SEITSEMÄS KOMMISSION DIREKTIIVI 96/45/EY,

annettu 2 päivänä heinäkuuta 1996,

kosmeettisten valmisteiden koostumuksen tarkastamisessa tarvittavista analyysimenetelmistä

(ETA:n kannalta merkityksellinen teksti)

EUROOPAN YHTEISÖJEN KOMISSIO, joka

ottaa huomioon Euroopan yhteisön perustamissopimuksen,

ottaa huomioon kosmeettisia valmisteita koskevan jäsenvaltioiden lainsäädännön lähentämisestä 27 päivänä heinäkuuta 1976 annetun neuvoston direktiivin 76/768/ETY ([1]), sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna komission direktiivillä 95/34/EY ([2]), ja erityisesti sen 8 artiklan 1 kohdan,

sekä katsoo, että

direktiivissä 76/768/ETY säädetään kosmeettisten valmisteiden virallisista tarkastuksista kosmeettisten valmisteiden koostumusta koskevien yhteisön säännösten mukaisesti asetettujen vaatimuksien noudattamisen toteamiseksi,

kaikki tarvittavat analyysimenetelmät olisi vahvistettava niin pian kuin mahdollista; tietyt menetelmät on jo annettu komission direktiivillä 80/1335/ETY ([3]), sellaisena kuin se on muutettuna direktiivillä 87/143/ETY ([4]), komission direktiivillä 82/434/ETY ([5]), sellaisena kuin se on muutettuna direktiivillä 90/207/ETY ([6]), ja komission direktiiveillä 83/514/ETY ([7]), 85/490/ETY ([8]), 93/73/ETY ([9]) ja 95/32/EY ([10]),

2-fenoksietanolin, 1-fenoksipropan-2-olin, metyyli-, etyyli-, propyyli-, butyyli- ja bentsyyli-4-hydroksibentsoaatin tunnistaminen ja määrittäminen muodostavat seitsemännen vaiheen, ja

tässä direktiivissä säädetyt toimenpiteet ovat direkitivin 76/768/ETY mukauttamista tekniikan kehitykseen käsittelevän komitean lausunnon mukaiset,

ON ANTANUT TÄMÄN DIREKTIIVIN:

1 artikla

Jäsenvaltioiden on toteutettava kaikki tarvittavat tomenpiteet sen varmistamiseksi, että kosmeettisten valmisteiden virallisessa tarkastuksessa 2-fenoksietanolin, 1-fenoksipropan-2-olin, metyyli-, etyyli-, propyyli-, butyyli- ja bentsyyli-4-hydroksibentsoaatin tunnistaminen ja määrittäminen suoritetaan liitteessä selostettujen menetelmien mukaisesti.

2 artikla

1. Jäsenvaltioiden on saatettava tämän direktiivin noudattamisen edellyttämät lait, asetukset ja hallinnolliset määräykset voimaan viimeistään 30 päivänä syyskuuta 1997. Niiden on ilmoitettava tästä komissiolle viipymättä.

2. Näissä jäsenvaltioiden antamissa säädöksissä on viitattava tähän direktiiviin tai niitä virallisesti julkistaessa niihin on liitettävä viittaus tähän direktiiviin. Jäsenvaltioiden on säädettävä siitä, miten viittaukset tehdään.

3. Jäsenvaltioiden on toimitettava tässä direktiivissä tarkoitetuista seikoista antamansa kansalliset säännökset kirjallisina komissiolle.

3 artikla

Tämä direktiivi tulee voimaan kahdentenakymmenentenä päivänä sen jälkeen, kun se on julkaistu *Euroopan yhteisöjen virallisessa lehdessä.*

4 artikla

Tämä direktiivi on osoitettu kaikille jäsenvaltioille.

Tehty Brysselissä 2 päivänä heinäkuuta 1996.

Komission puolesta

Emma BONINO

Komission jäsen

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

LIITE

2-FENOKSIETANOLIN, 1-FENOKSIPROPAN-2-OLIN, METYYLI-, ETYYLI-, PROPYYLI-, BUTYYLI- JA BENTSYYLI-4-HYDROKSIBENTSOAATIN TUNNISTUS JA MÄÄRITYS KOSMEETTISISTA VALMISTEISTA

A. TUNNISTUS

1. **Soveltamisala**

Tässä esitetyllä ohutkerroskromatografia-menettelyllä yhdessä B jaksossa esitetyn määritysmenetelmän kanssa voidaan tunnistaa 2-fenoksietanoli, 1-fenoksipropan-2-oli, metyyli-4-hydroksibentsoaatti, etyyli-4-hydroksibentsoaatti, propyyli-4-hydroksibentsoaatti, butyyli-4-hydroksibentsoaatti ja bentsyyli-4-hydroksibentsoaatti kosmeettisissa valmisteissa.

2. **Periaate**

Säilöntäaineet uutetaan happamaksi tehdystä kosmeettisesta näytteestä asetonin avulla. Suodattamisen jälkeen asetoniliuos sekoitetaan veteen, ja rasvahapot saostuvat emäksisessä liuoksessa kalsiumsuoloikseen. Emäksistä asetoni/vesiseosta uutetaan dietyylieetterillä lipofiilisten aineiden poistamiseksi. Happamaksi tekemisen jälkeen säilöntäaineet uutetaan dietyylieetterillä. Sopiva määrä dietyylieetteriuutetta tiputetaan täpliksi silikageelipäällysteiselle ohutkerroslevylle. Kun levy on kehitetty, saatua kromatogrammia tutkitaan UV-valossa ja se värjätään Millonin reagenssin avulla.

3. **Reagenssit**

3.1 Yleistä

Kaikkien käytettävien reagenssien on oltava analyysilaatua. Veden on oltava tislattua vettä tai vähintään yhtä puhdasta.

3.2 Asetoni.

3.3 Dietyylieetteri.

3.4 n-pentaani.

3.5 Metanoli.

3.6 Jääetikka.

3.7 Suolahappoliuos, c(HCl) = 4 mol/l.

3.8 Kaliumhydroksidiliuos, c(KOH) = 4mol/l.

3.9 Kalsiumkloridihydraatti ($CaCl_2.2H_2O$).

3.10 Ilmaisinreagenssi: Millonin reagenssi

Millonin reagenssi (elohopea(II)nitraatti) on valmis kaupallisesti saatavilla oleva liuos (Fluka 69820).

3.11 2-fenoksietanoli.

3.12 1-fenoksipropan-2-oli.

3.13 Metyyli-4-hydroksibentsoaatti (metyyliparabeeni).

3.14 Etyyli-4-hydroksibentsoaatti (etyyliparabeeni).

3.15 n-propyyli-4-hydroksibentsoaatti (propyyliparabeeni).

3.16 n-butyyli-4-hydroksibentsoaatti (butyyliparabeeni).

3.17 Bentsyyli-4-hydroksibentsoaatti (bentsyyliparabeeni).

3.18 Vertailuliuokset

Valmistetaan 0,1 %:n (m/V) metanoliliuos erikseen jokaisesta 3.11, 3.12, 3.13, 3.14, 3.15, 3.16 ja 3.17 kohdan vertailuaineesta.

3.19 Kehiteliuos

Sekoitetaan 88 tilavuusosaa n-pentaania (3.4) ja 12 (3.6) tilavuusosaa jääetikkaa.

4. **Laitteet**

Tavalliset laboratoriovälineet ja:

4.1 Vesihaude, jossa voidaan pitää yllä 60 °C:n lämpötila.

4.2 Kehitysastia (ei vuorattu suodatinpaperilla).

4.3 Ultraviolettivalon lähde, 254 nm.

4.4 Ohutkerroslevyjä, 20 cm × 20 cm, esipäällystetty 0,25 mm:n silikageelikerroksella 60 F_{254}, varustettu väkevöintivyöhykkeellä (Merck N:o 11798, Darmstadt tai vastaava).

4.5 Uuni, jossa voidaan pitää yllä lämpötiloja 105 °C:seen asti.

4.6 Kuumailmahiustenkuivain.

4.7 Villainen maalaustela, pituus noin 10 cm, ulkohalkaisija noin 3,5 cm. Villakerroksen paksuuden on oltava 2—3 mm. Tasoitetaan villaa tarvittaessa. (Katso huomautus 5.2 kohdassa.)

4.8 50 ml:n kierrekorkillisia lasiputkia.

4.9 Sähkölämpölevy, jossa termostaattinen lämpötilansäädin. Lämpötila-asetus: noin 80 °C. Levyn on oltava peitetty 20 cm × 20 cm:n alumiinilevyllä ja sen paksuuden on oltava noin 6 mm, jotta lämpö jakaantuu tasaisesti.

5. **Menettely**

5.1 Näytteen käsittely

Punnitaan noin 1 g näytettä 50 ml:n kierrekorkilliseen lasiputkeen (4.8). Lisätään 4 tippaa suolahappoliuosta (3.7) ja 40 ml asetonia.

Voimakkaasti emäksisiin kosmeettisiin tuotteisiin, kuten kasvosaippuaan, lisätään 20 tippaa suolahappoliuosta. Suljetaan putki, lämmitetään seos varovasti noin 60 °C:seen, jotta säilöntäaineet saataisiin helpommin uutettua asetonifaasiin, ja ravistetaan voimakkaasti minuutin ajan.

Mitataan liuoksen pH pH-indikaattoripaperilla ja säädetään liuoksen happamuus suolahappoliuoksella enintään pH-arvoon 3. Ravistetaan jälleen voimakkaasti minuutin ajan.

Jäähdytetään liuos huoneen lämpötilaan ja suodatetaan suodatinpaperin läpi erlenmeyerpulloon. Siirretään 20 ml suodoksesta 200 ml:n erlenmeyerpulloon, lisätään 60 ml vettä ja sekoitetaan. Säädetään seoksen pH kaliumhydroksidiliuoksella (3.8) noin 10:een pH-indikaattoripaperia käyttämällä.

Lisätään 1 g kalsiumkloridihydraattia (3.9) ja ravistetaan voimakkaasti. Suodatetaan liuos suodatinpaperin lävitse 250 ml:n erotussuppiloon, joka sisältää 75 ml dietyylieetteriä, ja ravistetaan voimakkaasti minuutin ajan. Annetaan faasien erottua ja kerätään vesikerros 200 ml:n erlenmeyerpulloon. Säädetään liuoksen pH suolahappoliuoksella noin 2:een pH-indikaattoripaperia käyttämällä. Lisätään seuraavaksi 10 ml dietyylietteriä ja ravistetaan voimakkaasti minuutin ajan. Annetaan faasien erottua ja siirretään noin 2 ml dietyylieetterikerroksesta 5 ml:n näytepulloon.

5.2 Ohutkerroskromatografia

Asetetaan TLC-levy (4.4) kuumennetulle alumiinilevylle (4.9). Lisätään 10 µl kutakin vertailuliuosta (3.18) ja 100 µl näyteliuosta (näyteliuoksia) (5.1) TLC-levyn väkevöintivyöhykkeen lähtöviivalle.

Haluttaessa voidaan käyttää ilmavirtaa helpottamaan liuottimen haihtumista. Siirretään TLC-levy pois lämpölevyltä ja annetaan jäähtyä huoneen lämpötilaan. Siirretään 100 ml kehiteliuosta (3.19) kehitysastiaan (4.2). Asetetaan TLC-levy välittömästi kyllästämättömään kammioon ja kehitetään huoneen lämpötilassa, kunnes liuos on noussut noin 15 cm lähtöviivasta. Siirretään levy pois kehitysastiasta ja kuivataan kuumalla ilmalla kuumailmahiustenkuivaimen avulla.

Tutkitaan levyä UV-valossa (4.3) ja merkitään täplien sijainti. Kuumennetaan levyä 30 minuutin ajan uunissa (4.5) 100 °C:ssa liian etikkahapon poistamiseksi. Värjätään kromatogrammin säilöntäaineet Millonin reagenssilla (3.10) kastamalla maalitela (4.7) reagenssiin ja levittämällä TLC-levylle, kunnes se on tasaisen kostea.

Huomaa: Täplät voidaan vaihtoehtoisesti värjätä lisäämällä varovaisesti tippa Millonin reagenssia kuhunkin UV-valon alla merkittyyn täplään.

4-hydroksibentsoehapon esterit näkyvät punaisina täplinä, 2-fenoksietanoli ja 1-fenoksipropan-2-oli keltaisina täplinä. On kuitenkin huomattava, että itse 4-hydroksibentsoehappo, jota voi olla näytteissä säilöntäaineena tai parabeenien hajoamistuotteena, näkyy myös punaisena täplänä. Katso 7.3 ja 7.4.

6. **Tunnistus**

Lasketaan kunkin täplän R_f-arvo. Verrataan näyteliuoksesta saatuja täpliä vertailuliuoksen täpliin niiden R_f-arvon, niiden UV-säteilyn alaisen käyttäytymisen ja värjäämisen jälkeisen värin suhteen. Tehdään alustavia johtopäätöksiä säilöntäaineista. Jos parabeeneja näyttää olevan mukana, on tehtävä B jaksossa esitetty HPLC-menettely. Yhdistetään TLC:n ja HPLC:n tulokset 2-fenoksietanolin, 1-fenoksipropan-2-olin ja parabeenien esiintymisen vahvistamiseksi.

7. **Huomautukset**

7.1 Koska Millonin reagenssi on myrkyllistä, tämä reagenssi on paras levittää jollakin esitetyistä menettelyistä. Ruiskuttaminen ei ole suositeltavaa.

7.2 Muut hydroksyyliryhmiä sisältävät yhdisteet voivat myös näkyä värillisinä Millonin reagenssilla käsiteltyinä. Muutamista säilöntäaineista tällä TLC-menettelyllä saaduista väreistä ja R_f-arvoista on taulukko: N. de Kruijf, M.A.H. Rijk, L.A. Pranato-Soetardhi y A. Schouten (1987): Determination of preservatives in cosmetic products I: Thin layer chromatographic procedure for the identification of preservatives in cosmetic products (J. Chomatoghraphy 410, 395-411).

7.3 Seuraavassa taulukossa luetellut R_f-arvot osoittavat, millaisia arvoja voidaan saada:

Yhdiste	hR_f	Väri
4-hydroksibentsoehappo	11	punainen
metyyliparabeeni	12	punainen
etyyliparabeeni	17	punainen
propyyliparabeeni	21	punainen
butyyliparabeeni	26	punainen
bentsyyliparabeeni	16	punainen
2-fenoksietanoli	29	keltainen
1-fenoksipropan-2-oli	50	keltainen

7.4 4-hydroksibentsoehappoa ja metyyliparabeenia taikka bentsyyliparabeenia ja etyyliparabeenia ei saada eroteltua. Näiden yhdisteiden tunnistus on vahvistettava käyttämällä B jaksossa esitettyä HPLC-menetelmää ja vertaamalla näytteelle saatuja retentioaikoja standardien aikoihin.

B. MÄÄRITYS

1. **Soveltamisala**

Tällä menettelyllä määritetään 2-fenoksietanoli, 1-fenoksipropan-2-oli, metyyli-4-hydroksibentsoaatti, etyyli-4-hydroksibentsoaatti, propyyli-4-hydroksibentsoaatti, butyyli-4-hydroksibentsoaatti ja bentsyyli-4-hydroksibentsoaatti kosmeettisissa valmisteissa.

2. **Määritelmä**

Tällä menetelmällä määritetyt säilöntäaineiden määrät ilmaistaan painoprosentteina.

3. **Periaate**

Näyte tehdään happamaksi lisäämällä rikkihappoa ja suspendoidaan sitten etanolin ja veden seokseen. Kun seosta on varovasti kuumennettu lipidifaasin sulattamiseksi kvantitatiivisen uuttamisen edistämiseksi, seos suodatetaan.

Suodoksessa olevat säilöntäaineet määritetään käänteisfaasi-HPLC:llä käyttämällä isopropyyli-4-hydroksibentsoaattia sisäisenä standardina.

4. **Reagenssit**

4.1 Yleistä

Kaikkien reagenssien on oltava analyysilaatua ja sovelluttava tarvittaessa HPLC:hen. Veden on oltava tislattua vettä tai vähintään yhtä puhdasta.

4.2 Absoluuttinen etanoli.

4.3 2-fenoksietanoli.

4.4 1-fenoksipropan-2-oli.

4.5 Metyyli-4-hydroksibentsoaatti (metyyliparabeeni).

4.6 Etyyli-4-hydroksibentsoaatti (etyyliparabeeni).

4.7 n-propyyli-4-hydroksibetsoaatti (propyyliparabeeni).

4.8 Isopropyyli-4-hydroksibentsoaatti (isopropyyliparabeeni).

4.9 n-butyyli-4-hydroksibentsoaatti (butyyliparabeeni).

4.10 Bentsyyli-4-hydroksibentsoaatti (bentsyyliparabeeni).

4.1 Tetrahydrofuraani.

4.12 Metanoli.

4.13 Asetonitriili.

4.14 Rikkihappoliuos, $c(H_2SO_4) = 2 mol/l$.

4.15 Etanoli/vesiseos

Sekoitetaan 9 tilavuusosaa etanolia (4.2) ja 1 tilavuusosa vettä.

4.16 Sisäinen standardiliuos

Punnitaan tarkasti noin 0,25 g isopropyyliparabeenia (4.8), siirretään 500 ml:n mittapulloon, liuotetaan ja täytetään etanoli/vesiseoksella (4.15).

4.17 Liikkuva faasi: tetrahydrofuraani/vesi/metanoli/asetonitriili-seos

Sekoitetaan 5 tilavuusosaa tetrahydrofuraania, 60 tilavuusosaa vettä, 10 tilavuusosaa metanolia ja 25 tilavuusosaa asetonitriiliä.

4.18 Säilöntäaineperusliuos

Punnitaan tarkasti noin 0,2 g 2-fenoksietanolia, 0,2 g 1-fenoksipropan-2-olia, 0,05 g metyyliparabeenia, 0,05 g etyyliparabeenia, 0,05 g propyyliparabeenia, 0,05 g butyyliparabeenia ja 0,025 g bentsyyliparabeenia 100 ml:n mittapulloon, liuotetaan ja täytetään etanoli/vesiseoksella.

Jääkaapissa säilytettynä liuos pysyy stabiilina viikon ajan.

4.19 Standardisäilöntäaineliuokset

Siirretään erikseen 20,00 ml, 10,00 ml, 5,00 ml, 2,00 ml ja 1,00 ml perusliuosta (4.18) 50 ml:n mittapulloihin. Lisätään kuhunkin pulloon 10,00 ml sisäistä standardiliuosta (4.16) ja 1,00 ml rikkihappoliuosta (4.14) ja täytetään pullot etanoli/vesiseoksella. Näiden liuosten on oltava vasta valmistettuja.

5. Laitteet

Tavalliset laboratoriovälineet ja:

5.1 Vesihaude, jossa voidaan pitää yllä 60 °C ± 1 °C:n lämpötila.

5.2 HPLC-kromatografia, jossa on UV-detektori, aallonpituus 280 nm.

5.3 Analyysikolonni:

Ruostumatonta terästä, sisähalkaisija 25 cm × 4,6 mm (tai 12,5 cm × 4,6 mm), pakattu Nucleosil 5C18:lla tai vastaavalla (katso 10.1).

5.4 100 ml:n kierrekorkillisia lasiputkia.

5.5 Kiehumakiviä, karborundum, koko 2—4 mm, tai vastaava.

6. Menettely

6.1 Näytteen käsittely

6.1.1 Näytteen käsittely sisäistä standardia lisäämättä

Punnitaan noin 1,0 g näytettä 100 ml:n kierrekorkilliseen lasiputkeen. Pipetoidaan 1,0 ml rikkihappoliuosta (4.14) ja 50,0 ml etanoli/vesiseosta (4.15) putkiin. Lisätään noin 1 g kiehumakiviä (5.5), suljetaan putki ja ravistetaan voimakkaasti, kunnes saadaan homogeeninen suspensio. Ravistetaan vähintään minuutin ajan. Asetetaan putki viideksi minuutiksi vesihauteeseen (5.1), jonka lämpätila on 60 °C ± 1 °C, jotta säilöntäaineiden uuttaminen etanolifaasiin olisi helpompaa.

Jäähdytetään putki välittömästi kylmän veden alla ja laitetaan uute jääkaappiin tunniksi. Suodatetaan uute suodatinpaperin avulla. Siirretään noin 2 ml suodoksesta 5 ml:n näytepulloon. Säilytetään uutteita jääkaapissa ja tehdään HPLC-määritys 24 tunnin kuluessa.

6.1.2 Näytteen käsittely ja sisäisen standardin lisäys

Punnitaan kolmen desimaalin tarkkuudella 1,0 g ± 0,1 g näytettä (a grammaa) 100 ml:n kierrekorkilliseen lasiputkeen.

Pipetoidaan 1,0 ml rikkihappoliuosta ja 40,0 ml etanoli/vesiseosta putkeen. Lisätään noin 1 g kiehumakiviä ja tarkalleen 10,00 ml sisäistä standardiliuosta. Suljetaan putki ja ravistetaan voimakkaasti, kunnes saadaan homogeeninen suspensio. Ravistetaan vähintään minuutin ajan. Laitetaan putki viideksi minuutiksi vesihauteeseen, jonka lämpötila on 60 °C ± 1 °C, jotta säilöntäaineiden uuttaminen etanolifaasiin olisi helpompaa.

Jäähdytetään putki välittömästi kylmän vesijohdon alla ja laitetaan uute jääkaappiin tunniksi. Suodatetaan uute suodatinpaperin avulla.

Siirretään noin 2 ml suodoksesta 5 ml:n näytepulloon (koeliuos). Säilytetään uutetta jääkaapissa ja tehdään HPLC-määritykset 24 tunnin kuluessa.

6.2 HPLC-kromatografia

6.2.1 Kromatografiaolosuhteet

— Liikkuva faasi: tetrahydrofuraani/vesi/metanoli/asetonitriili-seos (4.17)

— Virtausnopeus: 1,5 ml/minuutti

— Detektointiaallonpituus: 280 nm.

6.2.2 Kalibrointi

Injektoidaan 10 µl kutakin standardisäilöntäaineliuosta (4.19). Määritetään saaduista kromatogrammeista standardisäilöntäaineliuosten piikkien korkeuksien suhde sisäisen standardin piikkien korkeuteen. Piirretään kutakin säilöntäainetta varten käyrä, joka esittää nämä suhteet standardiliuosten pitoisuuden funktiona.

6.2.3 Määritys

Injektoidaan 10 µl näyteliuosta, johon ei ole lisätty sisäistä standardia (6.1.1) kromatografiin ja ajetaan kromatogrammi.

Injektoidaan 10 µl jotakin standardisäilöntäaineliuosta (4.19) ja ajetaan kromatogrammi. Verrataan saatuja kromatogrammeja.

Jos näyteuutteen (6.1.1) kromatogrammissa ei ole piikkiä, jolla on suunnilleen sama retentioaika kuin isopropyyliparabeenilla (suositeltu sisäinen standardi), jatketaan injektoimalla 10 µl näyteliuosta, johon on lisätty sisäistä standardia (6.1.2). Ajetaan kromatogrammi ja mitataan piikkien korkeudet.

Jos näyteliuoksen kromatogrammissa havaitaan häiritsevä piikki, jonka retentioaika on suunnilleen sama kuin isopropyyliparabeenin, on valittava toinen sisäinen standardi. Jos jotakin tutkittavista säilöntäaineista ei esiinny näytteen kromatogrammissa, tätä säilöntäainetta voidaan käyttää vaihtoehtoisena sisäisenä standardina.

Lasketaan tutkittujen säilöntäaineiden piikkien korkeuksien suhde sisäisen standardin piikkien korkeuteen.

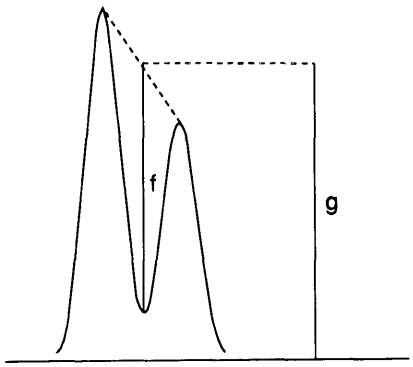
Varmistetaan, että kalibrointimenettelyssä käytetyille standardiliuoksille saadaan lineaarinen vaste.

Varmistetaan, täyttävätkö standardiliuoksesta ja näyteliuoksesta saadut kromatogrammit seuraavat vaatimukset:

— heikoimmin erottuvan parin piikkien erottumisen on oltava vähintään 0,90. (Katso piikkien erottumisen määritelmä kuviosta 1.)

Piikkien erottuminen (p)

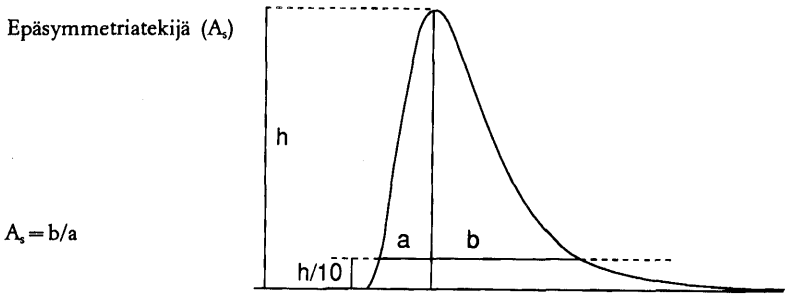
$p = f/g$



Kuva 1: Piikkien erottuminen

Jos vaadittua eroa ei saavuteta, on joko käytettävä tehokkaampaa kolonnia tai muutettava liikkuvaa faasikoostumusta, kunnes vaatimus saadaan täytettyä.

— Kaikkien saatujen piikkien epäsymmetriatekijän A_s on oltava 0,9—1,5. (Katso piikkien epäsymmetriatekijän määritelmä kuviosta 2). Kromatogrammin ajamiseksi epäsymmetriatekijän määrittämistä varten suositellaan piirturin nopeudeksi vähintään 2 cm:ä/minuutissa.



Kuva 2: Piikkien epäsymmetriatekijä

— Pohjaviivan täytyy olla vakaa.

7. Tulosten laskeminen

Käytetään standardikäyrää (6.2.2) ja tutkittujen säilöntäaineiden piikkien korkeuksien suhdetta sisäisen standardin piikkien korkeuteen näyteliuoksen sisältämien säilöntäaineiden pitoisuuden laskemiseksi. Lasketaan 2-fenoksietanolin, 1-fenoksipropan-2-olin, metyyli-4-hydroksibentsoaatin, etyyli-4-hydroksibentsoaatin, propyyli-4-hydroksibentsoaatin, butyyli-4-hydroksibentsoaatin ja bentsyyli-4-hydroksibentsoaatin pitoisuudet, w_i, painoprosentteina (% m/m) käyttämällä kaavaa:

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

jossa:

b_i = säilöntäaineen i pitoisuus (µg/ml) koeliuoksessa standardikäyrältä luettuna

ja

a = näytteen paino (g).

8. Toistettavuus (1)

Katso huomautukset, 10.5.

9. Uusittavuus (1)

Katso huomautukset, 10.5.

10. Huomautukset

10.1 Stationäärifaasi

Liuotettujen aineiden retentiokäyttäytyminen HPLC-kromatografiassa riippuu suuresti stationäärifaasin tyypistä, tuotenimestä ja käyttöhistoriasta. Standardiliuoksille saaduista tuloksista (katso huomautukset 6.2.3) voidaan päätellä, voidaanko kolonnia käyttää tutkittavien säilöntäaineiden erottamiseen. Tässä ehdotetun kolonnipakkausmateriaalin lisäksi myös Hypersil ODS:n ja Zorbax ODS:n havaittiin olevan soveltuvia.

Suositeltua liikkuvan faasin koostumusta voidaan vaihtoehtoisesti optimoida vaaditun erotuksen saavuttamiseksi.

10.2 Detektointiaallonpituus

Kuvatulle menetelmälle tehty luotettavuustesti osoitti, että detektointiaallonpituuden vähäisellä muutoksella voi olla huomattava vaikutus määrityksen tuloksiin.

Tämän vuoksi tätä parametriä on valvottava tarkasti analyysin ajan.

(1) ISO 5725

10.3 Häiriöt

Tässä menetelmässä kuvatuissa olosuhteissa eluoituvat myös useat muut yhdisteet, kuten säilöntäaineet ja kosmeettiset lisäaineet. Useiden neuvoston antaman kosmeettisia valmisteita koskevan direktiivin liitteessä VI mainittujen säilöntäaineiden retentioaikoja on lueteltu lähteessä N. de Kruijf, A. Schouten, M.A.H. Rijk ja L.A. Pranato-Soetardhi (1989). Determination of preservatives in cosmetic products II. High-performacne liquid chromatographic identification (J. Chromatography 469, 317—398).

10.4 Analyysikolonnin suojaamiseksi voidaan käyttää sopivaa esikolonnia.

10.5 Menetelmää tutkittiin kollaboratiivisessa kokeessa, johon osallistui yhdeksän laboratoriota. Analysoitiin kolme näytettä. Seuraavassa taulukossa esitetään kaikkien kolmen näytteen sisältämien analyyttien osalta keskiarvot prosentteina m/m (m), sekä toistettavuuden (r) ja uusittavuuden (R) arvot:

näyte		2-fenoksi-etanoli	1-fenoksi-propan-2-oli	metyyliparabeeni	etyyliparabeeni	propyyliparabeeni	butyyliparabeeni	bentsyyliparabeeni
vitamiinivoide	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	
päivävoide	m	1,196		0,266	0,076			
	r	0,040		0,003	0,002			
	R	0,147		0,022	0,004			
hierontavoide	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