

KOMMISSIONENS SJETTE DIREKTIV 95/32/EF

af 7. juli 1995

om analysemetoderne for kontrol af kosmetiske midlers sammensætning

(Tekst af betydning for EØS)

KOMMISSIONEN FOR DE EUROPÆISKE
FÆLLESSKABER HAR —under henvisning til traktaten om oprettelse af Det Euro-
pæiske Fællesskab,under henvisning til Rådets direktiv 76/768/EØF af
27. juli 1976 om indbyrdes tilnærmelse af medlemsstater-
nes lovgivning om kosmetiske midler ⁽¹⁾, senest ændret
ved Kommissionens direktiv 94/32/EF ⁽²⁾, særlig artikel 8,
stk. 1, og

ud fra følgende betragtninger:

I direktiv 76/678/EØF foreskrives en officiel kontrol af
kosmetiske midler til konstatering af, om de i fælles-
skabsbestemmelserne fastsatte betingelser vedrørende
sammensætningen af kosmetiske midler overholdes;de nødvendige analysemetoder bør fastlægges hurtigst
muligt; en række metoder er allerede blevet vedtaget med
Kommissionens direktiv 80/1335/EØF ⁽³⁾, ændret ved
direktiv 87/143/EØF ⁽⁴⁾, direktiv 82/434/EØF ⁽⁵⁾, ændret
ved direktiv 90/207/EØF ⁽⁶⁾, direktiv 83/514/EØF ⁽⁷⁾, 85/
490/EØF ⁽⁸⁾ og 93/73/EØF ⁽⁹⁾;identifikation og bestemmelse af benzoesyre, 4-hydroxy-
benzoesyre, sorbinsyre, salicylsyre og propionsyre i
kosmetiske midler og identifikation og bestemmelse af
hydroquinon, hydroquinonmonomethylether, hydroqui-
nonmonoethylether og hydroquinonmonobenzylether i
kosmetiske midler udgør sjette etape;de i dette direktiv fastsatte foranstaltninger er i overens-
stemmelse med udtalelse fra Udvalget for Tilpasning af
Direktiv 76/768/EØF til det Tekniske Fremskridt —

UDSTEDT FØLGENDE DIREKTIV:

Artikel 1

I forbindelse med den officielle kontrol af kosmetiske
midler træffer medlemsstaterne de fornødne foranstalt-
ninger for at sikre, at:— identifikation og bestemmelse af benzoesyre, 4-
hydroxybenzoesyre, sorbinsyre, salicylsyre og pro-
pionsyre— identifikation og bestemmelse af hydroquinon, hydro-
quinonmonomethylether, hydroquinonmonoethylether
og hydroquinonmonobenzylether

foretages efter de metoder, der er beskrevet i bilaget.

Artikel 2

1. Medlemsstaterne sætter de nødvendige love og
administrative bestemmelser i kraft for at efterkomme
dette direktiv senest den 30. september 1996. De under-
retter straks Kommissionen herom.Når medlemsstaterne vedtager disse bestemmelser, henvi-
ses der deri til dette direktiv, eller de ledsages ved
offentliggørelsen af en sådan henvisning. De nærmere
regler for denne henvisning fastsættes af medlemssta-
terne.2. Medlemsstaterne meddeler Kommissionen teksten
til de nationale retsfor skrifter, som de udsteder på det
område, der er omfattet af dette direktiv.

Artikel 3

Dette direktiv træder i kraft på tyvendedagen efter offent-
liggørelsen i *De Europæiske Fællesskabers Tidende*.

Artikel 4

Dette direktiv er rettet til medlemsstaterne.

Udfærdiget i Bruxelles, den 7. juli 1995.

På Kommissionens vegne

Emma BONINO

Medlem af Kommissionen

⁽¹⁾ EFT nr. L 262 af 27. 9. 1976, s. 169.⁽²⁾ EFT nr. L 181 af 15. 7. 1994, s. 31.⁽³⁾ EFT nr. L 383 af 31. 12. 1980, s. 27.⁽⁴⁾ EFT nr. L 57 af 27. 2. 1987, s. 56.⁽⁵⁾ EFT nr. L 185 af 30. 6. 1982, s. 1.⁽⁶⁾ EFT nr. L 108 af 28. 4. 1990, s. 92.⁽⁷⁾ EFT nr. L 291 af 24. 10. 1983, s. 9.⁽⁸⁾ EFT nr. L 295 af 7. 11. 1985, s. 30.⁽⁹⁾ EFT nr. L 231 af 14. 9. 1993, s. 34.

BILAG

I. IDENTIFIKATION OG BESTEMMELSE AF BENZOESYRE, 4-HYDROXYBENZOESYRE, SORBINSYRE, SALICYLSYRE OG PROPIONSYRE I KOSMETISKE PRODUKTER**1. Formål og anvendelsesområde**

Denne metode kan anvendes til identifikation og bestemmelse af benzoesyre, 4-hydroxybenzoesyre, sorbinsyre, salicylsyre og propionsyre i kosmetiske produkter. Separate procedurer benyttes til identifikation af disse konserveringsstoffer, bestemmelse af propionsyre, og til bestemmelse af benzoesyre, 4-hydroxybenzoesyre, sorbinsyre og salicylsyre.

2. Definition

Indholdet af benzoesyre, 4-hydroxybenzoesyre, salicylsyre, sorbinsyre og propionsyre bestemt efter denne metode udtrykkes som masseprocent (% m/m) fri syre.

A. IDENTIFIKATION**1. Prinzip**

Efter ekstraktion af konserveringsstofferne med syre/base analyseres ekstraktet med TLC, idet der anvendes »on-plate« derivatisering af stofferne. Afhængig af de opnåede resultater bekræftes identifikationen ved hjælp af højtryksvæskerkromatografi (HPLC) eller, hvis der er tale om propionsyre, ved hjælp af gaskromatografi (GC).

2. Reagenser**2.1. Generelt**

Alle reagenser skal være analyserne. Vand skal være destilleret eller af mindst tilsvarende kvalitet.

2.2. Acetone**2.3. Diethylether****2.4. Acetonitril****2.5. Toluen****2.6. n-Hexan****2.7. Paraffin, flydende****2.8. Saltsyre, 4 M****2.9. Kaliumhydroxid, vandig opløsning, 4 M****2.10. Calciumklorid, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$** **2.11. Lithiumkarbonat, Li_2CO_3** **2.12. 2-Brom-2'-acetonaphton****2.13. 4-Hydroxybenzoesyre****2.14. Salicylsyre****2.15. Benzoesyre****2.16. Sorbinsyre****2.17. Propionsyre**

2.18. Referenceopløsninger:

Der fremstilles en 0,1 % (m/v) opløsning (100 mg/100 ml) af hver af de fem konserveringsstoffer (2.13 til 2.17) i diethylether.

2.19. Derivatiseringsreagens:

0,5 % (m/v) opløsning (50 mg/10 ml) af 2-brom-2'-acetonaphton (2.12) i acetonitril (2.4). Frisk opløsning fremstilles hver uge. Opbevares i køleskab.

2.20. Katalysatoropløsning:

0,3 % opløsning af lithiumkarbonat (2.11) i vand (300 mg/100 ml). Denne opløsning skal være frisk fremstillet.

2.21. Udviklingsvæske:

Toluen (2.5)/acetone (2.2) (20 : 0,5; v/v)

2.2. Flydende paraffin (2.7)/n-hexan (2.6) (1 : 2; v/v)**3. Apparatur**

Almindeligt laboratorieudstyr

3.1. Vandbad ved 60 °C**3.2. TLC-kar****3.3. UV-lampe, 254 og 366 nm****3.4. Tyndtlagsplader, Kieselgel 60, uden fluorescenceindikator, 20 × 20 cm, lagtykkelse 0,25 mm med koncentrationszone 2,5 × 20 cm (Merck 11845, eller tilsvarende)****3.5. Mikrosprøjte, 10 µl****3.6. Mikrosprøjte, 25 µl****3.7. Varmeovn, anvendelig for temperaturer indtil 105 °C****3.8. 50 ml reagensglas med skruelåg****3.9. Filtrerpapir, Schleicher & Schull, Weisbond nr. 5892 eller tilsvarende, diameter 90 mm.****3.10. Universal-indikatorpapir, pH 1—11****3.11. 5 ml hætteglas til prøver****3.12. Rotationsinddamper (Rotavapor eller tilsvarende)****3.13. Varmeplade****4. Fremgangsmåde****4.1. Prøvetilberedning**

Ca. 1 g prøve afvejes i et 50 ml reagensglas med skruelåg (3.8). Der tilsættes fire dråber saltsyre, 4 M (2.8) og 40 ml acetone (2.2). Til stærkt basiske produkter som håndsæbe tilsættes 20 dråber saltsyre 4 M (2.8). Med indikatorpapir (3.10) kontrolleres, at pH er ca. 2. Glasset lukkes og omrystes kraftigt i et minut.

Hvis det er nødvendigt at fremskynde ekstraktionen af konserveringsstofferne over på acetonefasen, opvarmes blandingen forsigtigt til ca. 60 °C for at smelte fedtfasen. Opløsningen afkøles til rumtemperatur og filtreres gennem filtrerpapir (3.9) ned i en konisk kolbe. 20 ml af filtratet

overføres til en 200 ml konisk kolbe, der tilsættes 20 ml vand og blandes. pH af blandingen indstilles på ca. 10 med 4 M kaliumhydroxyd (2.9). Til pH målingen benyttes indikatorpapir (3.10).

Blandingen tilsættes 1 g calciumklorid (2.10), omrystes kraftigt og filtreres gennem filterpapir (3.9) over i en 250 ml skilletragt indeholdende 75 ml diethylether (2.3), og blandingen omrystes kraftigt i et minut. Lad faserne skille og aftap den vandige fase i en 250 ml konisk kolbe. Etherfasen kasseres. Den vandige fase pH indstilles til ca. 2 med 4 M saltsyre (2.8) ved brug af indikatorpapir (3.10). Derefter tilsættes 10 ml diethylether (2.3), og blandingen omrystes kraftigt i et minut. Når faserne er adskilt, overføres etherfasen til en rotationsinddampner (3.12). Den vandige fase kasseres. Etherfasen inddampes til næsten tørhed og inddampningsresten genopløses i 1 ml diethylether (2.3). Denne opløsning overføres til et hætteglas (3.11).

4.2. Tyndtlagskromatografi

For hver reference- og prøveopløsning, som skal kromatograferes, påsættes ca. 3 µl lithiumkarbonatopløsning (2.20) med en sprøjte (3.5) i lige stor afstand på startlinien af TLC-pladens (3.4) koncentrationszone, og pladen blæses tør med kold luft.

TLC-pladen anbringes på en varmeplade (3.13) opvarmet til 40 °C, for at holde pletterne så små som muligt. Med en mikrosprøjte (3.5) påsættes, på pladens startlinie nøjagtigt oven i de pletter, hvor lithiumkarbonatopløsningen påførtes, 10 µl af hver referenceopløsning (2.18) og prøveopløsningen (4.1).

Til slut påsættes ca. 15 µl derivatiseringsreagens (2.19) (2-brom-2'-acetonaphtonopløsning); igen nøjagtigt oven i de pletter, hvor reference- og prøveopløsninger samt lithiumkarbonatopløsningen påførtes.

TLC-pladen opvarmes i en ovn (3.7) ved 80 °C i 45 minutter.

Efter afkøling udvikles pladen i et TLC-kar (3.2), som på forhånd er ækvilibreret i 15 minutter (uden foring med filterpapir), med udviklingsvæske 2.21 (toluen/acetone), indtil væskefronten er vandret ca. 15 cm (det tager ca. 80 minutter).

TLC-pladen blæses tør med kold luft og undersøges under UV-lys (3.3.). For at forstærke fluorescensen af svage pletter kan TLC-pladen dyppes i flydende paraffin/n-hexan (2.22).

5. Identifikation

R_f -værdi af hver plet beregnes

Prøvens R_f og udseende under UV-lys sammenlignes med disse for referenceopløsningerne.

Drag en foreløbig konklusion med hensyn til identiteten af de tilstedeværende konserveringsstoffer. Udfør HPLC som beskrevet i afsnit B, eller GC som beskrevet i afsnit C, hvis tilstedeværelsen af propionsyre er påvist. Sammenlign de opnåede retentionstider for prøven med retentionstiderne af referenceopløsningerne.

Identifikation af konserveringsstofferne i prøven sker ved at kombinere resultaterne af TLC og HPLC eller GC.

B. BESTEMMELSERNE AF BENZOESYRE, 4-HYDROXYBENZOESYRE, SORBINSYRE OG SALICYLSYRE

1. Princip

Efter at være gjort sur ekstraheres prøven med en blanding af ethanol og vand. Efter filtrering bestemmes indholdet af konserveringsstoffer ved højtryksvæskeskromatografi (HPLC).

2. Reagenser

2.1. Alle reagenser skal være analyserene, og hvor det er hensigtsmæssigt egnet til HPLC. Det anvendte vand skal være destilleret eller af mindst tilsvarende renhed.

2.2. Ethanol, absolut

2.3. 4-Hydroxybenzoesyre

- 2.4. Salicylsyre
- 2.5. Benzoesyre
- 2.6. Sorbinsyre
- 2.7. Natriumacetat, $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
- 2.8. Eddikesyre, ($d_4^{20} = 1,05 \text{ g/ml}$)
- 2.9. Acetonitril
- 2.10. Svovlsyre, 2 M
- 2.11. Kaliumhydroxid, vandig, 0,2 M
- 2.12. 2-Methoxybenzoesyre
- 2.13. Ethanol/vandblanding:
Ni voluminer ethanol (2.2) blandes med et volumen vand (2.1).
- 2.14. Intern standardopløsning:
Opløs ca. 1 g 2-methoxybenzoesyre (2.12) i 500 ml ethanol/vandblanding (2.13).
- 2.15. Mobil fase til HPLC:
- 2.15.1. Acetatbuffer: Tilsæt 6,35 g natriumacetat (2.7) og 20 ml eddikesyre (2.8) til 1 l vand og bland.
- 2.15.2. Den mobile fase fremstilles ved at blande ni voluminer acetatbuffer (2.15.1) med et volumen acetonitril (2.9).
- 2.16. Stamopløsning af konserveringsstoffer:
Afvej ca. 0,05 g 4-hydroxybenzoesyre (2.3), 0,2 g salicylsyre (2.4), 0,2 g benzoesyre (2.5) og 0,05 g sorbinsyre (2.6) nøjagtigt i en 50 ml målekolbe og fyld op til mærket med ethanol/vandblandingen (2.13). Opløsningen opbevares i køleskab og er holdbar i en uge.
- 2.17. Standardopløsning af konserveringsstoffer:
Af stamopløsningen (2.16) overføres henholdsvis 8,00, 4,00, 2,00, 1,00 og 0,50 ml til 20 ml målekolber. Hver kolbe tilsættes 10,00 ml intern standardopløsning (2.14) og 0,5 ml svovlsyre 2 M (2.10). Fyld op til mærket med ethanol/vandblanding (2.13). Opløsningerne skal være friskfremstillede.
3. **Apparatur**
Sædvanligt laboratorieudstyr, som ikke er nærmere specificeret, og:
- 3.1. Vandbad ved 60 °C
- 3.2. HPLC udstyr med en 10 μl injektionsloop og en UV-detektor med variabel bølglængde.
- 3.3. Analytisk kolonne:
Rustfrit stål, længde 12,5—25 cm, indvendig diameter 4,6 mm, pakket med Nucleosil 5C18 eller tilsvarende.
- 3.4. Filtrerpapier, diameter: 90 mm, Schleicher og Schull, Weisband nr. 5892 eller tilsvarende.
- 3.5. 50 ml reagensglas med skruelåg

3.6. 5 ml hætteglas til prøver

3.7. Kogesten, carborundumkorn, størrelse 2—4 mm, eller tilsvarende.

4. Fremgangsmåde

4.1. Prøvetilberedning

4.1.1. Prøvetilberedning uden tilsætning af intern standard:

Ca. 1 g prøve afvejes i et 50 ml glas med skruelåg (3.5). 1,0 ml svovlsyre 2 M (2.10) og 40,0 ml ethanol/vandblanding (2.13) afpipetteres i glasset. Der tilsættes ca. 1 g carborundumkorn (3.7). Glasset lukkes og omrystes kraftigt i mindst et minut indtil en homogen suspension er dannet. Glasset anbringes i et vandbad ved 60 °C (3.1) i nøjagtigt 5 minutter for at lette ekstraktion af konserveringsstofferne over på ethanolfasen.

Glasset afkøles straks under rindende vand, og ekstraktet opbevares derefter i en time ved 5 °C. Ekstraktet filtreres gennem et filterpapir (3.4). Ca. 2 ml af det filtrerede ekstrakt overføres til et hætteglas (3.6). Ekstraktet opbevares ved 5 °C og HPLC-analysen udføres senest 24 timer efter ekstraktion.

4.1.2. Prøvetilberedning med tilsætning af intern standard:

Afvej til tredje decimal $1,0 \pm 0,1$ g (a gram) af prøven i et 50 ml glas med skruelåg (3.5). 1,0 ml svovlsyre 2 M (2.10) afpipetteres og derefter tilsættes 30,0 ml ethanol/vandblanding (2.13). Der tilsættes ca. 1 g carborundumkorn (3.7) og 10,0 ml intern standardopløsning (2.14). Glasset lukkes, og omrystes kraftigt i mindst et minut indtil en homogen suspension er dannet. Glasset anbringes i et vandbad (3.1) ved 60 °C i nøjagtigt 5 minutter for at lette ekstraktion af konserveringsstofferne over på ethanolfasen.

Glasset afkøles straks under rindende vand, og ekstraktet opbevares derefter ved 5 °C i en time.

Ekstraktet filtreres gennem et filterpapir (3.4). Ca. 2 ml af det filtrerede ekstrakt overføres til et hætteglas (3.6). Ekstraktet opbevares ved 5 °C og HPLC-bestemmelse udføres senest 24 timer efter fremstilling.

4.2. Højtryksvæskeskromatografi

Mobil fase: acetonitril/acetatbuffer (2.15)

Flow af den mobile fase (2.15) gennem kolonnen indstilles til 2,0 ml/min $\pm$ 0,5 ml/min.

4.2.1. Kalibrering

Der injiceres 10 μ l af hver af standardopløsningerne af konserveringsstoffer (2.17) i væskeskromatografen (3.2). Forholdet mellem tophøjde af de undersøgte konserveringsstoffer og af den interne standard bestemmes ved de opnåede kromatogrammer. For hvert konserveringsstof optegnes en kurve, der afbilder dette forhold mod standardopløsningens koncentration.

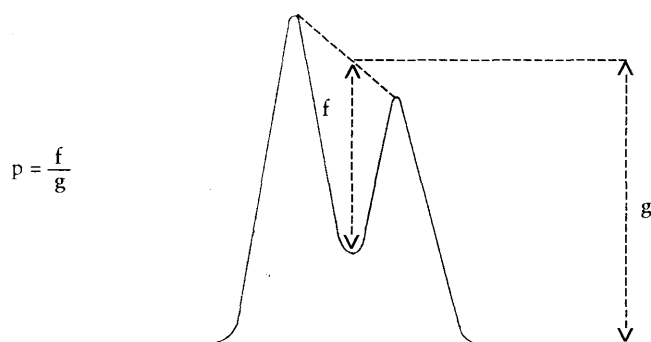
Kontrollér at der opnås lineær respons på de til kalibrering anvendte standardopløsninger.

4.2.2. Der injiceres 10 μ l prøveekstrakt (4.1.1) i væskeskromatografen (3.2) og kromatogrammet optages. Derefter injiceres 10 μ l standardopløsning af konserveringsstoffer (2.17) og kromatogrammet optages. De opnåede kromatogrammer sammenlignes. Hvis der i kromatogrammet af prøveekstraktet (4.1.1) ikke synes at være en top med tilnærmelsesvis samme retentionstid som 2-methoxybenzoesyre (anbefalet intern standard), injiceres 10 μ l prøveekstrakt tilsat intern standard (4.1.2) i kromatografen, og kromatogrammet optages.

Optræder der en interfererende top i kromatogrammet af prøveekstraktet (4.1.1) med samme retentionstid som 2-methoxybenzoesyre, vælges en mere velegnet intern standard. (Optræder et af de undersøgte konserveringsstoffer ikke i kromatogrammet, kan det pågældende stof bruges som intern standard).

Ved kromatogrammerne af en standardopløsning og et prøveekstrakt sikres, at disse opfylder følgende krav:

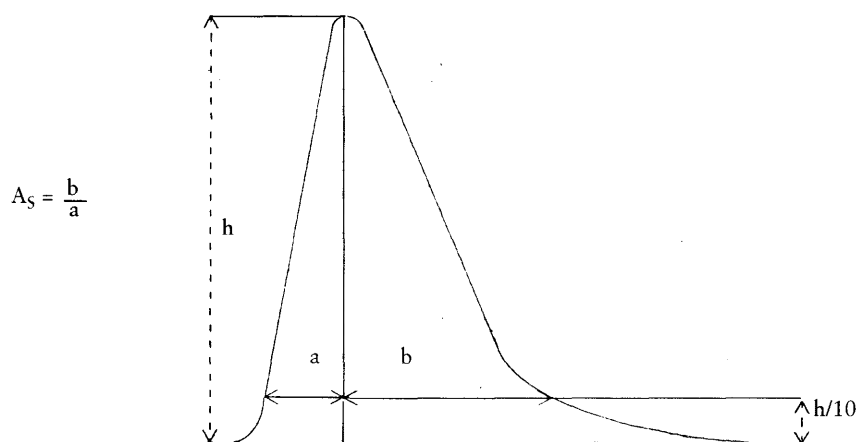
— adskillelsen af de to nærmest liggende toppe skal være mindst 0,9. (Topadskillelse er defineret i figur 1)



Figur 1 Topadskillelse (p)

Opnås den krævede adskillelse ikke, skal der enten anvendes en mere effektiv kolonne, eller sammensætningen af den mobile fase skal korrigeres, således at kravet opfyldes

- asymmetrifaktoren A_s skal for samtlige toppe være mellem 0,9 og 1,5. (Asymmetrifaktoren er defineret i figur 2). For optegnelse af kromatogram til bestemmelse af asymmetrifaktor anbefales en papirhastighed på mindst 2 cm/min

Figur 2 Asymmetrifaktor (A_s)

- grundlinien skal være stabil.

5. Beregning

Benyt forholdet mellem tophøjden af det undersøgte konserveringsstof og tophøjden af 2-methoxybenzoesyre (intern standard) og kalibreringskurven til beregning af koncentrationen af syrekonserveringsstof i prøveekstraktet. Indholdet af benzoesyre, 4-hydroxybenzoesyre, sorbinsyre og salicylsyre i prøven beregnes som masseprocent (X_i) ved hjælp af formlen:

$$x_i \% (m/m) = \frac{100 \cdot 20 \cdot b}{10^6 \cdot a} = \frac{b}{500 \cdot a}$$

hvor:

b = koncentration ($\mu\text{g/ml}$) af konserveringsstoffet i prøveekstraktet, aflæst på kalibreringskurven

a = masse (g) af prøven (4.1.2).

6. Repeterbarhed ⁽¹⁾

Ved et indhold af 4-hydroxybenzoesyre på 0,40 % bør forskellen mellem resultaterne af to sideløbende bestemmelser udført på samme prøve ikke overstige en absolut værdi på 0,035 %.

Ved et indhold af benzoesyre på 0,50 % bør forskellen mellem resultaterne af to sideløbende bestemmelser udført på samme prøve ikke overstige en absolut værdi på 0,050 %.

Ved et indhold af salicylsyre på 0,50 % bør forskellen mellem resultaterne af to sideløbende bestemmelser udført på samme prøve ikke overstige en absolut værdi på 0,045 %.

Ved et indhold af sorbinsyre på 0,60 % bør forskellen mellem resultaterne af to sideløbende bestemmelser udført på samme prøve ikke overstige en absolut værdi på 0,035 %.

7. Bemærkninger

7.1. Resultater af en robusthedstest på metoden viste, at den anvendte mængde svovlsyre til ekstraktion af syrekonserveringsstofferne fra prøven er kritisk, og at den tilberedte prøvemængde skal holdes inden for de foreskrevne grænser.

7.2. Om ønsket kan en egnet forkolonne anvendes.

C. BESTEMMELSE AF PROPIONSYRE**1. Formål og anvendelsesområde**

Denne metode kan anvendes til bestemmelse af propionsyre, maximal koncentration 2 % (m/m) i kosmetiske produkter.

2. Definition

Propionsyrekoncentration målt ved denne metode udtrykkes som masseprocent (% m/m) af produktet.

3. Princip

Efter ekstraktion af propionsyre fra produktet, udføres bestemmelse af propionsyre ved gaskromatografi, idet der bruges 2-methylpropionsyre som intern standard.

4. Reagenser

Alle reagenser skal være analyserene. Vand skal være destilleret eller af tilsvarende kvalitet.

4.1. Ethanol 96 % (v/v)

4.2. Propionsyre

4.3. 2-Methylpropionsyre

4.4. Orthofosforsyre, 10 % (m/v)

4.5. Propionsyreopløsning

Ca. 1,00 g (p gram) propionsyre afvejes nøjagtigt i en 50 ml målekolbe og fyldes op til mærket med ethanol (4.1).

4.6. Intern standardopløsning

Ca. 1,00 g (e gram) 2-methylpropionsyre afvejes nøjagtigt i en 50 ml målekolbe og fyldes op til mærket med ethanol (4.1).

⁽¹⁾ ISO 5725.

5. Apparatur

- 5.1. Sædvanligt laboratorieudstyr
- 5.2. Gaskromatograf med flammeionisationsdetektor
- 5.3. Reagensglas (20 × 150 mm) med skruelåg
- 5.4. Vandbad ved 60 °C
- 5.5. 10 ml glassprøjte med membranfilter (porestørrelse: 0,45 µm)

6. Fremgangsmåde**6.1. Prøvetilberedning****6.1.1. Prøvetilberedning uden intern standard**

Ca. 1 g prøve afvejes i et reagensglas (5.3). Tilsæt 0,5 ml fosforsyre (4.4) og 9,5 ml ethanol (4.1). Glasset lukkes og omrystes kraftigt. Glasset kan om nødvendigt anbringes i et vandbad ved 60 °C i 5 minutter, således at fedtfasen tilnærmelsesvis opløses. Afkøles hurtigt under rindende vand. En del af opløsningen filtreres gennem et membranfilter (5.5). Filtratet kromatograferes samme dag.

6.1.2. Prøvetilberedning med intern standard

1 ± 0,1 g (a gram) prøve afvejes med tre decimaler i et reagensglas (5.3). Tilsæt 0,50 ml fosforsyre (4.4), 0,50 ml intern standardopløsning (4.6) og 9 ml ethanol (4.1).

Glasset lukkes og omrystes kraftigt. Glasset kan om nødvendigt anbringes i et vandbad ved 60 °C i 5 minutter, således at fedtfasen tilnærmelsesvis opløses.

Afkøles hurtigt under rindende vand. En del af opløsningen filtreres gennem et membranfilter (5.5). Filtratet kromatograferes samme dag.

6.2. Betingelser for gaskromatografi

Følgende betingelser anbefales:

Kolonne

Type	Rustfrit stål
Længde	2 m
Diameter	1/8"
Pakning	10 % SP TM 1000 (eller tilsvarende) + 1 % H ₃ PO ₄ på Chromosorb WAW 100—120 mesh

Temperatur

Injektor	200 °C
Kolonne	120 °C
Detektor	200 °C

Bæregas

Nitrogen	
Flow	25 ml/min

6.3. Kromatografi**6.3.1. Kalibrering**

Til en række 20 ml målekolber overføres med pipette henholdsvis 0,25, 0,50, 1,00, 2,00 og 4,00 ml propionsyreopløsning (4.5). Til hver målekolbe tilsættes med pipette 1,00 ml intern standardopløsning (4.6). Der fyldes op til strengen med ethanol (4.1) og blandes. Opløsninger, der tilberedes på denne måde, indeholder e mg/ml 2-methylpropionsyre som intern standard (dvs. 1 mg/ml hvor e = 1,000) og p/4, p/2, p, 2p, 4p mg/ml propionsyre (dvs. 0,25, 0,50, 1,00, 2,00, 4,00 mg/ml, hvor p = 1,000).

Injicér 1 µl af hver af disse opløsninger og tegn kalibreringskurven ved at optegne propionsyre/2-methylpropionsyre masseforholdet på x-aksen og forholdet af de tilsvarende toparealer på y-aksen.

Foretag tre injektioner af hver opløsning og udregn gennemsnitlige toparealforhold.

6.3.2. Bestemmelse

Injicér 1 µl af prøvefiltratet 6.1.1. Sammenlign kromatogrammet med kromatogrammet for en af standardopløsningerne (6.3.1). Hvis en top har omtrent samme retentionstid som 2-methylpropionsyre, ændres den interne standard. Hvis der ikke observeres interferens, injiceres 1 µl af prøvefiltratet 6.1.2, og toparealerne af propionsyre og intern standard måles.

Foretag tre injektioner af hver opløsning og beregn gennemsnitlige toparealforhold.

7. Beregning

7.1. På den fremkomne kalibreringskurve 6.3.1 aflæses masseforholdet (K) svarende til toparealforholdet beregnet i 6.3.2.

7.2. På grundlag af det således fremkomne masseforhold beregnes prøvens indhold af propionsyre (x) som masseprocent, idet følgende formel anvendes:

$$x \% (m/m) = K \frac{0,5 \cdot 100 \cdot e}{50 \cdot a} = K \frac{e}{a}$$

Hvor

K = forholdet beregnet i 7.1

e = massen i gram af den interne standard afvejet i 4.6

a = massen i g af prøven afvejet i 6.1.2

Afrund resultaterne til en decimal.

8. Repeterbarhed ⁽¹⁾

For et propionsyreindhold på 2 % må afvigelsen mellem resultaterne af to parallelle bestemmelser udført på samme prøve ikke overstige 0,12 %.

II. IDENTIFIKATION OG BESTEMMELSE AF HYDROQUINON, HYDROQUINONMONOMETHYLETHER, HYDROQUINONMONOETHYLETHER OG HYDROQUINONMONOBENZYLETHER I KOSMETISKE PRODUKTER

A. IDENTIFIKATION

1. Formål og anvendelsesområde

Denne metode anvendes til identifikation af hydroquinon, hydroquinonmonomethylether, hydroquinonmonoethylether og hydroquinonmonobenzylether (monobenzon) i kosmetiske produkter til hudblegning.

2. Princip

Hydroquinon og dets ethere identificeres ved tyndtlagskromatografi (TLC).

3. Reagenser

Alle reagenser skal være analyserene.

⁽¹⁾ ISO 5725.

- 3.1. Ethanol, 96 % (v/v)
- 3.2. Chloroform
- 3.3. Diethylether
- 3.4. Udviklingsvæske:
Chloroform/diethylether, 66/33 (v/v)
- 3.5. Ammoniak, 25 % (m/m) ($d_4^{20} = 0,91$ g/ml)
- 3.6. Ascorbinsyre
- 3.7. Hydroquinon
- 3.8. Hydroquinonmonomethylether
- 3.9. Hydroquinonmonoethylether
- 3.10. Hydroquinonmonobenzylether (monobenzon)
- 3.11. Referenceopløsninger
- Følgende referenceopløsninger skal være frisk fremstillede, og disse har holdbarhed på en dag.
- 3.11.1. Afvej 0,05 g hydroquinon (3.7) i et 10 ml graderet reagensglas med inddeling. Tilsæt 0,250 g ascorbinsyre (3.6) og 5 ml ethanol (3.1). Tilsæt ammoniak (3.5) indtil pH er 10 og fyld op til 10 ml med ethanol (3.1).
- 3.11.2. Afvej 0,05 g hydroquinonmonomethylether (3.8) i et 10 ml reagensglas med inddeling. Tilsæt 0,250 g ascorbinsyre (3.6) og 5 ml ethanol (3.1). Tilsæt ammoniak (3.5) indtil pH er 10 og fyld op til 10 ml med ethanol (3.1).
- 3.11.3. Afvej 0,05 g hydroquinonmonoethylether (3.9) i et 10 ml reagensglas med inddeling. Tilsæt 0,250 g ascorbinsyre (3.6) og 5 ml ethanol (3.1). Tilsæt ammoniak (3.5) indtil pH er 10 og fyld op til 10 ml med ethanol (3.1).
- 3.11.4. Afvej 0,05 g hydroquinonmonobenzylether (3.10) i et 10 ml reagensglas med inddeling. Tilsæt 0,250 g ascorbinsyre (3.6) og 5 ml ethanol (3.1). Tilsæt ammoniak (3.5) indtil pH er 10 og fyld op til 10 ml med ethanol (3.1).
- 3.12. Sølvnitrat
- 3.13. 12-Phosphormolybdænsyre
- 3.14. Kaliumferricyanid
- 3.15. Ferrichlorid-hexahydrat
- 3.16. Sprayreagens
- 3.16.1. Der tilsættes ammoniak (3.5) til en 5 % (m/v) vandig opløsning af sølvnitrat indtil det dannede bundfald opløses.
- Advarsel:*
- Opløsningen skal bortskaffes efter brug, idet denne ved henstand bliver eksplosionsfarlig ustabil.
- 3.16.2. Der fremstilles en 10 % (m/v) opløsning af 12-phosphormolybdænsyre (3.13) i ethanol (3.1).

- 3.16.3. Der fremstilles en 1 % (m/v) vandig opløsning af kaliumferricyanid (3.12) og en 2 % (m/v) vandig opløsning af ferrichlorid (3.15). Lige dele af begge opløsninger blandes umiddelbart før brug.

4. Apparatur

Almindeligt laboratorieudstyr, og

- 4.1. Sædvanlig TLC-udstyr
- 4.2. TLC-plader, klar til brug: Kiselgel GHR/UV254, 20 × 20 cm (Machery, Nagel eller tilsvarende) lagtykkelse 0,25 mm
- 4.3. Ultralydsbad
- 4.4. Centrifuge
- 4.5. UV-lampe, 254 nm

5. Fremgangsmåde

5.1. Prøvetilberedning

Afvej 3,0 g prøve i et 10 ml reagensglas med inddeling. Tilsæt 0,250 g ascorbinsyre (3.6) og 5 ml ethanol (3.1). Instil pH til 10 med ammoniak (3.5). Fyld op til 10 ml med ethanol (3.1). Sæt prop i, og homogeniser 10 min i et ultralydsbad. Filtrer gennem et filtrerpapir eller centrifuger ved 3 000 omdrejninger pr. min.

5.2. TLC

5.2.1. Kromatografikarret mættes med udviklingsvæske (3.4).

5.2.2. På en TLC-plade påsættes 2 µl af hver af referenceopløsningerne (3.11) og 2 µl af prøveopløsningen (5.1). Pladen udvikles i mørke ved stuetemperatur indtil væskefronten er vandret 15 cm fra startpunktet.

5.2.3. Fjern pladen og lad den tørre ved stuetemperatur.

5.3. Detektion

5.3.1. Iagttag pladen under UV-lys ved 254 nm og markér positionen af pletter.

5.3.2. Sprøjt pladen med:

- sølvnitrat reagens (3.16.1); eller
- phosphormolybdænsyre reagens (3.16.2), og opvarm til 120 °C; eller
- en frisk fremstillet blanding af lige dele af kaliumferricyanidopløsning og ferrichloridopløsning (3.16.3).

6. Identifikation

Beregn R_f -værdi af hver plet. Sammenlign pletterne påvist for prøveopløsningen med pletterne påvist for referenceopløsningerne mht: R_f -værdier, farven af pletterne under UV-lys, farven af pletterne efter påvisning med sprayreagens.

Udfør HPLC som beskrevet i følgende afsnit (B) og sammenlign retentionstider af prøvens kromatografiske toppe med retentionstider af kromatografiske toppe af referenceopløsninger.

Kombiner resultater af TLC og HPLC for at identificere tilstedeværelse af hydroquinon og dets ethere i prøven.

7. Bemærkninger

Under de beskrevne betingelser var R_f -værdierne følgende:

Hydroquinon	0,32
Hydroquinonmonomethylether	0,53
Hydroquinonmonoethylether	0,55
Hydroquinonmonobenzylether	0,58

B. BESTEMMELSE

1. Formål og anvendelsesområde

I denne metode beskrives fremgangsmåden ved bestemmelse af hydroquinon, hydroquinonmonomethylether, hydroquinonmonoethylether og hydroquinonmonobenzylether.

2. Princip

Prøven ekstraheres med vand/ethanol under svag varme for at opløse tilstedeværende fedtstoffer. Blandingen filtreres. Analytterne i filtratet bestemmes ved omvendt fase væskkromatografi med UV-detektion.

3. Reagenser

3.1. Alle reagenser skal være analyserene. Der anvendes destilleret vand eller vand af tilsvarende renhed.

3.2. Methanol

3.3. Hydroquinon

3.4. Hydroquinonmonomethylether

3.5. Hydroquinonmonoethylether

3.6. Hydroquinonmonobenzylether

3.7. Tetrahydrofuran, HPLC-kvalitet

3.8. Vand/methanol-blanding 1 : 1 (v/v)

Bland 1 del vand og 1 del methanol (3.2)

3.9. Mobil fase: Tetrahydrofuran/vand-blanding 45 : 55

Bland 45 volumenmængde af tetrahydrofuran (3.7) og 55 volumenmængde af vand.

3.10. Referenceopløsning

Der fremstilles en opløsning indeholdende ca. 0,08 g hydroquinon (3.3), 0,08 g hydroquinonmonomethylether (3.4), 0,10 g hydroquinonmonoethylether (3.5) og 0,12 g hydroquinonmonobenzylether (3.6), afvejet nøjagtigt, pr. 50,00 ml methanol (3.2). Fremstil referenceopløsning ved at fortynde 10,00 ml af ovennævnte opløsning til 50,00 ml med vand/ethanol blanding (3.8). Opløsningerne skal være frisk fremstillede.

4. Apparatur

Normalt laboratorieudstyr medmindre andet er specificeret, og

4.1. Vandbad ved 60 °C.

4.2. Højtryksvæskkromatograf med UV-detektor, bølgelængde 295 nm, og 10 µl injektionsloop.

4.3. Analytisk-kolonne

En rustfrit stål kromatografisk-kolonne, længde 250 mm, intern diameter 4,6 mm, pakket med Zorbax phenyl, eller tilsvarende. Der må ikke anvendes forkolonne undtagen phenyl-forkolonne eller tilsvarende.

4.4. Filtrerpapir, 90 mm diameter, Schleicher and Schull, Weisbond no. 5892, eller tilsvarende.

5. Fremgangsmåde

5.1. Prøvetilberedning

1 g prøve afvejes med tre decimalers nøjagtighed til nærmeste 0,1 g (a gram) i en 50 ml målekolbe. Prøven dispergeres i 25 ml vand/methanol blanding (3.8). Sæt prop i kolben og omryst kraftigt til en homogen suspension opnås. Der omrystes i mindst et min. Anbring flasken i et vandbad ved 60 °C for at fremme ekstraktionen. Afkøl flasken og fyld op til mærket med vand/methanol (3.8). Filtrer ekstrakten ved brug af filtrerpapir (4.4).

5.2. Højtryksvæskerkromatografi

5.2.1. Indstil flow af den mobile fase (3.9) til 1,0 ml pr. min.

5.2.2. Injicér 10 µl af prøveopløsningen, fremstillet som beskrevet i punkt 5.1, og optag kromatogram. Mål toparealerne. Udfør kalibrering som beskrevet under punkt 5.3. Sammenlign kromatogrammet af prøven med kromatogrammer af standardopløsningerne. Benyt toparealerne og responsfaktorerne (RF), beregnet under punkt 5.3, til at udregne koncentrationen af analytterne i prøveopløsningen.

5.3. Kalibrering

Injicér 10 µl af referenceopløsningen (3.10) og optag kromatogram. Injicér flere gange indtil konstant topareal opnås.

Beregn responsfaktoren:

$$RF_i = \frac{p_i}{c_i}$$

hvor

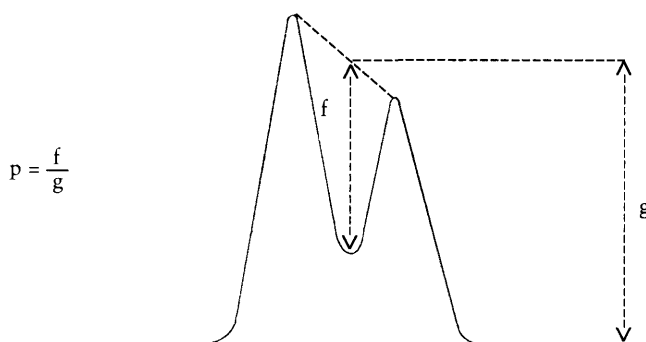
p_i = toparealet for hhv. hydroquinon, hydroquinonmonomethylether, hydroquinonmonoethylether eller hydroquinonmonobenzylether

c_i = koncentrationen (mg/50 ml) i referenceopløsning (3.10) af hhv. hydroquinon, hydroquinonmonomethylether, hydroquinonmonoethylether eller hydroquinonmonobenzylether.

Bemærk:

Ud fra kromatogrammer af referenceopløsningen og prøveopløsningen kontrolleres, at disse opfylder følgende krav:

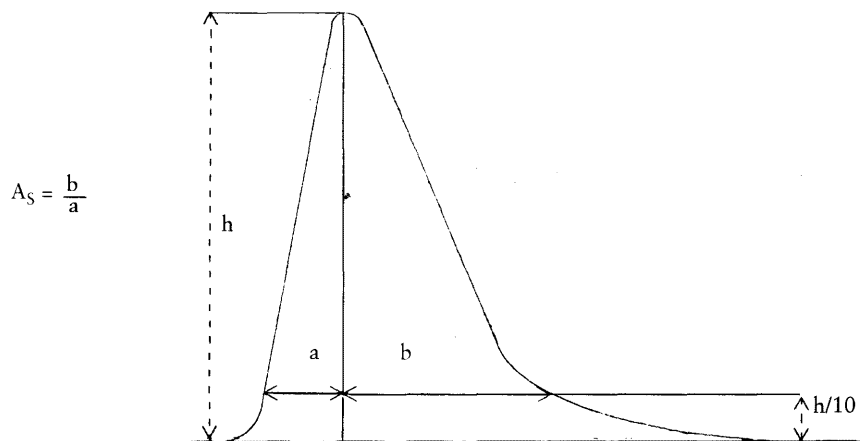
— Adskillelsen af to tættest liggende toppe skal være over 0,90. Top-adskillelse er defineret i figur 1.



Figur 1 Topadskillelse (p)

Opnås den krævede adskillelse ikke, skal der enten anvendes en mere effektiv kolonne, eller sammensætningen af den mobile fase korrigeres, således at kravet kan opfyldes.

- Asymmetrifaktoren A_s skal for samtlige toppe være mellem 0,9 og 1,5. Asymmetrifaktoren er defineret i figur 2. For optegnelsen af kromatogram til bestemmelse af asymmetrifaktorer anbefales en papirhastighed på mindst 2 cm/min.



Figur 2 Asymmetrifaktor (A_s)

- grundlinjen skal være stabil.

6. Beregning

Anvend arealerne af analyt-toppe for at beregne koncentrationen af analytter i prøven. Beregn analytkoncentrationen (x_i) ved brug af formlen:

$$x_i \% (m/m) = \frac{b_i \cdot 100}{RF_i \cdot a}$$

hvor

a = massen af prøven i mg

b_i = topareal af analyt »i« i prøven

7. Reperterbarhed ⁽¹⁾

- 7.1. For et hydroquinonindhold på 2 % bør afvigelsen mellem resultaterne af to bestemmelser udført sideløbende på samme prøve ikke overstige 0,13 %, absolut værdi.
- 7.2. For et hydroquinonmonomethyletherindhold på 1 % bør afvigelsen mellem resultaterne af to bestemmelser udført sideløbende på samme prøve ikke overstige 0,1 %, absolut værdi.
- 7.3. For et hydroquinonmonoethyletherindhold på 1 % bør afvigelsen mellem resultaterne af to bestemmelser udført sideløbende på samme prøve ikke overstige 0,11 %, absolut værdi.
- 7.4. For et hydroquinonmonobenzyletherindhold på 1 % bør afvigelsen mellem resultaterne af to bestemmelser udført sideløbende på samme prøve ikke overstige 0,11 %, absolut værdi.

8. Reproducerbarhed ⁽¹⁾

- 8.1. For et hydroquinonindhold på 2 % bør afvigelsen mellem resultaterne af to bestemmelser udført på samme prøve under forskellige betingelser (forskellige laboratorier, forskellige operatører, forskelligt apparatur og/eller forskellige tidsrum) ikke overstige 0,37 %, absolut værdi.

⁽¹⁾ ISO 5725

- 8.2. For et hydroquinonmonomethyletherindhold på 1 % bør afvigelsen mellem resultaterne af to bestemmelser udført på samme prøve under forskellige betingelser (forskellige laboratorier, forskellige operatører, forskelligt apparatur og/eller forskellige tidsrum) ikke overstige 0,21 %, absolut værdi.
- 8.3. For et hydroquinonmonoethyletherindhold på 1 % bør afvigelsen mellem resultaterne af to bestemmelser udført på samme prøve under forskellige betingelser (forskellige laboratorier, forskellige operatører, forskelligt apparatur og/eller forskellige tidsrum) ikke overstige 0,19 %, absolut værdi.
- 8.4. For et hydroquinonmonobenzyletherindhold på 1 % bør afvigelsen mellem resultaterne af to bestemmelser udført på samme prøve under forskellige betingelser (forskellige laboratorier, forskellige operatører, forskelligt apparatur og/eller forskellige tidsrum) ikke overstige 0,11 %, absolut værdi.

9. Bemærkninger

- 9.1. Når indholdet af hydroquinon i en prøve er betydeligt større end 2 % og et præcist estimat af indholdet kræves, skal prøveekstrakten (5.1.) fortyndes til en koncentration svarende til den, der opnås ved en prøve som indeholder 2 % hydroquinon og bestemmelsen gentages.

(I nogle instrumenter kan absorbansen for høje hydroquinonkoncentrationer være uden for det lineære område af detektorens respons).

9.2. Interferens

- 9.3. Ved nærværende metode bestemmes hydroquinon og dets ethere i en enkelt isokratisk kørsel. Anvendelsen af phenyl-kolonne sker for at sikre tilstrækkelig retention af hydroquinon. Dette kan ikke garanteres, hvis en C18-kolonne anvendes med den beskrevne mobile fase.

Ved HPLC-metoden beskrevet her, er der tilbøjelighed til interferens med flere parabener. I et sådan tilfælde skal bestemmelsen gentages, idet der anvendes et andet mobil fase-/stationær fase-system. Egnede metoder er beskrevet i reference 1 og 2.

1) Kolonne: Zorbax ODS, 4,6 mm × 25 cm, eller tilsvarende

Temperatur: 36 °C

Flow: 1,5 ml/min

Mobil fase:

- hydroquinon: methanol/vand 5/95 (v/v)
- hydroquinonmonomethylether: methanol/vand 30/70 (v/v)
- hydroquinonmonobenzylether: methanol/vand 80/20 (v/v) ⁽¹⁾

2) Kolonne: Spherisorb S5-ODS, eller tilsvarende

Mobil fase: Vand/methanol 90/10 (v/v)

Flow: 1,5 ml min

Disse betingelser er egnede til analyse af hydroquinon ⁽²⁾.

⁽¹⁾ M. Herpol-Borremans et M.-O. Masse, Identification et dosage de l'hydroquinone et de ses éthers méthylique et benzylique dans les produits cosmétiques pour blanchir la peau. Int. j. Cosmet. Sci. 8 203—214 (1986).

⁽²⁾ J. Firth and I. Rix, Determination of Hydroquinone in skin toning creams, Analyst (1986), 111, p. 129.