Hejji 0,1 % (m/V) soluzzjonijiet ta' kull waħda mis-sustanzi ta' riferenza 3.11, 3.12, 3.13, 3.14, 3.15, 3.16 u 3.17 f'methanol.

3.19. **Solvent ta' żvilupp**

Hallat 88 volum ta' n-pentane (3.4) ma' 12-il volum ta' aċidu aċetiku glaċjali (3.6).

4. **Apparat**

Apparat normali tal-laboratorju, u

- 4.1. Banju ta' l-ilma, li jkun jista' jżomm temperatura ta' 60 °C
- 4.2. Tank ta' l-iżvilupp (mhux allineat mal-karta filtru)
- 4.3. Sors ta' dawl ultravjola, 254 nm
- 4.4. Platti b'saff irqiq, 20 ċm x 20 ċm, miksija minn qabel b'0,25 mm ta' ġel tas-silika 60F₂₅₄, b'żona ta' koncentrazzjoni (Merck Nru 11798, Darmstadt jew ekwivalenti)
- 4.5. Forn, li kapaċi jżomm sa 105 °C
- 4.6. *Hair dryer* ta' arja sħuna
- 4.7. *Roller* taż-żebgħa tas-suff, ta' tul ta' bejn wiehed u ieħor 10 ċm, dijametru ta' barra ta' bejn wiehed u ieħor 3,5 ċm. Il-ħxuna tas-saff tas-suff għandha tkun minn 2 sa 3 mm. Itrimmja s-suff jekk ikun meħtieġ.

Ara n-nota taħt 5.2

- 4.8. Tubu tal-ħġieġ 50-ml b'tap bil-kamin
- 4.9. Platt li jsaħħan ta' l-elettriku b'kontrollur termostatiku tat-temperatura. Issettjar tat-temperatura: madwar 80 °C. Il-platt tas-shana għandu jkun miksi bi pjanċa ta' l-aluminju ta' 20 ċm – 20 ċm u ħxuna ta' madwar 6 mm, biex tinkiseb distribuzzjoni tas-shana uniformi.

5. **Proċedura**

- 5.1. Preparazzjoni tal-kampjun

Iżen madwar 1g ta' kampjun f'tubu tal-ħġieġ 50-ml b'tapp bil-kamin (4.8) Żid 4 qatriet ta' soluzzjoni ta' aċidu idrokloriku (3.7) u 40 ml ta' aċetun.

Għal prodotti kosmetiċi bażiċi hafna, bħal nġid u aħna s-sapun tat-twaletta, għandhom jiġu miżjuda 20 qatra ta' soluzzjoni ta' aċidu idrokloriku. Aghlaq it-tubu, saħħan it-tahlita bil-mod sa madwar 60 °C biex tiffacilita l-estrazzjoni tal-preservattivi fil-faži ta' l-aċetun u hawwad b'saħħa għal minuta.

Kejjel il-pH tas-soluzzjoni b'karta li tindika l-pH u aġġusta il-pH tas-soluzzjoni ≤ 3 ma' soluzzjoni ta' aċidu idrokloriku. Hawwad b'saħħa mill-ġdid għal minuta.

Berred is-soluzzjoni għal temperatura tal-kamra u iffiltra minn ġewwa karta filtru għal ġewwa flixxun koniku. Itrasferixxi 20 ml tal-filtrat fi flixxun koniku ta' 200-ml, żid 60 ml ilma u hallat. Aġġusta il-pH tat-tahlita għal madwar 10 bl-idrossidu tal-potassju (3.8), bl-użu ta' karta li tindika l-pH.

Żid 1 g diidrat tal-klorur tal-kalċju (3.9) u hawwad sewwa. iffiltra s-soluzzjoni minn ġewwa karta filtru f'lembut li jissepara ta' 250-ml li jkun fih 75 ml diethylether u hawwad sewwa għal minuta. Halli l-fażijiet jisseparaw u iġbor is-saff milwiem fi flixxun koniku ta' 200-ml. Aġġusta il-pH tas-soluzzjoni għal madwar 2 bis-soluzzjoni ta' l-aċidu idrokloriku, bl-użu ta' karta li tindika l-pH. Sussegwentement, żid 10 ml diethylether u hawwad sewwa għal minuta. Halli l-fażijiet biex jisseparaw u ttrasferixxi madwar 2 ml tas-saff tad-diethylether fil-kunjett tal-kampjun ta' 5-ml.

- 5.2. Il-kromatografija tas-saff irqiq (TLC)

Poġġi platt tat-TLC (4.4) fuq platt ta' l-aluminju imsahħan (4.9). Applika 10 μ l minn kull waħda mis-soluzzjonijiet ta' riferenza (3.18) u 100 μ l mis-soluzzjonijiet tal-kampjun (5.1) fuq linja tat-tluq fiż-żona ta' koncentrazzjoni tal-platt tat-TLC.

Jekk mixtieqa, tista' tintuża ċirkolazzjoni ta' arja biex tiffacilita l-evaporazzjoni tas-solvent. Nehhi l-platt tat-TLC mill-platt tas-shana u hallih jibred sat-temperatura tal-kamra. Itrasferixxi 100 ml tas-solvent ta' żvilupp (3.19) fit-tank ta' l-iżvilupp (4.2).

Poġġi l-platt tat-TLC mal-ewwel fil-kumpartiment mhux saturat u żviluppa fit-temperatura tal-kamra sakemm il-parti ta' quddiem tas-solvent tkun imxiet sa madwar 15-il ċm mil-linja bażi. Nehhi l-platt mit-tank ta' żvilupp u nixxef f'ċirkolazzjoni ta' arja sħuna permezz ta' *hair dryer* ta' l-arja sħuna.

Eżamina l-platt taħt dawl UV (4.3) u mmarka l-pożizzjoni tat-tikek. Saħħan il-platt għal 30 minuta f'forn (4.5) f'100 °C biex tneħhi l-aċidu aċetiku zejjed. Hares lejn il-preservattivi fil-kromatogramma bir-reagent ta' Millon (3.10), billi tghaddas ir-roller taż-żebgħa (4.7) fir-reagent u tghaddih fuq il-platt tat-TLC sakemm ikun imxarrab kullimkien l-istess.

Nota: Inkella, it-tikek jistgħu jiġu viżwalizzati bl-applikazzjoni attenta ta' qatra mir-reagent ta' Millon fuq kull tikka mmarkata taħt dawl UV.

Esters ta' l-aċidu 4-hydroxybenzoic jidhru bħala tikek ħomor, 2-phenoxyethanol u 1-phenoxypropan-2-ol bħala tikek sofor. Innota, iżda, li l-aċidu 4-hydroxybenzoic innifsu, li jista' jkun preżenti fil-kampjuni bħala preservattiv jew prodott ta' dekompożizzjoni tal-parabens jidher ukoll bħala tikka hamra. Ara 7.3 u 7.4.

6. Identifikazzjoni

Ikkalkula l-valur R_f għal kull tikka. Qabel it-tikek miksuba mis-soluzzjoni tal-kampjun ma' dawk tas-soluzzjonijiet ta' referenza rigward il-valuri R_f tagħhom, l-imġieba tagħhom taht radjazzjoni UV u l-kulur wara l-viżwalizzazzjoni. Aghmel konklużjonijiet preliminari dwar l-identità tal-preservattivi.

Jekk jidher li jkun hemm parabens preżenti, għandha ssir il-proċedura HPLC deskritta fis-Sezzjoni B. Ikkombina r-riżultati mit-TLC u l-kromatografija likwida ta' rendiment għoli (HPLC) biex tikkonferma l-preżenza tat-2-phenoxyethanol, l-phenoxypropan-2-ol u l-parabens.

7. Rimarki

- 7.1. Minhabba it-tossicità tar-reagent ta' Millon, ikun aħjar li dan ir-reagent jiġi applikat b'wahda mill-proċeduri deskritti. L-isprejjar mhuwiex rakkomandat.
- 7.2. Kompożizzjonijiet oħra li jkun fihom il-gruppi tal-hydroxyl jistgħu ukoll jaġhtu kuluri mar-reagent ta' Millon. Tabella tal-kuluri u tal-valuri R_f miksuba għal numru ta' preservattivi li jużaw din il-proċedura tat-TLC tinsab fi: N. de Kruijff, M. A. H. Rijk, A. Prinato-Soetardhi u A. Schouten (1987): Determinazzjoni ta' preservattivi fi prodotti kosmetiċi I: Il-proċedura kromatografika ta' saff irqiq għall-identifikazzjoni ta' preservattivi fi prodotti kosmetiċi (J.Chromatography 410, 395-411).
- 7.3. Il-valuri R_f elenkati fit-tabelli segwenti jservu bhala indikazzjoni tal-valuri li jistgħu jkunu miksuba:

Tahlita	hR_f	Kulur
Acidu 4-hydroxybenzoic	11	aħmar
Methylparaben	12	aħmar
Ethylparaben	17	aħmar
Propylparaben	21	aħmar
Butylparaben	26	aħmar
Benzylparaben	16	aħmar
2-phenoxyethanol	29	isfar
1-phenoxypropan-2-ol	50	isfar

- 7.4. Ma tinkiseb ebda separazzjoni għal acidu 4-hydroxybenzoic u methylparaben, jew għal benzylparaben u ethylparaben. L-identifikazzjoni ta' dawn il-kompożizzjonijiet għandha tiġi konfermata billi jsir il-metodu HPLC taht is-Sezzjoni B u billi jitqabbel l-hinijiet ta' ritenzjoni miksubin mill-kampjun ma' dawk l-standards.

B. DETERMINAZZJONI

1. Għan u qasam ta' applikazzjoni

Dan il-metodu jispeċifika proċedura għad-determinazzjoni ta' 2-phenoxyethanol, 1-phenoxypropan-2-ol, methyl 4-hydroxybenzoate, ethyl 4-hydroxybenzoate, propyl 4-hydroxybenzoate, butyl 4-hydroxybenzoate u benzyl 4-hydroxybenzoate fi prodotti kosmetiċi.

2. Definizzjonijiet

L-ammonti ta' preservattivi stabbiliti b'dan il-metodu huma mfissra bhala persentaġġ skond il-piż.

3. Princġipju

Il-kampjun huwa acidifat billi jżjed l-acidu sulfuriku u mbagħad jithalla f'tahlita ta' ethanol u ilma. Wara li ssahhan it-tahlita bil-mod biex iddeweb il-faži lipida biex tippromwovi estrazzjoni kwantitattiva, it-tahlita tiġi iffiltrata.

Il-preservattivi fil-filtrat jiġu stabbiliti bil-faži HPLC b'lura bl-użu ta' l-isopropyl 4-hydroxybenzoate bhala l-*standard* intern.

4. Reaġenti

4.1. Ġenerali

Ir-reagenti kollha għandhom ikunu ta' purità analitika u tajbin għall-HPLC fejn xieraq. L-ilma għandu jkun ilma iddistillat, jew ilma li jkollu purità li tkun għallinqas ugwali.

4.2. Ethanol, assolut

4.3. 2-Phenoxyethanol

4.4. 1-Phenoxypropan-2-ol

- 4.5. Methyl 4-hydroxybenzoate (methylparaben)
 - 4.6. Ethyl 4-hydroxybenzoate (ethylparaben)
 - 4.7. n-Propyl 4-hydroxybenzoate (propylparaben)
 - 4.8. Benzyl 4-hydroxybenzoate (isopropylparaben)
 - 4.9. n-Butyl 4-hydroxybenzoate (butylparaben)
 - 4.10. Benzyl 4-hydroxybenzoate (benzylparaben)
 - 4.11. Tetrahydrofuran
 - 4.12. Methanol
 - 4.13. Acetonitrile
 - 4.14. Soluzzjoni ta' aċidu sulfuriku, $c(H_2SO_4=2\text{mol/l})$
 - 4.15. Tahlita ta' ethanol/ilma
Hallat disa' volumi ta' ethanol (4.2) u volum wiehed ta' ilma.
 - 4.16. Soluzzjoni *standard* interna
Iżen bi preċiżjoni bejn wiehed u iehor 0,25 g isopropylparaben (4.8), ittrasferixxih għal flixxun volumetriku ta' 500-ml, dewweb u žid għall-volum bit-tahlita ta' ethanol/ilma (4.15).
 - 4.17. Fażi mobbli: tahlita ta' tetrahydrofuran/ilma/methanol/acetoneitrile
Hallat 5 volumi ta' tetrahydrofuran, 60 volum ta' ilma, 10 volumi ta' methanol u 25 volum ta' acetoneitrile.
 - 4.18. Soluzzjoni ta' stokk preservattiv
Iżen sewwa madwar 0,2 g 2-phenoxyethanol, 0,2 g 1-phenoxypropan-2-ol, 0,05 g methylparaben, 0,05 g ethylparaben, 0,05 g propyl paraben, 0,05 butylparaben u 0,25 g benzylparaben fi flixxun volumetriku ta' 100-ml, dewweb u wassal sal-volum bit-tahlita ta' ethanol/ilma.
Miżmuma fi friġġ is-soluzzjoni tibqa' stabbli għal ġimgħa.
 - 4.19. Soluzzjonijiet ta' preservattivi *standard*
Mis-soluzzjoni ta' l-istokk (4.18) ittrasferixxi rispettivament 20,00 ml, 10,00 ml, 5,00 ml, 2,00 ml u 1,00 ml fi flixxen volumetriki ta' 50-ml. F'kull flixxun, žid 10,00 ml soluzzjoni interna *standard* (4.16) u 1,0 ml soluzzjoni ta' aċidu sulfuriku (4.14) u wassal sal-volum b'tahlita ta' ethanol/ilma. Dawn is-soluzzjonijiet għandhom jiġu ippreparati friski.
5. **Apparat**
Apparat tal-laboratorju normali, u
- 5.1. Banju ta' l-ilma, li jkun jista' jżomm temperatura ta' $60\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$.
 - 5.2. Kromatografija tal-likwidu ta' rendiment għoli b'detector ta' l-UV, b'wavelength 280 nm
 - 5.3. Kolonna analitika:
Stainless steel, 25 cm x 4,6 mm i.d. (jew 12,5 cm x 4,6 mm I'd.) ippakkjat bin-Nucleosil 5C18, jew ekwivalenti (ara 10.1)
 - 5.4. tubi tal-ħġieġ 100-ml b'tap bil-kamin
 - 5.5. Chips jagħlu, carborundum, ta' daqs ta' 2 sa 4 mm, jew ekwivalenti
6. **Proċedura**
- 6.1. Preparazzjoni tal-kampjun
 - 6.1.1. Preparazzjoni tal-kampjun mingħajr iż-żjieda ta' l-*standard* intern
Iżen madwar 1,0 g ta' kampjun ftubu tal-ħġieġ 100-ml b'tapp bil-kamin. Qattar 1,0 ml soluzzjoni ta' aċidu sulfuriku (4.14) u 50,0 ml tahlita ta' ethanol, ilma (4.15) fit-tubi. Žid madwar 1 g chips jagħlu (5.5), għalaq it-tubi u hawwadhom b'saħħa sakemm tinkiseb kompożizzjoni omogenja. Hawwad għallinqas għal minuta. Poġġi t-tubu għal hames minuti f'banju ilma (5.1) miżmum f' $60\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ biex tkun iffaċilitata l-estrazzjoni tal-preservattivi fil-fażi ta' l-ethanol.
Berred it-tubu mal-ewwel taht nixxiegha ta' ilma kiesaħ u aħżen l-estratt fil-friġġ għal siegħa. Iffiltra l-estratt bl-użu ta' karta filtru. Ittrasferixxi madwar 2 ml tal-filtrat f'kunjett tal-kampjun ta' 5-ml. Aħżen l-estratt fil-friġġ u wettaq id-determinazzjoni tal-HPLC fi żmien erbgha u għoxrin siegħa.

6.1.2. Preparazzjoni tal-kampjun li tinkludi l-*istandard* intern

Iżen sa tliet postijiet deċimali $1,0 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$ ta' kampjun f'tubu tal-ħġieġ ta' 100-ml b'tapp bil-kamin.

Qattar 1,0 ml soluzzjoni ta' aċidu sulfuriku u 40,0 ml ta' tahlita ta' ethanol/ilma fit-tubu. Żid madwar 1 g chips jagħlu (5.5) u eżattament 10,00 ml soluzzjoni *standard* interna. Aghlaq it-tubu u ħawwad b'sahha sakemm tinkiseb sospensjoni omoġenja. Ħawwad għallinqas għal minuta. Poġġi t-tubu għal ħames minuti ġewwa banju ilma miżmum f' $60 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ biex tiffacilita l-estrazzjoni tal-preservattivi fil-fażi ta' l-ethanol.

Berred mal-ewwel it-tubu taħt nixxieġha ta' ilma kiesah u ahżen l-estratt fil-frigġ għal siegħa. Iffiltra l-estratt bl-użu ta' karta filtru.

Ittrasferixxi madwar 2 ml tal-filtrat f'kunjett tal-kampjun ta' 5-ml (soluzzjoni tat-test). Ahżen l-estratt fil-frigġ u wettaq id-determinazzjoni tal-HPLC fi żmien erbġha u għoxrin siegħa.

6.2. Kromatografija tal-likwidu ta' rendiment għoli (HPLC)

6.2.1. Kondizzjonijiet kromatografiċi

— Fażi mobbli: tahlita ta' tetrahydrofuran/ilma/methanol/acetone (4.17)

— Rata tat-tnixxija: 1,5 ml/il-minuta

— Detection wavelength: 280 nm

6.2.2. Kalibrazzjoni

Injetta $10 \mu\text{l}$ ta' kull waħda mis-soluzzjonijiet tal-preservattivi *standard* (4.19). Mill-kromatogrammi miksubin ikkalkula l-proporzjon ta' l-ogħla pożizzjonijiet tas-soluzzjonijiet tal-preservattivi *standard* għall-ogħla pożizzjoni ta' l-*istandard* intern. Ipplojta kurva għal kull preservattiv relatat ma' dawn il-proporzjonijiet għall-konċentrazzjonijiet tas-soluzzjonijiet *standard*.

6.2.3. Determinazzjoni

Injetta $10 \mu\text{l}$ tas-soluzzjoni tal-kampjun mingħajr *standard* intern (6.1.1) fil-kromatograf u rrekordja l-kromatogramm.

Injetta $10 \mu\text{l}$ ta' waħda mis-soluzzjonijiet tal-preservattivi *standard* (4.19) u rrekordja l-kromatogramm. Qabel il-kromatogrammi miksubin.

Jekk, fil-kromatogramm ta' l-estratt tal-kampjun (6.1.1), ma jkun hemm ebda quċċata li jkollha bejn wiehed u iehor l-istess hin ta' retenzjoni ta' l-isopropylparaben (*standard* intern rakkommandat), kompli billi tinjetta $10 \mu\text{l}$ soluzzjoni tal-kampjun ma' l-*istandard* intern (6.1.2). Irrekordja l-kromatogramm u kejjel l-ogħla pożizzjonijiet.

Jekk tkun osservata pożizzjoni għolja li tinterferixxi fil-kromatogramma tas-soluzzjoni tal-kampjun li jkollha bejn wiehed u iehor l-istess hin ta' retenzjoni, għandu jkun magħżul *standard* intern iehor.

Jekk wiehed mill-preservattivi li jkun qiegħed jiġi eżaminat ikun nieqes fil-kromatogramma tal-kampjun, dan il-preservattiv jista' jintuża bħala *standard* intern alternattiv.

Ikkalkula l-proporzjonijiet tal-qċaċet tal-preservattivi investigati ma' l-ogħla pożizzjoni ta' l-*istandard* intern.

Aċċerta li għas-soluzzjonijiet *standard* użati fil-proċedura tal-kalibrar tkun miksuba twegiba lineari.

Aċċerta jekk il-kromatogrammi miksuba għal soluzzjoni *standard* u s-soluzzjoni tal-kampjun jissodisfawx il-kondizzjonijiet li ġejjin:

— l-akbar separazzjoni ta' l-aġħar par mifrud għandha tkun ta' l-inqas 0,90. (Għad-definizzjoni ta' l-akbar separazzjoni, ara l-Figura 1).

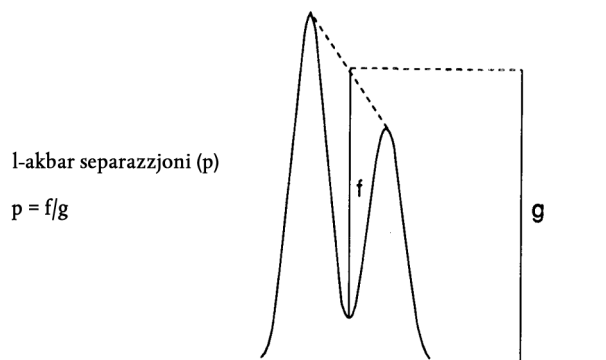


Figura 1: L-akbar separazzjoni

Jekk ma tkunx miksuba s-separazzjoni mehtieġa, jew għandha tintuża kolonna iktar effiċjenti, jew il-kompożizzjoni tal-fażi mobbli għandha tkun aġġustata sakemm jintlahaq dak mitlub.

- il-fattur assimetriku A_s ta' l-oġġla pożizzjonijiet kollha miksubin għandu jkun mifrux bejn 0,9 sa 1,5. (Għad-definizzjoni tal-fattur assimetriku tal-quċċata, ara l-Figura 2). Biex tirrekordja l-kromatogramm għad-determinazzjoni tal-fattur assimetriku huwa ta' min tintuża chart speed ta' għallinqas ta' 2 cm/il-minuta.

Asymmetry factor (A_s)

$$A_s = b/a$$

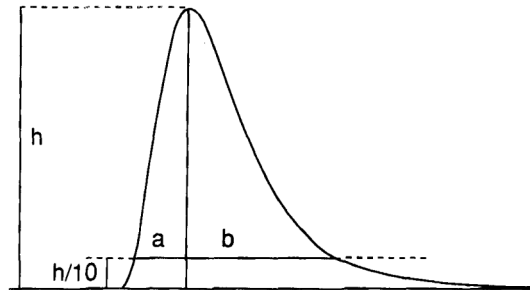


Figura 2: Peak asymmetry factor

- Għandha tinkiseb linja ta' bazi kostanti

7. Kalkolazzjoni

Uża l-kurva ta' kalibrar (6.2.2) u l-proporzjonijiet ta' l-oġġla pożizzjonijiet tal-preservattivi investigati għall-oġġla pożizzjoni ta' l-istandard intern biex tikkalkula l-koncentrazzjoni tal-preservattivi fis-soluzzjoni tal-kampjun. Ikkalkula l-kontenut ta' 2-phenoxyethanol, 1-phenoxypropan-2-ol, methyl 4-hydroxybenzoate, ethyl 4-hydroxybenzoate, propyl 4-hydroxybenzoate, butyl 4-hydroxybenzoate u benzyl 4-hydroxybenzoate, wi, bhala persentaġġ skond il-piż (% m/m), bl-użu tal-formula:

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

FORMULA

b_i = il-koncentrazzjoni (ġg/ml) tal-preservattiv i fis-soluzzjoni tat-test kif jinqara mill-kurva ta' kalibrar; u

a = il-piż (g) tal-pożizzjoni tat-test.

8. Ripetibilità ⁽¹⁾

Ara r-rimarki, 10.5.

9. Riproduċibilità ⁽¹⁾

Ara r-rimarki, 10.5.

10. Rimarki

10.1. Fażi stazzjonarja

L-imġieba taż-żamma tas-sustanzi mahlula fid-determinazzjoni ta' l-HPLC hija dipendenti hafna fuq it-tip, il-kwalità u l-istorja tal-fażi stazzjonarja. Tistax tintuża kolonna għas-separazzjoni tal-preservattivi li jkunu qegħdin jiġu eżaminati, tista' tkun konkluzja mir-riżultati miksuba għas-soluzzjonijiet *standard* (ara r-rimarki 6.2.3). Flimkien mal-materjal ta' l-ippakkjar tal-kolonna proposta, instab li l-Hypersil ODS u z-Zorbax ODS kienu wkoll tajbin.

Inkella, il-kompożizzjoni tal-fażi mobbli rakkommandata tista' tkun imtejba sabiex tinkiseb is-separazzjoni mehtieġa.

10.2. Detection wavelength

Test ta' awsterità fuq il-metodu deskritt wera li bidla żgħira fid-detection wavelength jista' jkollha effett sinnifikanti fuq ir-riżultati tad-determinazzjoni.

Għalhekk, dan il-parametru għandu jiġi ikkontrollat sewwa waqt l-analizi.

⁽¹⁾ ISO 5725

10.3. Interferenzi

Taht il-kondizzjonijiet deskritti f'dan il-metodu hafna kompożizzjonijiet oħra, bħal priservattivi u addittivi kosmetiċi huma wkoll elużjonati. Il-hinijiet ta' żamma ta' numru kbir ta' preservattivi msemmija fl-Anness VI tad-Direttiva tal-Kunsill dwar prodotti kosmetiċi huma elenkati fi: N. de Kruijf, M. A. H. Rijk, A. Prinato-Soetardhi u A. Schouten (1989). Determinazzjoni ta' priservattivi fi prodotti kosmetiċi II: Identifikazzjoni kromatografika tal-likwidu ta' rendiment għoli (J. Chromatography 469, 317-398).

10.4. Biex tipprogetta l-kolonna analitika tista' tintuża kolonna gwida xierqa.

10.5. Il-metodu ġie investigat fi prova kollaborattiva li fiha hadu sehem disa' laboratorji. Ġew analizzati tliet kampjuni. It-tabella segwenti fiha, għal kull wieħed mit-tliet kampjuni, il-mezzi f% m/m (m), ripetibilitajiet (r), riproducibilitajiet (R) misjuba għall-analytes li kien fihom:

Sample		2-Fenoxyethanol	1-Fenoxypropan-2-ol	Methylparaben	Ethylparaben	Propylparaben	Butylparaben	Benzylparaben
Vitamin cream	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	
Vanishing cream	m	1,196		0,266	0,076			
	r	0,040		0,003	0,002			
	R	0,147		0,022	0,004			
Massage cream	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