



سیستم مدیریت ایزو  
www.isomanagement.ir

تماس تلفنی جهت دریافت مشاوره:

۱. مشاور دفتر تهران (آقای محسن ممیز)

☎ ۰۹۱۲ ۹۶۳ ۹۳۳۶

۲. مشاور دفتر اصفهان (سرکار خانم لیلا ممیز)

☎ ۰۹۱۳ ۳۲۲ ۸۲۵۹

مجموعه سیستم مدیریت ایزو با هدف بهبود مستمر عملکرد خود و افزایش رضایت مشتریان سعی بر آن داشته، کلیه استانداردهای ملی و بین المللی را در فضای مجازی نشر داده و اطلاع رسانی کند، که تمام مردم ایران از حقوق اولیه شهروندی خود آگاهی لازم را کسب نمایند و از طرف دیگر کلیه مراکز و کارخانه جات بتوانند به راحتی به استانداردهای مورد نیاز دسترسی داشته باشند.

این موسسه اعلام می دارد در کلیه گرایشهای سیستم های بین المللی ISO پیشگام بوده و کلیه مشاوره های ایزو به صورت رایگان و صدور گواهینامه ها تحت اعتبارات بین المللی سازمان جهانی IAF و تامین صلاحیت ایران می باشد.

هم اکنون سیستم خود را با معیارهای جهانی سازگار کنید...





جمهوری اسلامی ایران  
Islamic Republic of Iran  
سازمان ملی استاندارد ایران

Iranian National Standardization Organization



استاندارد ملی ایران  
۱۵۶۹۷  
چاپ اول  
۱۳۹۷

INSO  
15697  
1 st. Edition  
2019

فرآورده‌های آرایشی و بهداشتی -  
اندازه‌گیری نگه‌دارنده‌ها (مشتقات پارابن و  
فنوکسی اتانول) - روش آزمون

**Cosmetics and hygenics products –  
Determination of preservatives  
(paraben derivatives and phenoxy ethanol )**

–  
**Test method**

ICS: 71.100

سازمان ملی استاندارد ایران

تهران، ضلع جنوب غربی میدان ونک، خیابان ولیعصر، پلاک ۲۵۹۲

صندوق پستی: ۱۴۱۵۵-۶۱۳۹ تهران - ایران

تلفن: ۵-۸۸۸۷۹۴۶۱

دورنگار: ۸۸۸۸۷۰۸۰ و ۸۸۸۸۷۱۰۳

کرج، شهر صنعتی، میدان استاندارد

صندوق پستی: ۳۱۵۸۵-۱۶۳ کرج - ایران

تلفن: ۸-۳۲۸۰۶۰۳۱ (۰۲۶)

دورنگار: ۸۱۱۴-۳۲۸۰۸۱۱۴ (۰۲۶)

رایانامه: [standard@isiri.gov.ir](mailto:standard@isiri.gov.ir)

وبگاه: <http://www.isiri.gov.ir>

**Iranian National Standardization Organization (INSO)**

No. 2592 Valiasr Ave., South western corner of Vanak Sq., Tehran, Iran

P. O. Box: 14155-6139, Tehran, Iran

Tel: + 98 (21) 88879461-5

Fax: + 98 (21) 88887080, 88887103

Standard Square, Karaj, Iran

P.O. Box: 31585-163, Karaj, Iran

Tel: + 98 (26) 32806031-8

Fax: + 98 (26) 32808114

Email: [standard@isiri.gov.ir](mailto:standard@isiri.gov.ir)

Website: <http://www.isiri.gov.ir>

## به نام خدا

### آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

سازمان ملی استاندارد ایران به موجب بند یک ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ تنها مرجع رسمی کشور است که وظیفه تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) ایران را به عهده دارد.

تدوین استاندارد در حوزه‌های مختلف در کمیسیون‌های فنی مرکب از کارشناسان سازمان، صاحب‌نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می‌شود و کوششی همگام با مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری است که از مشارکت آگاهانه و منصفانه صاحبان حق و نفع، شامل تولیدکنندگان، مصرف‌کنندگان، صادرکنندگان و واردکنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان‌های دولتی و غیردولتی حاصل می‌شود. پیش‌نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی‌نفع و اعضای کمیسیون‌های مربوط ارسال می‌شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادهای در کمیته ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی (رسمی) ایران چاپ و منتشر می‌شود.

پیش‌نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان‌های علاقه‌مند و ذی‌صلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می‌کنند در کمیته ملی طرح، بررسی و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می‌شود. بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می‌شود که بر اساس مقررات استاندارد ملی ایران شماره ۵ تدوین و در کمیته ملی استاندارد مربوط که در سازمان ملی استاندارد ایران تشکیل می‌شود به تصویب رسیده باشد.

سازمان ملی استاندارد ایران از اعضای اصلی سازمان بین‌المللی استاندارد (ISO)<sup>۱</sup>، کمیسیون بین‌المللی الکتروتکنیک (IEC)<sup>۲</sup> و سازمان بین‌المللی اندازه‌شناسی قانونی (OIML)<sup>۳</sup> است و به عنوان تنها رابط<sup>۴</sup> کمیسیون کدکس غذایی (CAC)<sup>۵</sup> در کشور فعالیت می‌کند. در تدوین استانداردهای ملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی‌های خاص کشور، از آخرین پیشرفت‌های علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین‌المللی بهره‌گیری می‌شود.

سازمان ملی استاندارد ایران می‌تواند با رعایت موازین پیش‌بینی شده در قانون، برای حمایت از مصرف‌کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست‌محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشور و/یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد، اجباری کند. سازمان می‌تواند به منظور حفظ بازارهای بین‌المللی برای محصولات کشور، اجرای استانداردهای کالاهای صادراتی و درجه‌بندی آن را اجباری کند. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده‌کنندگان از خدمات سازمان‌ها و مؤسسات فعال در زمینه مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدور گواهی سامانه‌های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست‌محیطی، آزمایشگاه‌ها و مراکز واسنجی (کالیبراسیون) وسایل سنجش، سازمان ملی استاندارد این‌گونه سازمان‌ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می‌کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامه تأیید صلاحیت به آن‌ها اعطا و بر عملکرد آن‌ها نظارت می‌کند. ترویج دستگاه بین‌المللی یکاها، واسنجی وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این سازمان است.

1- International Organization for Standardization

2- International Electrotechnical Commission

3- International Organization for Legal Metrology (Organisation Internationale de Metrologie Legals)

4- Contact point

5- Codex Alimentarius Commission

## کمیسیون فنی تدوین استاندارد

«فرآورده‌های آرایشی و بهداشتی - اندازه‌گیری نگه‌دارنده‌ها (مشتقات پارابن و فنوکسی اتانول) - روش آزمون»

### رئیس:

کمپانی سعید، عارفه  
(دکتری شیمی)

### سمت و/یا محل اشتغال:

انجمن صنایع شوینده و بهداشتی و آرایشی ایران

### دبیر:

احسانی گرگری، باقر  
(کارشناسی شیمی)

سازمان ملی استاندارد - پژوهشگاه استاندارد

### سمت و/یا محل اشتغال:

شرکت گل‌تاش

### اعضا: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)

احمدیان، حمید رضا  
(کارشناسی ارشد شیمی)

سازمان ملی استاندارد - پژوهشگاه استاندارد

آریا نسب، فضا  
(دکتری شیمی)

انجمن صنایع شوینده و بهداشتی و آرایشی ایران

اسداله‌زاده، ندا  
(کارشناسی ارشد شیمی)

شرکت پارس حیان

اغمشه، امیرگودرز  
(کارشناسی ارشد شیمی)

شرکت گل‌تاش

بنائی‌اصفهانی، زهرا  
(کارشناسی ارشد بیولوژی)

شرکت پاکشو

بنکدارسخی، علیرضا  
(کارشناسی ارشد شیمی)

شرکت آریان کیمیا تک

بهبادنی، سمانه  
(کارشناسی شیمی)

وزارت بهداشت و درمان و آموزش پزشکی - آزمایشگاه کنترل  
سازمان غذا و دارو

پورفرزیب، مژگان  
(دکتری دارو سازی)

اعضا: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)

آزمایشگاه آزما نانو سیستم	چیت‌سازان، مهدی (کارشناسی ارشد شیمی)
شرکت پارس حیان	حقیقی، نگار (کارشناسی ارشد شیمی)
شرکت صنعتی بازرگانی صحت	خالقی‌وند، ناهید (کارشناسی ارشد شیمی)
آزمایشگاه همکار مهر طاهر	جباری، عادل (کارشناسی ارشد شیمی)
اداره کل نظارت بر اجرای استاندارد صنایع غیر فلزی	جوادی، افسانه (کارشناس مهندسی فناوری شیمی)
وزارت بهداشت و درمان و آموزش پزشکی - آزمایشگاه کنترل سازمان غذا و دارو	دلیرج، عباس (کارشناسی شیمی)
وزارت بهداشت و درمان و آموزش پزشکی - آزمایشگاه کنترل سازمان غذا و دارو	ذوالفقاری، فاطمه (کارشناس ارشد نظارت بر امور دارویی)
شرکت سهامی عام کف	زینال‌زاده، افسانه (کارشناسی شیمی)
آزمایشگاه همکار مهر طاهر	شاهی، مریم (دکتری شیمی)
وزارت بهداشت و درمان و آموزش پزشکی - آزمایشگاه کنترل سازمان غذا و دارو	شهرستانی، مرتضی (دکتری شیمی)
شرکت سهامی عام کف	عاصمی‌پور، سمیه (کارشناسی ارشد شیمی)
سازمان ملی استاندارد - پژوهشگاه استاندارد	عدل‌نسب، لاله (دکتری شیمی)
آزمایشگاه همکار مهر طاهر	غفاری نطنزی، پری (کارشناسی ارشد شیمی)

**اعضاء: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)**

فرخروز، زهرا  
(کارشناسی ارشد شیمی)

لطفی، صابر  
(کارشناسی ارشد شیمی)

محب علی، علیرضا  
(دکتری شیمی)

مرادی، آرمان  
(دکتری داروسازی)

محمدبیگی، نسرین  
(کارشناسی ارشد شیمی)

مفاخری، شیرین  
(کارشناسی شیمی)

نبی، مهدی  
(دکتری شیمی)

**ویراستار:**

ردائی، احسان  
(کارشناسی ارشد شیمی)

**سمت و/یا محل اشتغال**

شرکت پارس حیان

آزمایشگاه آزما نانو سیستم

آزمایشگاه کنترل مرکزی قم

گروه صنعتی نگین بهداشت آراین

شرکت گروه بهداشتی فیروز

شرکت صنعتی بازرگانی صحت

آزمایشگاه معیار دانش پارس

**سمت و/یا محل اشتغال:**

اداره کل استاندارد همدان

فهرست مندرجات

صفحه	عنوان
ح	پیش‌گفتار
۱	۱ هدف و دامنه کاربرد
۱	۲ مراجع الزامی
۱	۳ اصول آزمون
۱	۴ روش آزمون
۱	۱-۴ مواد و/یا واکنشگرها
۲	۲-۴ وسایل
۳	۳-۴ تهیه محلول‌های استاندارد و کالیبراسیون ۳
۴	۴-۴ روش اجرای آزمون
۴	۱-۴-۴ آماده‌سازی و استخراج نمونه
۴	۲-۴-۴ شرایط کروماتوگرافی
۵	۳-۴-۴ تزریق محلول‌های استاندارد و نمونه
۵	۱-۳-۴-۴ تزریق محلول‌های استاندارد
۵	۲-۳-۴-۴ تزریق محلول‌های نمونه
۵	۴-۴-۴ پیک‌های کروماتوگرام
۶	۵-۴ محاسبات
۶	۶-۴ تکرارپذیری کروماتوگرافی
۷	۵ گزارش آزمون
۹	پیوست الف (آگاهی دهنده) کروماتوگرام مربوط به اندازه‌گیری پارابن‌ها



## پیش گفتار

استاندارد «فرآورده‌های آرایشی و بهداشتی - اندازه‌گیری نگه‌دارنده‌ها (مشتقات پارابن و فنوکسی اتانول)» - روش آزمون» که پیش‌نویس آن بر اساس پژوهش انجام شده تهیه و تدوین شده است، پس از بررسی در کمیسیون‌های مربوط دریکهزار و شصدهفتاد و ششمین اجلاس کمیته ملی استاندارد صنایع شیمیایی، مورخ ۱۳۹۷/۱۲/۱ تصویب شد. اینک به استناد بند یک ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱، به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود.

استانداردهای ملی ایران بر اساس استاندارد ملی ایران شماره ۵ (استانداردهای ملی ایران - ساختار و شیوه نگارش) تدوین می‌شوند. برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت‌های ملی و جهانی در زمینه صنایع، علوم و خدمات، استانداردهای ملی ایران در صورت لزوم تجدید نظر خواهد شد و هر پیشنهادی که برای اصلاح و تکمیل این استانداردها ارائه شود، هنگام تجدید نظر در کمیسیون‌های مربوط مورد توجه قرار خواهد گرفت. بنابراین باید همواره از آخرین تجدید استانداردهای ملی ایران استفاده کرد.

نتایج پژوهشی که برای تهیه و تدوین این استاندارد مورد استفاده قرار گرفته به شرح زیر است:

- ۱- نتایج حاصل از طرح تحقیقاتی به شناسه ۹۵۰۳۰۱۴ با عنوان "شناسایی پارابن‌های افزوده شده به عنوان نگهدارنده به محصولات آرایشی-بهداشتی و تعیین مقدار آنها" توسط پژوهشگاه استاندارد در سال ۱۳۹۷
- ۲- احمدیان، حمیدرضا و همکاران، آزمایشات شیمیایی، شرکت گل‌تاش
- ۳- چیت‌سازان، مهدی و همکاران، آزمایشات شیمیایی، آزمایشگاه همکار آزما نانو سیستم
- ۴- جباری، عادل و همکاران، آزمایشات شیمیایی، آزمایشگاه همکار مهر طاهر
- ۵- زینال‌زاده، افسانه و همکاران، آزمایشات شیمیایی، شرکت داروگر
- ۶- اغمشه، امیرگودرز و همکاران، آزمایشات شیمیایی، شرکت پارس حیان
- ۷- عارفه، کمپانی سعید و همکاران، آزمایشات شیمیایی، انجمن صنایع شوینده و بهداشتی و آرایشی ایران
- ۸- محب‌علی، علیرضا و همکاران، آزمایشات شیمیایی، آزمایشگاه همکار کنترل مرکزی قم
- ۹- محمدبیگی، نسرين و همکاران، آزمایشات شیمیایی، شرکت فیروز
- ۱۰- نبی، مهدی و همکاران، آزمایشات شیمیایی، آزمایشگاه همکار معیار دانش پارس
- ۱۱- خالقی‌وند، ناهید و همکاران، آزمایشات شیمیایی، شرکت صنعتی و بازرگانی صحت

## فرآورده‌های آرایشی و بهداشتی - اندازه‌گیری نگه‌دارنده‌ها ( مشتقات پارابن و فنوکسی اتانول) - روش آزمون

هشدار - در این استاندارد تمام موارد ایمنی و بهداشتی درج نشده‌است. در صورت مواجهه با چنین مواردی مسئولیت برقراری شرایط بهداشت و ایمنی مناسب و اجرای آن بر عهده کاربر این استاندارد است.

### ۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد، تعیین روشی برای اندازه‌گیری نگه‌دارنده‌ها (مشتقات پارابن و فنوکسی اتانول) در فرآورده‌های آرایشی و بهداشتی است. این استاندارد برای تمامی فرآورده‌های آرایشی-بهداشتی کاربرد دارد.

### ۲ مراجع الزامی

در مراجع زیر ضوابطی وجود دارد که در متن این استاندارد به صورت الزامی به آن‌ها ارجاع داده شده‌است. بدین ترتیب، آن ضوابط جزئی از این استاندارد محسوب می‌شوند.

در صورتی که به مرجعی با ذکر تاریخ انتشار ارجاع داده شده باشد، اصلاحیه‌ها و تجدیدنظرهای بعدی آن برای این استاندارد الزام‌آور نیست. در مورد مراجعی که بدون ذکر تاریخ انتشار به آن‌ها ارجاع داده شده است، همواره آخرین تجدیدنظر و اصلاحیه‌های بعدی برای این استاندارد الزام‌آور است.

استفاده از مراجع زیر برای کاربرد این استاندارد الزامی است:

۱-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۱۷۲۸، آب مورد مصرف در آزمایشگاه تجزیه، ویژگی‌ها و روش‌های آزمون

### ۳ اصول آزمون

ابتدا پارابن‌ها و فنوکسی اتانول موجود در نمونه با استفاده از مخلوط اتانول / آب استخراج می‌شوند. سپس این ترکیبات استخراج شده به یکی از دو روش با استفاده از استاندارد داخلی یا بدون استاندارد داخلی آماده-سازی شده و به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا تزریق می‌شوند. مقدار پارابن‌ها و فنوکسی اتانول موجود در نمونه توسط آشکارساز ماوراء بنفش، اندازه‌گیری می‌شوند.

### ۴ روش آزمون

#### ۱-۴ مواد و/یا واکنشگرها

یاد آوری - کلیه مواد شیمیایی مورد استفاده باید با درجه خلوص آزمایشگاهی باشند. در خصوص حلال‌های مورد استفاده در HPLC از درجه خلوص مربوطه استفاده کنید.

#### ۱-۱-۴ اتانول مطلق

#### ۲-۱-۴ ۲- فنوکسی اتانول

#### ۳-۱-۴ ۳- متیل ۴- هیدروکسی بنزوات (متیل پارابن)

#### ۴-۱-۴ ۴- اتیل ۴- هیدروکسی بنزوات (اتیل پارابن)

#### ۵-۱-۴ ۵- n - پروپیل ۴- هیدروکسی بنزوات (n- پروپیل پارابن)

#### ۶-۱-۴ ۶- ایزو پروپیل ۴- هیدروکسی بنزوات (ایزوپروپیل پارابن)

#### ۷-۱-۴ ۷- n - بوتیل ۴- هیدروکسی بنزوات (n- بوتیل پارابن)

#### ۸-۱-۴ ۸- بنزیل ۴- هیدروکسی بنزوات (بنزیل پارابن)

#### ۹-۱-۴ ۹- استونیتریل با درجه خلوص HPLC

#### ۱۰-۱-۴ ۱۰- متانول با درجه خلوص HPLC

#### ۱۱-۱-۴ ۱۱- اسید سولفوریک ۲ mol/l

#### ۱۲-۱-۴ ۱۲- محلول پتاسیم هیدروکسید ۰/۲ mol/l

#### ۱۳-۱-۴ ۱۳- تترا هیدروفوران

۴-۱-۱۴ ۱- فنوکسی پروپان ۲- ال

۴-۱-۱۵ آب با درجه خلوص HPLC

۴-۱-۱۶ مخلوط اتانول و آب با نسبت (۹۰:۱۰)

مقدار ۹۰ ml آب (زیربند ۴-۱-۱۵) را با ۱۰ ml اتانول مطلق (زیربند ۴-۱-۱) مخلوط کنید.

#### ۴-۲ وسایل

لوازم شیشه‌ای و دستگاه‌های متداول آزمایشگاهی به همراه موارد زیر:

۴-۲-۱ حمام آب گرم با قابلیت تنظیم دمایی  $(60 \pm 1)^\circ\text{C}$

۴-۲-۲ لوله آزمایش ۵۰ mm درپوش دار

۴-۲-۳ ویال شیشه‌ای ۵ mm

۴-۲-۴ سنگ جوش

۴-۲-۵ سیستم خلاء برای صاف کردن حلال

۴-۲-۶ کاغذ صافی با تخلخل  $45\ \mu\text{m}$  (واتمن ۴۱ یا معادل آن)

۴-۲-۷ سیستم کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، شامل:

۴-۲-۷-۱ پمپ فاز متحرک

۴-۲-۷-۲ سیستم تزریق دستی و یا خودکار، با لوپ مناسب برای تزریق  $10\ \mu\text{l}$

۴-۲-۷-۳ ستون کروماتوگرافی مایع با فاز معکوس C18، با ذرات پرکننده از جنس نکلئوسیل<sup>۱</sup> و ابعاد (cm

$25 \times 4.6\ \text{mm}$ ) یا نمونه معادل

۴-۲-۷-۴ آشکارساز فرابنفش، با قابلیت تنظیم در طول موج  $280\ \text{nm}$

۴-۲-۷-۵ سیستم پردازش اطلاعات

---

۱- Nucleosil از ستون‌های کروماتوگرافی با مشخصات فنی متفاوت در صورتی که کارایی آنها پس از صحت‌گذاری تایید شود، نیز می‌توان استفاده کرد.

#### ۳-۴ تهیه محلول‌های استاندارد و کالیبراسیون

##### ۱-۳-۴ محلول استاندارد داخلی

مقدار  $mg (250 \pm 1)$  از ایزوپروپیل پارابن (زیربند ۴-۶-۱) را به دقت وزن کرده و درون ارلن  $ml 500$  با مخلوط اتانول و آب (زیربند ۴-۱-۱۶) به حجم برسانید.

##### ۲-۳-۴ محلول ذخیره استاندارد

از هر یک از ترکیبات ۲- فنوکسی اتانول و ۱- فنوکسی پروپان ۲- ال مقدار  $mg (200 \pm 1)$  و از هریک از ترکیبات متیل پارابن، اتیل پارابن، پروپیل پارابن، بوتیل پارابن مقدار  $mg (50 \pm 0.1)$  و از ترکیب بنزیل پارابن مقدار  $mg (25 \pm 0.1)$  را درون یک ارلن  $ml 100$  توزین کرده و با مخلوط اتانول و آب (زیربند ۴-۱-۱۶) به حجم برسانید. این محلول به مدت یک هفته در یخچال پایدار است.

##### ۳-۳-۴ محلول‌های استاندارد کالیبراسیون

به ترتیب  $ml 1$ ،  $ml 2$ ،  $ml 5$  و  $ml 10$  و  $ml 20$  از محلول ذخیره (زیربند ۴-۳-۲) را درون بالن‌های حجمی  $ml 50$  منتقل کنید. به هر کدام از بالن‌ها  $ml 10$  از محلول استاندارد داخلی (زیربند ۴-۳-۱) و  $ml 1$  اسید سولفوریک  $mol/l 2$  (زیربند ۴-۱-۱۱) افزوده و با مخلوط اتانول و آب (زیربند ۴-۱-۱۶) به حجم برسانید.

#### ۴-۴ روش اجرای آزمون

##### ۱-۴-۴ آماده‌سازی و استخراج نمونه

##### ۱-۱-۴-۴ آماده‌سازی و استخراج نمونه بدون افزودن استاندارد داخلی

مقدار  $g 1$  از نمونه را با دقت  $g 0.001$  داخل لوله آزمایش  $ml 50$  توزین کنید. مقدار  $ml 1$  اسید سولفوریک  $mol/l 2$  (زیربند ۴-۱-۱۱) و  $ml 50$  مخلوط اتانول و آب (زیربند ۴-۱-۱۶) به آن اضافه کنید. چند عدد سنگ جوش درون لوله آزمایش انداخته و به مدت  $min 1$  به شدت هم بزنید تا یک مخلوط همگن بدست آید. برای تسهیل استخراج پارابن‌ها به فاز اتانولی، لوله آزمایش را درون حمام آب با دمای  $^{\circ}C 60$  به مدت  $min 5$  قرار دهید. سپس به سرعت لوله آزمایش را با آب سرد کرده و به مدت  $h 1$  درون یخچال نگهداری کنید. نمونه‌ها را از کاغذ صافی عبور دهید. مقدار  $ml 2$  از نمونه را درون ویال ریخته و در دمای  $^{\circ}C 5$  نگهداری کنید. این نمونه به مدت  $h 24$  قابل نگهداری است.

##### ۲-۱-۴-۴ آماده‌سازی و استخراج نمونه با افزودن استاندارد داخلی

مقدار ۱ g از نمونه را با دقت ۰٫۰۰۱ g داخل لوله آزمایش ۵۰ ml توزین کنید. مقدار ۱ ml اسید سولفوریک ۲ mol/l (زیربند ۴-۱-۱۱) و ۴۰ ml از مخلوط اتانول و آب (زیربند ۴-۱-۱۶) به آن اضافه کنید. چند عدد سنگ جوش و ۱۰ ml از محلول استاندارد داخلی (زیربند ۴-۳-۱) درون لوله آزمایش ریخته و به مدت ۱ min به شدت بهم بزنید تا یک مخلوط همگن بدست آید. برای تسهیل استخراج پارابن‌ها به فاز اتانولی، لوله آزمایش را درون حمام آب با دمای ۶۰ °C دقیقاً به مدت ۵ min قرار دهید. سپس به سرعت لوله آزمایش را با آب سرد کرده و به مدت ۱ h درون یخچال نگهداری کنید. نمونه‌ها را از کاغذ صافی عبور دهید. مقدار ۲ ml از نمونه را درون ویال ریخته و در دمای ۵ °C نگهداری کنید. این نمونه به مدت ۲۴ h قابل نگهداری است.

#### ۲-۴-۴ شرایط کروماتوگرافی

#### ۱-۲-۴-۴ محلول فاز متحرک

یک محلول مخلوط به عنوان فاز متحرک شامل حلال‌های تتراهیدروفوران (زیربند ۴-۱-۱۳) (v/v) ۵٪، آب (زیربند ۴-۱-۱۵) (v/v) ۶۰٪، متانول (زیربند ۴-۱-۱۰) (v/v) ۱۰٪ و استونیتریل (زیربند ۴-۱-۹) (v/v) ۲۵٪ درست کنید.

۲-۲-۴-۴ سرعت جریان فاز متحرک، ۱٫۵ ml/min و طول موج ۲۸۰ nm

#### ۳-۴-۴ تزریق محلول‌های استاندارد و نمونه

#### ۱-۳-۴-۴ تزریق محلول‌های استاندارد

مقدار ۱۰ µl از هر کدام از محلول‌های استاندارد کالیبراسیون (زیر بند ۴-۳-۳) را تزریق کرده و برای هر محلول نسبت مساحت پیک استاندارد به مساحت پیک استاندارد داخلی را تعیین کنید. منحنی کالیبراسیون را براساس مساحت پیک نسبی بر حسب غلظت رسم کنید. مطمئن شوید که نمودار خطی برای کالیبراسیون بدست آمده است.

یادآوری- در پیوست الف یک کروماتوگرام از محلول استاندارد دارای پارابن‌های مختلف نشان داده شده است.

#### ۲-۳-۴-۴ تزریق محلول‌های نمونه

مقدار ۱۰ µl از محلول نمونه (محلول بدست آمده طبق زیربند ۴-۱-۱) را به دستگاه تزریق کرده و کروماتوگرام را ثبت کنید. سپس مقدار ۱۰ µl از محلول‌های استاندارد کالیبراسیون (زیر بند ۴-۳-۳) را تزریق کرده و کروماتوگرام آن را نیز ثبت کنید. مساحت پیک‌های بدست آمده را مقایسه کنید. اگر در کروماتوگرام حاصل از نمونه استخراج شده (محلول بدست آمده طبق زیربند ۴-۱-۱)، پیکی تقریباً در زمان بازداری ایزو پروپیل پارابن (به عنوان استاندارد داخلی) مشاهده نشد، در این صورت مقدار ۱۰ µl از

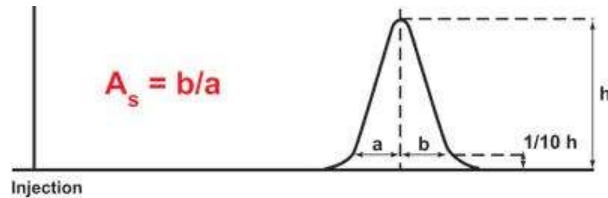
محلول نمونه استخراج شده حاوی استاندارد داخلی (محلول بدست آمده طبق زیربند ۴-۴-۱) را به دستگاه تزریق کرده و کروماتوگرام آن را ثبت کنید.

**یادآوری** - اگر تداخل پیک در کروماتوگرام حاصل از نمونه در زمان بازداری تقریبی مربوط به ایزوپروپیل پارابن مشاهده شد، استاندارد داخلی دیگری بایستی انتخاب شود (اگر یکی از پارابن‌ها در نمونه وجود نداشته باشد، می‌توان به عنوان استاندارد داخلی از آن استفاده کرد).

#### ۴-۴-۴ پیک‌های کروماتوگرام

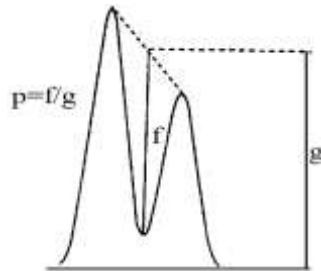
پیک‌های حاصل از کروماتوگرافی باید دارای ویژگی زیر باشند.

- پیک‌های حاصل از نمونه باید دارای فاکتور تقارن بین ۱٫۵ - ۰٫۹ باشند. فاکتور تقارن مطابق شکل ۱ به دست می‌آید.



شکل ۱- روش محاسبه فاکتور تقارن در کروماتوگرام

- جداسازی پیک در بدترین حالت حداقل باید ۰٫۹ باشد. فاکتور جداسازی (p) پیک مطابق شکل ۲ به دست می‌آید.



شکل ۲- روش محاسبه فاکتور جداسازی در کروماتوگرام

**یادآوری ۱** - هنگام بدست آوردن فاکتور تقارن و جداسازی، خط زمینه باید ثابت باشد.

**یادآوری ۲** - لازم به توضیح است که در برخی روش‌های آزمون در دستگاه‌های مدرن امکان تغییر هم‌زمان شدت جریان فاز متحرک و نسبت حلال‌ها در فاز متحرک وجود دارد. باید برنامه عبور فاز متحرک به گونه‌ای باشد که در زمان بازداری آنالیت‌ها، خط زمینه<sup>۱</sup> ثابت شده باشد.

#### ۵-۴ محاسبات

از نسبت مساحت (ارتفاع) پیک‌های بدست آمده به استاندارد داخلی و منحنی کالیبراسیون، غلظت پارابن‌ها در نمونه را به صورت درصد وزنی/وزنی با استفاده از معادله ۱ محاسبه کنید.

$$\% W_i (m/m) = b_i / 200a \quad (1)$$

که در آن:

a مقدار نمونه برداشتی، بر حسب g؛

b<sub>i</sub> مقدار غلظت پارابن بدست آمده، بر حسب μg/ml از منحنی کالیبراسیون است.

#### ۶-۴ تکرارپذیری کروماتوگرافی

##### ۱-۶-۴ فاز ثابت

رفتار بازداری حلال‌ها در HPLC به شدت تحت تاثیر برند و مدت زمان استفاده از فاز ساکن می باشد. در صورتی از یک ستون می‌توان استفاده کرد که نتایج حاصل از ارزیابی‌های محلول استاندارد خوب باشد. لذا می‌توان نسبت فاز متحرک را برای بدست آوردن نتیجه مطلوب بهینه کرد.

##### ۲-۶-۴ طول موج اندازه گیری

بررسی ruggedness برای روش نشانگر آن است که کوچک‌ترین تغییر در طول موج تاثیرات شدیدی در نتایج اندازه‌گیری دارد. بنابراین، این پارامتر باید به دقت کنترل شود.

##### ۳-۶-۴ تداخل‌ها

تحت شرایط آزمون سایر نگه‌دارنده‌ها و ترکیبات در محصولات آرایشی جذب نشان می‌دهند زمان بازداری از ترکیبات متنوعی از آنها ناشی می‌شود. بایستی اطمینان حاصل کنید که پیک هر آنالیت درست تشخیص داده شده است که برای اینکار می‌توان از اسپاک<sup>۱</sup> آنالیت به نمونه استفاده کرد.

##### ۴-۶-۴ حد تکرار پذیری

تفاوت مطلق بین دو نتیجه آزمون مستقل یکسان (به دست آمده توسط یک آزمایشگر با استفاده از روش و مواد یکسان، در یک آزمایشگاه و با استفاده از تجهیزات یکسان در یک فاصله زمانی کوتاه به دست آمده) «حد تکرار پذیری r» نامیده و بیش از ۵٪ موارد نخواهد بود.

1- Spike



#### ۴-۶-۵ حد تجدید پذیری

تفاوت مطلق بین دو نتیجه آزمون مستقل یکسان (به دست آمده توسط آزمایش‌گرهای مختلف با استفاده از روش و مواد یکسان در آزمایشگاه‌های متفاوت و با استفاده از تجهیزات متفاوت) را «حد تجدید پذیری R» نامیده و بیش از ۵٪ موارد نخواهد بود.

#### ۵ گزارش آزمون

گزارش آزمون باید حداقل شامل اطلاعات زیر باشد:

۱-۵ ارجاع به این استاندارد ملی؛

۲-۵ همه اطلاعات لازم برای شناسایی نمونه؛

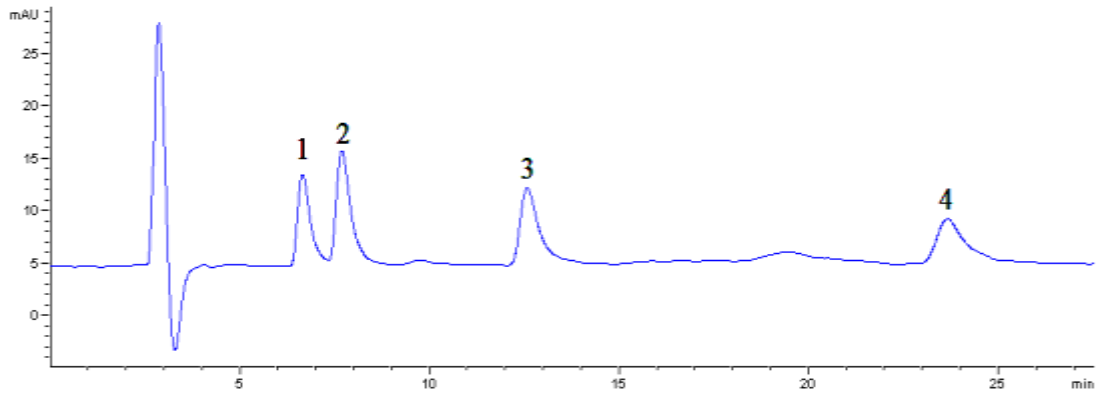
۳-۵ نتایج به دست آمده و روش اندازه‌گیری مورد استفاده؛

۴-۵ هر گونه عملیاتی که در این روش معین نشده یا اختیاری در نظر گرفته شده و ممکن است نتایج را تحت تأثیر قرار دهد.

**پیوست الف**  
**(آگاهی دهنده)**

**کروماتوگرام مربوط به اندازه‌گیری پارابن‌ها**

کروماتوگرام حاصل از روش این استاندارد در شکل الف-۱ نشان داده شده است. در جدول الف-۱ زمان بازداری پارابن‌ها و نام آنها مشخص شده است.



شکل الف-۱- یک نمونه از کروماتوگرام پارابن‌های اندازه‌گیری شده مطابق این استاندارد

جدول الف-۱- نام پیک و ترتیب زمان بازداری پارابن‌ها

شماره پیک	نام پیک	زمان بازداری
۱	۲-فنوکسی اتانول	۶٫۶۳
۲	متیل پارابن	۷٫۶۶
۳	اتیل پارابن	۱۲٫۵۵
۴	پروپیل پارابن	۲۳٫۶۳