

SIXIÈME DIRECTIVE 95/32/CE DE LA COMMISSION

du 7 juillet 1995

relative aux méthodes d'analyse nécessaires au contrôle de la composition des produits cosmétiques

(Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE)

LA COMMISSION DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES,

vu le traité instituant la Communauté européenne,

vu la directive 76/768/CEE du Conseil, du 27 juillet 1976, concernant le rapprochement des législations des États membres relatives aux produits cosmétiques ⁽¹⁾, modifiée en dernier lieu par la directive 94/32/CE de la Commission ⁽²⁾, et notamment son article 8 paragraphe 1,

considérant que la directive 76/768/CEE prévoit des contrôles officiels visant à constater que les conditions prévues par les dispositions communautaires concernant la composition des produits cosmétiques sont respectées;

considérant qu'il convient d'établir le plus rapidement possible toutes les méthodes d'analyse nécessaires et que certaines méthodes ont déjà été adoptées par la directive 80/1335/CEE de la Commission ⁽³⁾, modifiée par la directive 87/143/CEE ⁽⁴⁾, par la directive 82/434/CEE de la Commission ⁽⁵⁾, modifiée par la directive 90/207/CEE ⁽⁶⁾, et par les directives 83/514/CEE ⁽⁷⁾, 85/490/CEE ⁽⁸⁾ et 93/73/CEE de la Commission ⁽⁹⁾;

considérant que l'identification et le dosage de l'acide benzoïque, de l'acide 4-hydroxybenzoïque, de l'acide sorbique, de l'acide salicylique et de l'acide propionique dans les produits cosmétiques, et l'identification et le dosage de l'hydroquinone, du monométhyléther d'hydroquinone, du monoéthyléther d'hydroquinone et du monobenzyléther d'hydroquinone dans les produits cosmétiques constituent une sixième étape;

considérant que les mesures prévues à la présente directive sont conformes à l'avis du comité pour l'adaptation au progrès technique de la directive 76/768/CEE,

A ARRÊTÉ LA PRÉSENTE DIRECTIVE:

Article premier

Les États membres prennent toutes les mesures utiles pour que, lors des contrôles officiels des produits cosmétiques:

— l'identification et le dosage de l'acide benzoïque, de l'acide 4-hydroxybenzoïque, de l'acide sorbique, de l'acide salicylique et de l'acide propionique,

— l'identification et le dosage de l'hydroquinone, du monométhyléther d'hydroquinone, du monoéthyléther d'hydroquinone et du monobenzyléther d'hydroquinone

soient effectués selon les méthodes décrites à l'annexe.

Article 2

1. Les États membres mettent en vigueur les dispositions législatives, réglementaires et administratives nécessaires pour se conformer à la présente directive au plus tard le 30 septembre 1996. Il en informent immédiatement la Commission.

Lorsque les États membres adoptent ces dispositions, celles-ci contiennent une référence à la présente directive ou sont accompagnées d'une telle référence lors de leur publication officielle. Les modalités de cette référence sont arrêtées par les États membres.

2. Les États membres communiquent à la Commission le texte des dispositions de droit interne qu'ils adoptent dans le domaine régi par la présente directive.

Article 3

La présente directive entre en vigueur le vingtième jour suivant celui de sa publication au *Journal officiel des Communautés européennes*.

Article 4

Les États membres sont destinataires de la présente directive.

Fait à Bruxelles, le 7 juillet 1995.

Par la Commission

Emma BONINO

Membre de la Commission

⁽¹⁾ JO n° L 262 du 27. 9. 1976, p. 169.

⁽²⁾ JO n° L 181 du 15. 7. 1994, p. 31.

⁽³⁾ JO n° L 383 du 31. 12. 1980, p. 27.

⁽⁴⁾ JO n° L 57 du 27. 2. 1987, p. 56.

⁽⁵⁾ JO n° L 185 du 30. 6. 1982, p. 1.

⁽⁶⁾ JO n° L 108 du 28. 4. 1990, p. 92.

⁽⁷⁾ JO n° L 291 du 24. 10. 1983, p. 9.

⁽⁸⁾ JO n° L 295 du 7. 11. 1985, p. 30.

⁽⁹⁾ JO n° L 231 du 14. 9. 1993, p. 34.

ANNEXE

I. IDENTIFICATION ET DÉTERMINATION DE L'ACIDE BENZOÏQUE, DE L'ACIDE 4-HYDROXYBENZOÏQUE, DE L'ACIDE SORBIQUE, DE L'ACIDE SALICYLIQUE ET DE L'ACIDE PROPIONIQUE DANS LES PRODUITS COSMÉTIQUES**1. Objet et champ d'application**

Cette méthode est applicable à l'identification et au dosage de l'acide benzoïque, de l'acide 4-hydroxybenzoïque, de l'acide sorbique et de l'acide salicylique dans les produits cosmétiques. Des modes opératoires différents concernent l'identification de ces conservateurs, le dosage de l'acide propionique et celui de l'acide 4-hydroxybenzoïque, de l'acide salicylique, de l'acide sorbique et de l'acide benzoïque.

2. Définition

Les teneurs en acide benzoïque, en acide 4-hydroxybenzoïque, en acide sorbique et en acide salicylique déterminées par cette méthode sont exprimées en pourcentage de masse des acides libres.

A. IDENTIFICATION**1. Principe**

Après extraction acide/base des conservateurs, l'extrait obtenu est analysé par chromatographie sur couche mince avec dérivation sur plaque. En fonction des résultats, l'identification est confirmée par chromatographie en phase liquide à haute performance ou, dans le cas de l'acide propionique, par chromatographie en phase gazeuse.

2. Réactifs**2.1. Généralités**

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique. Il convient d'employer de l'eau distillée ou une eau d'une pureté au moins équivalente.

2.2. Acétone**2.3. Diéthyle oxyde****2.4. Acétonitrile****2.5. Toluène****2.6. n-Hexane****2.7. Paraffine liquide****2.8. Acide chlorhydrique, 4 M****2.9. Hydroxyde de potassium, 4 M en solution aqueuse****2.10. Chlorure de calcium $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$** **2.11. Carbonate de lithium Li_2CO_3** **2.12. 2-Bromo-2'-acétonaphtone****2.13. Acide 4-hydroxybenzoïque****2.14. Acide salicylique****2.15. Acide benzoïque****2.16. Acide sorbique****2.17. Acide propionique**

- 2.18. Solutions témoins
Préparer une solution à 0,1 % (m/v) (100 mg/100 ml) pour chacun des cinq conservateurs (2.13 à 2.17) dans le diéthyleoxyde (2.3).
- 2.19. Réactif de dérivation
Solution à 0,5 % (m/v) de 2-bromo-2'-acétonaphtone (2.12) dans de l'acétonitrile (2.4) (50 mg/10 ml). Il convient de renouveler cette solution chaque semaine et de la conserver au réfrigérateur.
- 2.20. Catalyseur en solution
Solution aqueuse à 0,3 % (m/v) de carbonate de lithium (300 mg/100 ml). Cette solution doit être fraîchement préparée.
- 2.21. Solvant d'éluion
Toluène (2.5)/Acétone (2.2) [20:0,5; (v/v)]
- 2.22. Paraffine liquide (2.7)/n-hexane (2.6) [1:2; (v/v)]
3. **Appareillage**
Équipement normal de laboratoire
- 3.1. Bain-marie à 60 °C
- 3.2. Cuve de développement
- 3.3. Source de lumière ultra-violette, 254 et 366 nm
- 3.4. Plaques pour CCM type Kieselgel 60, sans indicateur de fluorescence, 20 × 20 cm, épaisseur de la couche 0,25 mm avec zone de concentration de 2,5 × 20 cm (Merck 11845 ou équivalent)
- 3.5. Microseringue 10 µl
- 3.6. Microseringue 25 µl
- 3.7. Étuve à 105 °C
- 3.8. Tubes de verre de 50 ml avec bouchon à vis
- 3.9. Papier filtre, diamètre 90 mm, Schleicher et Schull, Weissband n° 5892 ou équivalent
- 3.10. Papier indicateur universel de pH, pH 1-11
- 3.11. Flacons à échantillon en verre, de 5 ml
- 3.12. Évaporateur rotatif (Rotovapor ou équivalent)
- 3.13. Plaque chauffante
4. **Mode opératoire**
- 4.1. Préparation de l'échantillon
Peser environ 1 g d'échantillon dans un tube de verre de 50 ml à bouchon à vis (3.8). Ajouter quatre gouttes d'acide chlorhydrique 4 M (2.8) et 40 ml d'acétone (2.2). [Pour les produits fortement basiques tels que les savons de toilette, il convient d'ajouter 20 gouttes d'acide chlorhydrique 4 M (2.8).] Vérifier que le pH est d'environ 2 à l'aide du papier indicateur (3.10). Fermer le tube et agiter vigoureusement pendant une minute.

Le cas échéant, faciliter l'extraction des conservateurs dans la phase acétone en chauffant doucement le mélange à 60 °C afin de faire fondre la phase lipidique.

Laisser refroidir la solution à température ambiante et filtrer sur papier filtre (3.9) dans une fiole conique.

Transférer 20 ml du filtrat dans une fiole conique de 200 ml, ajouter 20 ml d'eau et mélanger. Ajuster le pH du mélange à environ 10 à l'aide d'hydroxyde de potassium 4 M (2.9). Mesurer le pH à l'aide du papier indicateur (3.10).

Ajouter 1 g de chlorure de calcium (2.10) et agiter vigoureusement. Filtrer sur papier filtre (3.9) dans une ampoule à décanter de 250 ml contenant 75 ml de diéthyle oxyde (2.3) et agiter vigoureusement pendant une minute. Laisser décanter puis récupérer la couche aqueuse dans une fiole conique de 250 ml. Éliminer la couche d'éther. À l'aide du papier indicateur (3.10), ajuster le pH de la solution aqueuse à environ 2, au moyen d'acide chlorhydrique 4 M (2.8). Ajouter ensuite 10 ml de diéthyle oxyde (2.3), boucher la fiole et agiter ensuite 10 ml de diéthyle oxyde (2.3), boucher la fiole et agiter vigoureusement pendant une minute. Laisser décanter puis transférer la couche d'éther dans un évaporateur rotatif (3.12). Éliminer la couche aqueuse.

Évaporer la couche d'éther presque à siccité et dissoudre le résidu dans 1 ml de diéthyle oxyde (2.3). Transférer la solution obtenue dans un flacon échantillon (3.11).

4.2. Chromatographie sur couche mince

Pour chacun des solutions témoins et des échantillons à chromatographier, appliquer environ 3 μ l de solution de carbonate de lithium (2.20) à l'aide d'une seringue (3.5) à intervalles réguliers le long de la ligne de dépôt dans la zone de concentration d'une plaque de chromatographie sur couche mince (3.4) et sécher dans un courant d'air froid.

Placer la plaque pour CCM (3.4) sur une plaque chauffante (3.13) portée à 40 °C, afin de maintenir les taches aussi petites que possible. À l'aide d'une microseringue (3.5), appliquer 10 μ l de chaque solution témoin (3.17) et de la solution échantillon (4.1) sur la ligne de dépôt de la plaque, exactement sur les taches de solution de carbonate de lithium.

Appliquer enfin environ 15 μ l de réactif de dérivation (2.19) (solution d'alpha-bromo-2-acétonaphtone) également exactement sur les taches de solutions témoins et d'échantillon ainsi que de solution Li₂CO₃.

Chauffer la plaque de chromatographie pendant 45 minutes dans une étuve à 80 °C (3.7).

Après refroidissement, développer la plaque dans une cuve (3.2) préalablement saturée pendant 15 minutes (sans l'aide d'une garniture de papier filtre) avec un solvant d'élution toluène/acétone (2.21) jusqu'à ce que le front de solvant ait atteint une distance de 15 cm (80 minutes environ).

Sécher la plaque dans un courant d'air froid et examiner à la lumière ultra-violette (3.3) les taches obtenues. Afin de renforcer la fluorescence des taches les moins visibles, la plaque peut être plongée dans un bain de paraffine liquide/n-hexane (2.22).

5. Identification

Calculer le R_f pour chaque tache.

Comparer le R_f et le comportement aux rayons ultra-violet de l'échantillon et des solutions témoins.

Tirer une première conclusion sur l'identité des conservateurs présents. Procéder à la chromatographie en phase liquide à haute performance décrite à la partie B, ou à la chromatographie en phase gazeuse s'il y a présence d'acide propionique. Comparer les temps de rétention obtenus à ceux des solutions témoins.

Tenir compte des résultats obtenus en chromatographie sur couche mince et en chromatographie en phase liquide à haute performance ou en phase gazeuse, afin d'identifier les conservateurs présents dans l'échantillon.

B. DOSAGE DE L'ACIDE BENZOÏQUE, DE L'ACIDE 4-HYDROXYBENZOÏQUE, DE L'ACIDE SORBIQUE ET DE L'ACIDE SALICYLIQUE

1. Principe

Après acidification, l'échantillon est extrait à l'aide d'un mélange d'eau et d'éthanol. Après filtration, des conservateurs sont dosés par chromatographie en phase liquide à haute performance.

2. Réactifs

- 2.1. Tous les réactifs doivent être de pureté analytique. Il convient d'utiliser de l'eau distillée ou une eau d'une pureté au moins équivalente.
- 2.2. Éthanol absolu
- 2.3. Acide 4-hydroxybenzoïque

- 2.4. Acide salicylique
 - 2.5. Acide benzoïque
 - 2.6. Acide sorbique
 - 2.7. Acétate de sodium ($\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$)
 - 2.8. Acide acétique $d_4^{20} = 1,05$ g/ml
 - 2.9. Acétonitrile
 - 2.10. Acide sulfurique 2 M
 - 2.11. Hydroxyde de potassium aqueux 0,2 M
 - 2.12. Acide 2-méthoxybenzoïque
 - 2.13. Mélange eau/éthanol:
mélanger 9 volumes d'éthanol (2.2) et un volume d'eau (2.1).
 - 2.14. Solution d'étalon interne:
préparer une solution contenant environ 1 g d'acide 2-méthoxybenzoïque (2.12) dans 500 ml de mélange eau/éthanol (2.13).
 - 2.15. Phase mobile pour CLHP
 - 2.15.1. Tampon d'acétate: ajouter 6,35 g d'acétate de sodium (2.7) et 20,0 ml d'acide acétique (2.8) à 1 litre d'eau et mélanger.
 - 2.15.2. Préparer la phase mobile en mélangeant 9 volumes de tampon acétate (2.15.1) à 1 volume d'acétonitrile (2.9).
 - 2.16. Solution mère de conservateurs
Peser avec précision environ 0,05 g d'acide 4-hydroxybenzoïque (2.3), 0,2 g d'acide salicylique (2.4), 0,2 g d'acide benzoïque (2.5) et 0,05 g d'acide sorbique (2.6) dans une fiole jaugée de 50 ml et compléter au trait avec le mélange eau/éthanol (2.13). Conserver la solution au réfrigérateur. Cette solution est stable pendant une semaine.
 - 2.17. Solutions standards de conservateurs
Transférer respectivement 8,00, 4,00, 2,00, 1,00 et 0,50 ml de la solution mère dans des fioles jaugées de 20 ml. Ajouter dans chaque fiole 10,00 ml de solution d'étalon interne (2.14), 0,5 ml d'acide sulfurique 2 M (2.10) et compléter au trait avec le mélange eau/éthanol (2.13). Ces solutions doivent être fraîchement préparées.
3. **Appareillage**
Équipement normal de laboratoire, plus:
 - 3.1. Bain-marie à 60 °C
 - 3.2. Chromatographe en phase liquide à haute performance équipé d'un détecteur UV à longueur d'onde variable et d'une boucle d'injection de 10 μl
 - 3.3. Colonne:
acier inoxydable, longueur 12,5-25 cm, diamètre intérieur 4,6 mm, remplie avec du Nucleosil 5C18 ou équivalent
 - 3.4. Papier filtre, diamètre 90 mm, Schleicher et Schull, Weissband n° 5892 ou équivalent
 - 3.5. Tubes de verre de 50 ml avec bouchon à vis

3.6. Flacons échantillons en verre de 5 ml

3.7. Granulés régulateurs d'ébullition, carborundum, calibre 2-4 mm, ou équivalent.

4. Mode opératoire

4.1. Préparation de l'échantillon

4.1.1. Préparation de l'échantillon sans addition d'étalon interne

Peser 1 g d'échantillon dans un tube de verre de 50 ml à bouchon à vis (3.5). Ajouter à l'aide d'une pipette 1,0 ml d'acide sulfurique 2 M (2.10) puis 40,0 ml de mélange eau/éthanol (2.13). Ajouter environ 1 g de granulés régulateurs d'ébullition (3.7), fermer le tube et agiter vigoureusement jusqu'à obtention d'une suspension homogène, en aucun cas pendant moins d'une minute. Afin de faciliter l'extraction des conservateurs dans la phase éthanol, placer le tube dans un bain-marie à 60 °C (3.1) pendant exactement 5 minutes.

Refroidir le tube immédiatement dans un courant d'eau froide puis conserver l'extrait à 5 °C pendant une heure.

Filtrer l'extrait sur papier filtre (3.4). Transférer environ 2 ml de l'extrait dans un flacon échantillon (3.6). Conserver l'extrait à 5 °C et procéder au dosage par chromatographie en phase liquide à haute performance dans les 24 h suivant la préparation de l'extrait.

4.1.2. Préparation de l'échantillon avec addition d'un étalon interne

Peser à trois décimales près 1 g \pm 0,1 g (a gramme) d'échantillon dans un tube de verre de 50 ml à bouchon à vis (3.5). À l'aide d'une pipette, ajouter 1,0 ml d'acide sulfurique 2 M (2.10), puis 30,0 ml de mélange eau/éthanol (2.13). Ajouter environ 1 g de granulés régulateurs d'ébullition (3.7) et 10,00 ml de solution d'étalon interne (2.14). Fermer le tube et agiter vigoureusement jusqu'à obtention d'une suspension homogène, en aucun cas pendant moins d'une minute.

Afin de faciliter l'extraction des conservateurs dans la phase éthanol, laisser le tube pendant exactement 5 minutes dans un bain-marie à 60 °C (3.1).

Refroidir immédiatement le tube dans un courant d'eau froide et conserver à 5 °C pendant une heure.

Filtrer l'extrait sur papier filtre (3.4). Transférer 1 ou 2 ml de l'extrait filtré dans un flacon échantillon (3.6). Conserver le filtrat à 5 °C et procéder au dosage par chromatographie en phase liquide à haute performance dans les 24 h suivant la préparation.

4.2. Chromatographie en phase liquide à haute performance

Phase mobile: tampon acétate/acétonitrile (2.15)

Régler le débit de la phase mobile dans la colonne à 2,0 ml/minute \pm 0,5 ml/minute. Régler la longueur d'onde du détecteur à 240 nm.

4.2.1. Étalonnage

Injecter 10 μ l de chacune des solutions standards de conservateur (2.17) dans le chromatographe en phase liquide (3.2). Établir les rapports entre les hauteurs de pic des conservateurs à doser et la hauteur du pic de l'étalon interne à partir des chromatogrammes obtenus. Pour chaque conservateur, tracer une courbe reliant ce rapport à la concentration de chaque solution standard.

Vérifier qu'une réponse linéaire est obtenue.

4.2.2. Dosage

Injecter 10 μ l d'extrait échantillon (4.1.1) dans le chromatographe en phase liquide (3.2) et enregistrer un chromatogramme. Injecter 10 μ l de solution standard de chacun des conservateurs (2.17) et enregistrer un chromatogramme. Comparer les chromatogrammes obtenus. Si le chromatogramme de l'extrait échantillon (4.1.1) ne présente aucun pic ayant approximativement le même temps de rétention que l'acide 2-méthoxybenzoïque (étalon interne recommandé), injecter 10 μ l d'extrait échantillon avec étalon interne (4.1.2) et enregistrer un chromatogramme.

Si l'on observe sur le chromatogramme de l'extrait échantillon (4.1.1) un pic interférant ayant le même temps de rétention que l'acide 2-méthoxybenzoïque, il y a lieu de sélectionner un autre étalon interne approprié. Si l'un des conservateurs faisant l'objet de l'investigation ne figure pas sur le chromatogramme, il peut être pris comme étalon interne.

Vérifier que les chromatogrammes obtenus avec une solution étalon et avec la solution échantillon satisfont aux exigences suivantes:

— le pic de séparation de la paire la plus mal séparée doit être d'au moins 0,90 (pour la définition d'un pic de séparation, voir la figure 1).

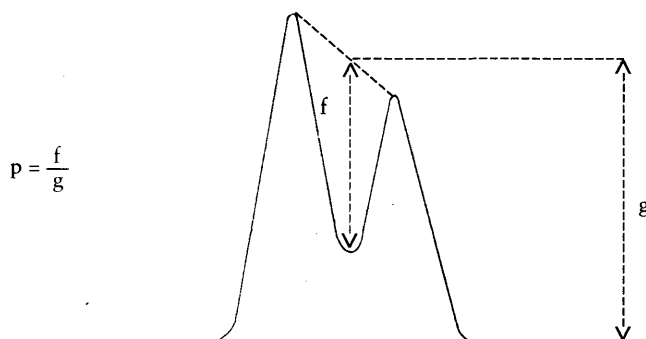


Figure 1: pic de séparation p

Si la séparation requise n'est pas obtenue, il y a lieu soit d'utiliser une colonne plus performante, soit d'ajuster la composition de la phase mobile jusqu'à satisfaction des exigences,

- le facteur d'asymétrie A_s de tous les pics obtenus doit être compris entre 0,9 et 1,5 (pour une définition du facteur d'asymétrie d'un pic, voir la figure 2). Pour l'enregistrement du chromatogramme aux fins du dosage du facteur d'asymétrie, une vitesse de déroulement du papier d'au moins 2 cm/minute est recommandée,

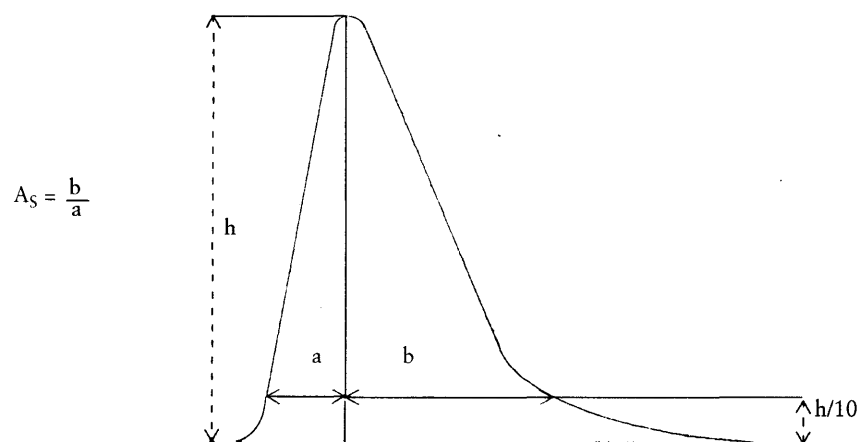


Figure 2: facteur d'asymétrie d'un pic

- une ligne de base régulière doit être obtenue.

5. Calcul

À l'aide des rapports entre les hauteurs des pics des conservateurs à doser et la hauteur du pic de l'acide 2-méthoxybenzoïque (étalon interne) ainsi que de la courbe d'étalonnage, calculer la concentration en conservateurs acides de la solution échantillon. Calculer la teneur de l'échantillon en acide benzoïque, en acide 4-hydroxybenzoïque, en acide sorbique ou en acide salicylique, en pourcentage de masse (x_i), à l'aide de la formule:

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

où:

a = masse (en g) de la prise d'essai (4.1.2),

b = concentration ($\mu\text{g/ml}$) de conservateur dans l'extrait échantillon final, obtenue à l'aide de la courbe d'étalonnage.

6. Répétabilité ⁽¹⁾

Pour une teneur en acide 4-hydroxybenzoïque de 0,40 %, la différence entre les résultats des deux dosages effectués en parallèle sur le même échantillon ne devrait pas excéder une valeur absolue de 0,035 %.

Pour une teneur en acide benzoïque de 0,50 %, la différence entre les résultats des deux dosages effectués en parallèle sur le même échantillon ne devrait pas excéder une valeur absolue de 0,050 %.

Pour une teneur en acide salicylique de 0,50 %, la différence entre les résultats des deux dosages effectués en parallèle sur le même échantillon ne devrait pas excéder une valeur absolue de 0,045 %.

Pour une teneur en acide sorbique de 0,60 %, la différence entre les résultats des deux déterminations effectuées en parallèle sur le même échantillon ne devrait pas excéder une valeur absolue de 0,035 %.

7. Remarques

7.1. Les résultats d'un test de robustesse effectué sur cette méthode indiquent que la quantité d'acide sulfurique ajouté afin d'extraire les acides de l'échantillon est critique; il y a donc lieu de respecter les limites prescrites pour la quantité d'échantillon utilisée.

7.2. Si on le souhaite, il est possible d'utiliser une précolonne appropriée.

C. DOSAGE DE L'ACIDE PROPIONIQUE**1. Objet et champ d'application**

Cette méthode convient pour le dosage de l'acide propionique, à une concentration maximale de 2 % (m/m) dans tout produit cosmétique.

2. Définition

La concentration en acide propionique mesurée à l'aide de cette méthode est exprimée en pourcentage de masse (% m/m) du produit.

3. Principe

Après un traitement approprié du produit à analyser, le dosage est effectué par chromatographie en phase gazeuse avec de l'acide 2-méthylpropionique comme étalon interne.

4. Réactifs

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique; il convient d'utiliser de l'eau distillée ou de l'eau d'une qualité équivalente.

4.1. Éthanol 96 % (v/v)

4.2. Acide propionique

4.3. Acide 2-méthylpropionique

4.4. Acide orthophosphorique

4.5. Solution d'acide propionique

Peser approximativement 1,00 g (p gramme) d'acide propionique et compléter à 50,00 ml avec de l'éthanol (4.1).

4.6. Solution d'étalon interne

Peser approximativement 1,00 g (e gramme) d'acide 2-méthylpropionique et compléter à 50,00 ml avec de l'éthanol (4.1).

⁽¹⁾ ISO 5725.

5. Appareillage

- 5.1. Équipement normal de laboratoire, et:
- 5.2. Chromatographe en phase gazeuse avec détecteur à ionisation de flamme
- 5.4. Tube de verre (20 × 150 mm) avec bouchon à vis
- 5.3. Bain-marie à 60 °C
- 5.5. Seringue en verre de 10 ml avec membrane filtrante (pore diamètre 0,45 µm)

6. Mode opératoire

6.1. Préparation de l'échantillon

6.1.1. Préparation de l'échantillon sans étalon interne

Dans le tube à bouchon vissé (5.3), peser approximativement 1 g d'échantillon. Ajouter 0,5 ml d'acide phosphorique (4.4) et 9,5 ml d'éthanol (4.1).

Fermer le tube et agiter fortement. Si nécessaire, placer le tube dans un bain-marie chauffé à 60 °C (5.4) pendant 5 minutes, afin de dissoudre complètement la phase lipidique. Faire refroidir rapidement sous l'eau courante. Filtrer une partie de la solution sur une membrane filtrante (5.5). Chromatographier le filtrat le jour même.

6.1.2. Préparation de l'échantillon avec étalon interne

Peser à trois décimales près 1 g ± 0,1 g (a gramme) d'échantillon dans un tube de verre (5.3). Ajouter 0,5 ml d'acide phosphorique (4.4), 0,50 ml de solution étalon interne (4.6) et 9 ml d'éthanol (4.1).

Fermer le tube et agiter vigoureusement. Si nécessaire, placer le tube dans un bain-marie chauffé à 60 °C (5.4) pendant 5 minutes, afin de dissoudre complètement la phase grasse. Faire refroidir rapidement sous l'eau courante. Filtrer une partie de la solution sur une membrane (5.5). Chromatographier le filtrat le jour même.

6.2. Conditions de la chromatographie en phase gazeuse.

Il est recommandé d'adopter les conditions opératoires suivantes:

Colonne

type	acier inoxydable
longueur	2 m
diamètre	1/8 "
remplissage	SP 1000 10% ou équivalent (1% H ₃ PO ₄ sur Chromosorb WAW 100-200 mesh)

Température

injecteur	200 °C
colonne	120 °C
détecteur	200 °C

Gaz vecteur

azote
débit: 25 ml/min.

6.3. Chromatographie

6.3.1. Étalonnage

Dans un série de fioles jaugées de 20 ml, transférer à l'aide d'une pipette 0,25, 0,50, 1,00, 2,00 et 4,00 ml de solution d'acide propionique (4.4); toujours à l'aide d'une pipette, transférer dans chaque fiole 1,00 ml de solution d'étalon interne (4.6); compléter au trait avec de l'éthanol (4.1) et mélanger. Les solutions ainsi préparées contiennent e mg/ml d'acide 2-méthylpropionique comme étalon interne (c'est-à-dire 1 mg/ml si e = 1,000) et p/4, p/2, P, 2p et 4p mg/ml d'acide propionique (c'est-à-dire: 0,25, 0,50, 1,00, 2,00 et 4,00 mg/ml si p = 1,000).

Injecter 1 μ l de chacune de ces solutions dans le chromatographe et tracer la courbe d'étalonnage en portant sur l'axe des x le rapport entre les masses d'acide propionique et d'acide 2-méthylpropionique, et sur l'axe des y le rapport des aires correspondantes.

Faire trois injections et calculer la moyenne du rapport des aires de pic.

6.3.2. Dosage

Injecter 1 μ l du filtrat d'échantillon 6.1.1. Comparer le chromatogramme obtenu avec celui de l'étalon interne (6.3.1). Si un pic a approximativement le même temps de rétention que l'acide 2-méthylpropionique ($R \leq 1,5$), changer l'étalon interne. Si aucune interférence n'apparaît, injecter 1 μ l de solution 6.1.2, et mesurer les surfaces des pics d'acide propionique et des pics d'étalon interne.

Faire trois injections de chaque solution et calculer la moyenne obtenue. Calculer le rapport des surfaces.

7. Calculs

7.1. À partir de la courbe d'étalonnage tracée au point 6.3.1, noter le rapport de masses K correspondant au rapport des surfaces de pics calculé au point 6.3.2.

7.2. À partir du rapport des masses ainsi obtenu, calculer le taux d'acide propionique, en pourcentage de masse, à l'aide de la formule:

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

où:

K = rapport calculé au point 7.1,

e = masse en grammes d'étalon interne, pesé au point 4.6,

a = masse en grammes l'échantillon, pesé au point 6.1.2.

Arrondir les résultats à une décimale.

8. Répétabilité ⁽¹⁾

Pour un taux d'acide propionique de 2 % (m/m), la différence entre les résultats des deux dosages effectués en parallèle sur le même échantillon ne doit pas dépasser 0,12 %.

II. IDENTIFICATION DE L'HYDROQUINONE, DU MONOMÉTHYLÉTHÉRE D'HYDROQUINONE, DU MONOÉTHYLÉTHÉRE D'HYDROQUINONE ET DU MONOBENZYLÉTHÉRE D'HYDROQUINONE DANS LES PRODUITS COSMÉTIQUES

A. IDENTIFICATION

1. Objet et champ d'application

Cette méthode concerne la détection et l'identification de l'hydroquinone, du monométhyléther d'hydroquinone, du monoéthyléther d'hydroquinone et du monobenzyléther d'hydroquinone dans les produits cosmétiques destinés à éclaircir la peau.

2. Principe

L'hydroquinone et ses éthers sont identifiés par chromatographie sur couche mince (CCM).

3. Réactifs

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique.

⁽¹⁾ ISO 5725.

- 3.1. Éthanol à 96 % (v,v)
- 3.2. Chloroforme
- 3.3. Diéthyle oxyde
- 3.4. Solvant d'élu­tion:
chloroforme/diéthyle oxyde 66/33 (v/v)
- 3.5. Ammoniaque à 25 % (m/m) ($d_4^{20} = 0,91$ g/ml)
- 3.6. Acide ascorbique
- 3.7. Hydroquinone
- 3.8. Méthyléther d'hydroquinone
- 3.9. Éthyléther d'hydroquinone
- 3.10. Benzyléther d'hydroquinone (monobenzone)
- 3.11. Solutions de référence

Les solutions suivantes doivent être fraîchement préparées et sont stables pendant une journée.
- 3.11.1. Peser 0,05 g d'hydroquinone (3.7) dans un tube à essai gradué de 10 ml. Ajouter 0,250 g d'acide ascorbique (3.6) et 5 ml d'éthanol à 96 % (3.1). Ajouter de l'ammoniaque (3.5) jusqu'à pH 10 et compléter au trait avec de l'éthanol (3.1).
- 3.11.2. Peser 0,05 g de monométhyléther d'hydroquinone (3.8) dans un tube à essai gradué de 10 ml. Ajouter 0,250 g d'acide ascorbique (3.6) et 5 ml d'éthanol (3.1). Ajouter de l'ammoniaque (3.5) jusqu'à pH 10 et compléter au trait avec de l'éthanol (3.1).
- 3.11.3. Peser 0,05 g de monoéthyléther d'hydroquinone (3.9) dans un tube à essai gradué de 10 ml. Ajouter 0,250 g d'acide ascorbique (3.6) et 5 ml d'éthanol (3.1). Ajouter de l'ammoniaque (3.5) jusqu'à pH 10 et compléter au trait avec de l'éthanol (3.1).
- 3.11.4. Peser 0,05 g de benzyléther d'hydroquinone (3.10) dans un tube à essai gradué de 10 ml. Ajouter 0,250 g d'acide ascorbique (3.6) et 5 ml d'éthanol (3.1). Ajouter de l'ammoniaque (3.5) jusqu'à pH 10 et compléter au trait avec de l'éthanol (3.1).
- 3.12. Nitrate d'argent
- 3.13. Acide 12-phosphomolybdique
- 3.14. Ferrocyanure de potassium 6 H₂O
- 3.15. Chlorure ferrique 6 H₂O
- 3.16. Réactifs révélateurs
- 3.16.1. Dans une solution aqueuse de nitrate d'argent (3.12) à 5 % (m/v), ajouter de l'ammoniaque (3.5) jusqu'à dissolution du précipité obtenu.

Avertissement: la solution devient instable (avec risque d'explosion) si on la laisse reposer; il convient donc de la jeter après usage.
- 3.16.2. Solution à 10 % (m/v) d'acide phosphomolybdique 12 (3.13) dans de l'éthanol (3.1).

- 3.16.3. Préparer une solution aqueuse à 1 % (m/v) de ferrocyanure de potassium (3.14) et une solution aqueuse à 2 % (m/v) de chlorure ferrique (3.15). Mélanger à parties égales les deux solutions juste avant utilisation.

4. Appareillage

Matériel ordinaire de laboratoire, et:

- 4.1. Matériel ordinaire de CCM
- 4.2. Plaques de CCM prêtes à l'emploi: silicagel GHR/UV₂₅₄
20 × 20 cm (Machery Nagel ou équivalent), épaisseur de la couche 0,25 mm
- 4.3. Bain à ultra-sons
- 4.4. Centrifugeuse
- 4.5. Lampe UV 254 nm

5. Mode opératoire

5.1. Préparation de l'échantillon

Peser 3,0 g d'échantillon dans un tube gradué de 10 ml. Ajouter 0,250 g d'acide ascorbique (3.6) et 5 ml d'éthanol (3.1). Amener la solution à pH 10 à l'aide d'ammoniaque (3.5). Compléter au trait avec de l'éthanol (3.1). Fermer le tube avec un bouchon et homogénéiser dans un bain à ultra-sons pendant 10 minutes. Passer sur un filtre papier ou centrifuger à 3000 t/min.

5.2. CCM

- 5.2.1. Saturer une cuve de chromatographie avec le solvant d'élution (3.4).
- 5.2.2. Déposer sur une plaque 2 μ l des solutions de référence (3.11) et 2 μ l de la solution échantillon (5.1). Éluer à température ambiante dans l'obscurité jusqu'à ce que le front de solvant ait migré de 15 cm.
- 5.2.3. Retirer la plaque et laisser sécher à température ambiante.

5.3. Détection

- 5.3.1. Observer la plaque sous UV à 254 nm et repérer la position des taches.
- 5.3.2. Vaporiser sur la plaque:
- le réactif au nitrate d'argent (3.16.1)
 - ou
 - le réactif à l'acide phosphomolybdique (3.16.2) et chauffer à 120 °C environ
 - ou
 - la solution de ferrocyanure de potassium et de chlorure ferrique (3.16.3).

6. Identification

Calculer la valeur de R_f pour chaque tache.

Comparer les taches obtenues pour la solution échantillon avec celles des solutions de référence au point de vue de leurs valeurs R_f, leur couleurs sous rayonnement UV, leur couleur après vaporisation du réactif.

Réaliser la CLHP décrite dans la partie B et comparer les temps de rétention obtenus pour le ou les pics de l'échantillon et pour ceux des solutions de référence.

Tenir compte des résultats de la CCM et de la CLHP pour identifier la présence d'hydroquinone et/ou de ses éthers.

7. Remarques

Dans les conditions décrites, les R_f suivants ont été relevés:

— hydroquinone:	0,32,
— méthyléther d'hydroquinone:	0,53,
— éthyléther d'hydroquinone:	0,55,
— benzyléther d'hydroquinone:	0,58.

B. DOSAGE

1. Objet et champ d'application

Cette méthode décrit le dosage de l'hydroquinone, du monométhyléther d'hydroquinone, du monoéthyléther d'hydroquinone et du monobenzyléther d'hydroquinone dans les produits cosmétiques d'éclaircissement de la peau.

2. Principe

L'échantillon est extrait par un mélange eau/éthanol à température douce afin de fondre toute matière lipidique. Le mélange obtenu est filtré. Le dosage des composés présents dans la solution est réalisé par chromatographie liquide en phase inverse combinée à une détection UV.

3. Réactifs

3.1. Tous les réactifs doivent être de qualité analytique. L'eau utilisée doit être distillée ou d'une pureté au moins équivalente.

3.2. Méthanol

3.3. Hydroquinone

3.4. Monométhyléther d'hydroquinone

3.5. Monoéthyléther d'hydroquinone

3.6. Monobenzyléther d'hydroquinone (monobenzone)

3.7. Tétrahydrofurane pour CLHP

3.8. Mélange eau/méthanol 1/1 (v/v)

Mélanger 1 volume d'eau et 1 volume de méthanol (3.2).

3.9. Phase mobile: mélange tétrahydrofurane/eau 45 : 55 (v/v)

Mélanger 45 volumes de tétrahydrofurane (3.7) et 55 volumes d'eau.

3.10. Solution étalon

Peser 0,06 g d'hydroquinone (3.3) 0,08 g de monométhyléther d'hydroquinone (3.4), 0,10 g de monoéthyléther d'hydroquinone (3.5) et 0,12 g de monobenzyléther d'hydroquinone (3.6) dans une fiole jaugée de 50 ml. Dissoudre et compléter au trait avec du méthanol (3.2). Préparer la solution étalon en diluant 10,00 ml de cette solution dans 50,00 ml de mélange eau/méthanol (3.8). Ces solutions doivent être fraîchement préparées.

4. Appareillage

Matériel ordinaire de laboratoire, et:

4.1. Bain-marie à 60 °C

4.2. Chromatographe liquide à haute performance équipé d'un détecteur UV à longueur d'onde variable et d'une boucle d'injection de 10 µl.

4.3. Colonne

Colonne chromatographique en acier inoxydable d'une longueur de 250 mm, d'un diamètre intérieur de 4,6 mm, remplie de phényle Zorbax (phénylsilane lié chimiquement au Zorbax

SIL, «end-capped» par du triméthylchlorosilane), de granulométrie 6 μm , ou équivalent. Ne pas utiliser de précolonne, sauf de type phényle ou équivalent.

4.4. Papier filtre de diamètre 90 mm, Schleicher et Hull, Weissband n° 5982, ou équivalent.

5. Mode opératoire

5.1. Préparation de l'échantillon

Peser avec une précision de trois décimales 1 g \pm 0,1 g (a gramme) d'échantillon dans une fiole jaugée de 50 ml. Disperser l'échantillon dans 25 ml de mélange eau/méthanol (3.8). Fermer la fiole jaugée et agiter vigoureusement jusqu'à obtention d'une suspension homogène. Agiter pendant au moins une minute. Placer la fiole jaugée dans un bain-marie (4.1) maintenu exactement à 60 °C afin d'améliorer l'extraction. Refroidir la fiole et compléter au trait avec le mélange eau/méthanol (3.8). Passer l'extrait sur filtre papier (4.4). Procéder au dosage par CLHP dans les 24 h suivant la préparation de l'extrait.

5.2. Chromatographie liquide haute performance

5.2.1. Régler le débit de la phase mobile (3.9) à 1,0 ml/min et le détecteur à 295 nm.

5.2.2. Injecter 10 μl de la solution échantillon obtenue selon la procédure décrite au point 5.1 et enregistrer le chromatogramme. Mesurer les aires des pics. Réaliser un étalonnage selon la méthode décrite au point 5.2.3. Comparer les chromatogrammes obtenus avec l'échantillon et avec les solutions étalons. À l'aide des aires des pics et des valeurs des facteurs de réponse (RF) calculées au point 5.2.3, calculer la concentration des composés à analyser dans la solution échantillon.

5.2.3. Étalonnage

Injecter 10 μl de la solution étalon (3.10) et enregistrer le chromatogramme. Faire plusieurs injections jusqu'à obtention d'une aire de pic constante.

Déterminer le facteur de réponse RF_1 :

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

où:

p_i = aire du pic pour l'hydroquinone, le monométhyléther d'hydroquinone, le monoéthyléther d'hydroquinone, le monobenzyléther d'hydroquinone,

c_i = concentration (g/50 ml), dans la solution étalon (3.10), d'hydroquinone, de monométhyléther d'hydroquinone, de monoéthyléther d'hydroquinone, de monobenzyléther d'hydroquinone.

Vérifier que les chromatogrammes obtenus pour la solution étalon et la solution échantillon obéissent aux conditions suivantes.

— Le pic de séparation de la paire la plus mal séparée doit être d'au moins 0,90. Pour une définition de la séparation des pics, voir figure 1.

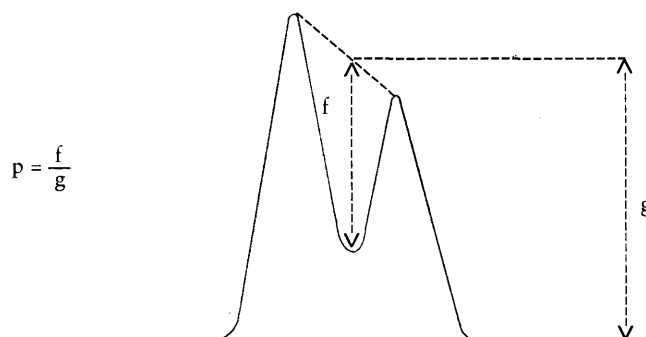


Figure 1: pic de séparation p

Si la séparation requise n'est pas obtenue, il convient soit d'utiliser une colonne plus performante, soit d'ajuster la composition de la phase mobile jusqu'à obtention de résultats satisfaisants.

- Le facteur d'asymétrie A_s de tous les pics obtenus doit être compris entre 0,9 et 1,5 (pour une définition du facteur d'asymétrie, voir figure 2). Pour l'enregistrement du chromatogramme en vue de la détermination du facteur d'asymétrie, une vitesse de 2 cm/min est recommandée.

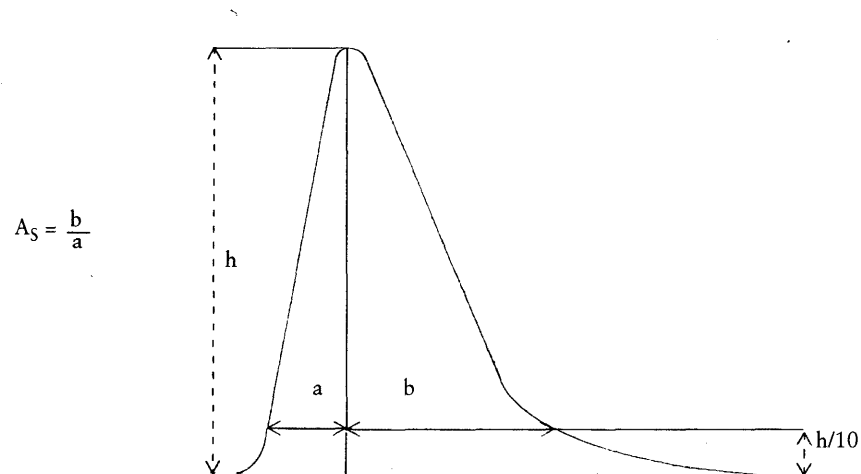


Figure 2: facteur A_s d'asymétrie du pic

- Une ligne de base régulière doit être obtenue.

6. Calcul

Utiliser l'aire des pics des composés à analyser pour calculer leur concentration (X_i) des composés à analyser dans l'échantillon, en pourcentage de masse à l'aide de la formule:

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

où:

a = masse de l'échantillon en grammes,

b_i = aire du pic du composé à analyser dans l'échantillon.

$RF_i a$ = facteur du réponse (5.2.3)

7. Répétabilité ⁽¹⁾

- 7.1. Pour une teneur de 2,0 % en hydroquinone, l'écart entre les résultats de deux dosages effectués en parallèle sur le même échantillon ne doit pas dépasser une valeur absolue de 0,13 %.
- 7.2. Pour une teneur de monométhyléther de 1,0 %, l'écart entre les résultats de deux dosages effectués en parallèle sur le même échantillon ne doit pas dépasser une valeur absolue de 0,1 %.
- 7.3. Pour une teneur de monoéthyléther de 1,0 %, l'écart entre les résultats de deux dosages effectués en parallèle sur le même échantillon ne doit pas dépasser une valeur absolue de 0,11 %.
- 7.4. Pour une teneur de monobenzyléther de 1,0 %, l'écart entre les résultats de deux dosages effectués en parallèle sur le même échantillon ne doit pas dépasser une valeur absolue de 0,11 %.

8. Reproductibilité ⁽¹⁾

- 8.1. Pour une teneur en hydroquinone de 2,0 %, l'écart entre les résultats de deux dosages effectués en parallèle sur le même échantillon dans des conditions différentes (laboratoire, opérateur ou appareillage différent, et/ou moment différent) ne doit pas dépasser une valeur absolue de 0,37 %.

⁽¹⁾ ISO 5725.

- 8.2. Pour une teneur de 1,0% en monométhyléther, l'écart entre les résultats de deux dosages effectués en parallèle sur le même échantillon dans des conditions différentes (laboratoire, opérateur ou appareillage différent, et/ou moment différent) ne doit pas dépasser une valeur absolue de 0,21%.
- 8.3. Pour une teneur de 1,0% en monoéthyléther, l'écart entre les résultats de deux dosages effectués en parallèle sur le même échantillon dans des conditions différentes (laboratoire, opérateur ou appareillage différent, et/ou moment différent) ne doit pas dépasser une valeur absolue de 0,19%.
- 8.4. Pour une teneur de 1,0% en monobenzyléther, l'écart entre les résultats de deux dosages effectués en parallèle sur le même échantillon dans des conditions différentes (laboratoire, opérateur ou appareillage différent, et/ou moment différent) ne doit pas dépasser une valeur absolue de 0,11%.

9. Remarques

- 9.1. Lorsque la teneur en hydroquinone obtenue dépasse largement 2% et qu'une estimation précise de la teneur est requise, il convient de diluer l'échantillon (5.1) à une concentration similaire à celle qui serait obtenue avec un échantillon contenant 2% d'hydroquinone, et de répéter le dosage (sur certains appareils, l'absorbance peut se situer en dehors de la gamme linéaire du détecteur pour des concentrations élevées d'hydroquinone).

9.2. Interférences

La méthode décrite permet le dosage de l'hydroquinone et de ses éthers en une seule opération en mode isocratique. L'utilisation d'une colonne de phényle assure une rétention suffisante de l'hydroquinone, qui ne peut par contre être garantie dans le cas d'une colonne C 18, avec la phase mobile indiquée.

Toutefois, cette méthode est sensible à des interférences dues aux parabens. En pareil cas, le dosage doit être répété avec un système de phases mobile et stationnaire différent. Des méthodes adéquates figurent dans les références ⁽¹⁾ et ⁽²⁾, à savoir:

colonne: Zorbax ODS, 4,6 mm × 25 cm, ou équivalent,

— température: 36 °C,

— débit: 1,5 ml/min,

— phase mobile:

— pour l'hydroquinone: méthanol/eau 5/95 (v/v),

— pour le méthyléther d'hydroquinone: méthanol/eau 30/70 (v/v),

— pour le benzyléther d'hydroquinone: méthanol/eau 80/20 (v/v) ⁽¹⁾;

colonne: Spherisorb S5-ODS ou équivalent,

— phase mobile: eau/méthanol (90/10 v/v),

— débit: 1,5 ml/min.

Ces conditions conviennent pour l'hydroquinone ⁽²⁾.

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

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