

SJETTE KOMMISJONSDIREKTIV 95/32/EF

av 7. juli 1995

om nødvendige analysemetoder for kontroll av kosmetiske produkters sammensetning(*)**KOMMISJONEN FOR DE EUROPEISKE FELLESKAP HAR -**

under henvisning til traktaten om opprettelse av Det europeiske fellesskap,

under henvisning til rådsdirektiv 78/768/EØF av 27. juli 1976 om tilnærming av medlemsstatenes lovgivning om kosmetiske produkter⁽¹⁾, sist endret ved kommisjonsdirektiv 94/32/EF⁽²⁾, særlig artikkel 8 nr. 1, og

ut fra følgende betraktninger:

Direktiv 76/768/EØF fastsetter offisiell kontroll av kosmetiske produkter for å sikre at de vilkår som er fastsatt i henhold til Fellesskapets bestemmelser om kosmetiske produkters sammensetning, blir overholdt.

Alle nødvendige analysemetoder må fastsettes snarest mulig. Visse metoder er allerede vedtatt ved kommisjonsdirektiv 80/1335/EØF⁽³⁾, endret ved direktiv 87/143/EØF⁽⁴⁾, 82/434/EØF⁽⁵⁾, endret ved direktiv 90/207/EØF⁽⁶⁾, 83/514/EØF⁽⁷⁾, 85/490/EØF⁽⁸⁾ og 93/73/EØF⁽⁹⁾.

Identifikasjon og bestemmelse av benzosyre, 4-hydroksybenzosyre, sorbinsyre, salisylsyre og propionsyre i kosmetiske produkter og identifikasjon og bestemmelse av hydrokinon, hydrokinonmonometyleter, hydrokinonmonoetyleter og hydrokinonmonobenzyleter i kosmetiske produkter utgjør sjette etappe.

Tiltakene fastsatt i dette direktiv er i samsvar med uttalelse fra Komiteen for tilpasning til den tekniske utvikling av direktiv 76/768/EØF -

VEDTATT DETTE DIREKTIV:

Utferdiget i Brussel, 7. juli 1995.

For Kommisjonen

Emma BONINO

Medlem av Kommisjonen

Artikkel 1

Medlemsstatene skal treffe de nødvendige tiltak for å sikre at

- identifikasjon og bestemmelse av benzosyre, 4-hydroksybenzosyre, sorbinsyre, salisylsyre og propionsyre,
- identifikasjon og bestemmelse av hydrokinon, hydrokinonmonometyleter, hydrokinonmonoetyleter og hydrokinonmonobenzyleter,

ved offisiell kontroll av kosmetiske produkter foretas i samsvar med de metoder som er beskrevet i vedlegget.

Artikkel 2

1. Medlemsstatene skal sette i kraft de lover og forskrifter som er nødvendige for å etterkomme dette direktiv, senest 30. september 1996. De skal umiddelbart underrette Kommisjonen om dette.

Disse bestemmelsene skal, når de vedtas av medlemsstatene, inneholde en henvisning til dette direktiv, eller det skal vises til direktivet når de kunngjøres. Nærmere regler for henvisningen fastsettes av medlemsstatene.

2. Medlemsstatene skal oversende Kommisjonen teksten til de internrettslige bestemmelser som de vedtar på det området dette direktiv omhandler.

Artikkel 3

Dette direktiv trer i kraft den 20. dag etter at det er kunngjort i *De Europeiske Fællesskaps Tidende*.

Artikkel 4

Dette direktiv er rettet til medlemsstatene.

(*) Denne EF-rettsakten, kunngjort i EFT nr. L 178 av 28.7.1995, s. 20, er omhandlet i EØS-komiteens beslutning nr. 18/96 av 26. mars 1996 om endring av EØS-avtalens vedlegg II (Tekniske forskrifter, standarder, prøving og sertifisering), se denne utgaven av EØS-tillegget til De Europeiske Fællesskaps Tidende.

(¹) EFT nr. L 262 av 27.9.1976, s. 169.

(²) EFT nr. L 181 av 15.7.1994, s. 31.

(³) EFT nr. L 383 av 31.12.1980, s. 27.

(⁴) EFT nr. L 57 av 27.2.1987, s. 56.

(⁵) EFT nr. L 185 av 30.6.1982, s. 1.

(⁶) EFT nr. L 108 av 28.4.1990, s. 92.

(⁷) EFT nr. L 291 av 24.10.1983, s. 9.

(⁸) EFT nr. L 295 av 7.11.1985, s. 30.

(⁹) EFT nr. L 231 av 14.9.1993, s. 34.

VEDLEGG

I. IDENTIFIKASJON OG BESTEMMELSE AV BENZOSYRE, 4-HYDROKSYBENZOSYRE, SORBINSYRE, SALISYLSYRE OG PROPIONSYRE I KOSMETISKE PRODUKTER

1. Formål og anvendelsesområde

Denne metode kan anvendes ved identifikasjon og bestemmelse av benzosyre, 4-hydroksybenzosyre, sorbinsyre, salisylysyre og propionsyre i kosmetiske produkter. Det beskrives ulike framgangsmåter for identifikasjon av disse konserveringsmidler, for bestemmelse av propionsyre og for bestemmelse av benzosyre, 4-hydroksybenzosyre, sorbinsyre og salisylysyre.

2. Definisjon

Innholdet av benzosyre, 4-hydroksybenzosyre, salisylysyre, sorbinsyre og propionsyre bestemt etter denne metode angis som masseprosent fri syre.

A. IDENTIFIKASJON

1. Prinsipp

Etter syre/baseekstraksjon av konserveringsmidlene analyseres ekstraktet ved tyntsjiktskromatografi med derivatisering på prøveglass. Avhengig av resultatene bekrefte identifikasjonen ved høytrykksvæskeskromatografi (HPLC) eller, dersom det gjelder propionsyre, ved gasskromatografi (GC).

2. Reagenser

2.1. Allment

Alle reagenser skal være av analysekvalitet. Vann skal være destillert eller av minst tilsvarende kvalitet.

2.2. Aceton

2.3. Dietyleter

2.4. Acetonitril

2.5. Toluen

2.6. N-heksan

2.7. Flytende parafin

2.8. Saltsyre, 4 M

- 2.9. Kaliumhydroksid, vandig, 4 M
- 2.10. Kalsiumklorid, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 2.11. Litiumkarbonat, Li_2CO_3
- 2.12. 2-brom-2'-acetonafon
- 2.13. 4-hydroksybenzosyre
- 2.14. Salisylsyre
- 2.15. Benzosyre
- 2.16. Sorbinsyre
- 2.17. Propionsyre
- 2.18. Referanseløsninger
- Tilbered en 0,1 % (m/v) løsning (100 mg/100 ml) av hvert av de fem konserveringsmidlene (2.13 til 2.17) i dietyleter.
- 2.19. Derivatiseringsreagens
- 0,5 % (m/v) løsning (50 mg/10 ml) av 2-brom-2'-acetonafon (2.12) i acetonitril (2.4). Løsningen må tilberedes ukentlig og oppbevares i kjøleskap.
- 2.20. Katalysatorløsning
- 0,3 % (m/v) løsning av litiumkarbonat (2.11) i vann (300 mg/100 ml). Løsningen må være nylig tilberedt.
- 2.21. Framkallingsvæske
- Toluen (2.5)/aceton (2.2) (20 : 0,5, v/v)
- 2.22. Flytende parafin (2.7)/n-heksan (2.6) (1 : 2, v/v)
3. **Apparatur**
- Vanlig laboratorieutstyr
- 3.1. Vannbad ved 60 °C
- 3.2. Utviklingskar
- 3.3. UV-lampe, 254 og 366 nm
- 3.4. Tyntsiktspalter, Kieselgel 60, uten fluorescensindikator, 20 x 20 cm, sjiktstykkelse 0,25 mm med konsentrasjonssone 2,5 x 20 cm (Merck 11845 eller tilsvarende)
- 3.5. Mikroinjeksjonssprøyte, 10 ml
- 3.6. Mikroinjeksjonssprøyte, 25 ml

- 3.7. Varmeovn med temperatur opp til 105 °C
- 3.8. 50 ml reagensglass med skrukork
- 3.9. Filterpapir med diameter 90 mm, Schleicher & Schull, Weissband nr. 5892, eller tilsvarende
- 3.10. Universal-indikatorpapir, pH 1-11
- 3.11. 5 ml prøveglass
- 3.12. Rotavapor (eller tilsvarende)
- 3.13. Varmeplate

4. **Framgangsmåte**

4.1. Tilberedning av prøven

Vei opp ca. 1 g av prøven i et 50 ml reagensglass med skrukork (3.8). Tilsett fire dråper saltsyre 4 M (2.8) og 40 ml aceton (2.2). Til sterkt basiske produkter som håndsepe bør det tilsettes 20 dråper saltsyre 4 M (2.8). Kontroller ved hjelp av indikatorpapir (3.10) at pH-verdien er ca. 2. Lukk glasset og ryst kraftig i ett minutt.

Dersom ekstraksjonen av konserveringsmidlene over på acetonfasen skal framskyndes, oppvarmes blandingen forsiktig til ca. 60 °C for å smelte fettfasen.

Avkjøl løsningen til romtemperatur og filtrer gjennom filterpapir (3.9) ned i en erlenmeyerkolbe.

Overfør 20 ml av filtratet til en 200 ml erlenmeyerkolbe, tilsett 20 ml vann og bland. Juster blandingens pH-verdi til ca. 10 med kaliumhydroksid 4 M (2.9). Bruk indikatorpapir (3.10) ved pH-målingen.

Tilsett 1 g kalsiumklorid (2.10) og ryst kraftig. Filtrer gjennom et filterpapir (3.9) over i en 250 ml skilletrakt som inneholder 75 ml dietyleter (2.3) og ryst kraftig i ett minutt. La fasene skilles og tapp den vandige fasen i en 250 ml erlenmeyerkolbe. Fjern eterfasen. Bruk indikatorpapir (3.10) til å justere den vandige løsningens pH til ca. 2 med saltsyre 4 M (2.8). Tilsett 10 ml dietyleter (2.3), sett kork i kolben og ryst kraftig i ett minutt. La fasene skilles og overfør eterfasen til en rotavapor (3.12). Fjern den vandige fasen.

Damp eterfasen nesten tørr og gjenopløs inndampningsresten i 1 ml dietyleter (2.3). Overfør løsningen til et prøveglass (3.11).

4.2. Tyntsjiktskromatografi

For hver referanse- og prøveløsning som skal kromatograferes, påfør ca. 3 ml litiumkarbonatløsning (2.20) med en sprøyte (3.5) i samme avstand på startlinjen i kromatografiplatens (3.4) konsentrasjonssone, og blås platen tørr med kald luft.

Anbring tyntsjiktskromatografiplaten på en varmeplate (3.13) oppvarmet til 40 °C, for å holde flekkene så små som mulig. Påfør med en mikroinjeksjonssprøyte (3.5) 10 ml av hver av referanseløsningene (2.18) og prøveløsningen (4.1) på platens startlinje, nøyaktig på de steder der litiumkarbonatløsningen er påført.

Påfør til slutt ca. 15 ml derivatiseringsreagens (2.19) (2-brom-2'-acetonafonløsning); også nå nøyaktig på de steder der referanse/prøveløsningene og litiumkarbonatløsningen er påført.

Varm opp tyntsjiktskromatografiplaten i en ovn (3.7) ved 80 °C i 45 minutter.

Avkjøl platen og framkall den i et kar (3.2) som på forhånd er ekvilibrert i 15 minutter (uten føring med filterpapir), med framkallingsvæske 2.21 (toluen/acetone), til væskefronten har vandret 15 cm (det tar ca. 80 minutter).

Blås platen tørr med kald luft og undersøk flekkene under UV-lys (3.3). For å forsterke fluorescensen av svake flekker kan tyntsjiktskromatografiplaten dyppes i flytende parafin/n-heksan (2.22).

5. Identifikasjon

Beregn R_f -verdien for hver flekk.

Sammenlign prøvens og referanseløsningenes R_f -verdi og utseende under UV-stråling.

Trekk en foreløpig konklusjon med hensyn til hvilke konserveringsmidler som finnes. Utfør høytrykksvæskeskromatografi som beskrevet i avsnitt B eller, dersom det er påvist tilstedeværelse av propionsyre, gasskromatografi som beskrevet i avsnitt C. Sammenlign retensjonstidene for prøven med retensjonstidene for referanseløsningene.

Kombiner resultatene fra tyntsjiktskromatografi og høytrykksvæskeskromatografi eller gasskromatografi for å identifisere konserveringsmidlene i prøven.

B. BESTEMMELSE AV BENZOSYRE, 4-HYDROKSYBENZOSYRE, SORBINSYRE OG SALISYLSYRE

1. Prinsipp

Etter syring ekstraheres prøven med en blanding av etanol og vann. Etter filtrering bestemmes innholdet av konserveringsmidler ved høytrykksvæskeskromatografi.

2. Reagenser

- 2.1. Alle reagenser skal være analyserene og om nødvendig egnet for høytrykksvæskeskromatografi. Vann som brukes, må være destillert eller ha minst tilsvarende renhet.
- 2.2. Absolutt etanol.
- 2.3. 4-hydroksybenzosyre
- 2.4. Salisylysyre
- 2.5. Benzosyre
- 2.6. Sorbinsyre
- 2.7. Natriumacetat ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)
- 2.8. Eddiksyre (a) $20 = 1,05 \text{ g/ml}$
4
- 2.9. Acetonitril

- 2.10. Svovelsyre, 2 M
- 2.11. Kaliumhydroksid, vandig, 0,2 M
- 2.12. 2-metoksybenzosyre
- 2.13. Etanol/vannblanding:
Bland ni volumdeler etanol (2.2) med en volumdel vann (2.1)
- 2.14. Intern standardløsning
Oppløs ca. 1 g 2-metoksybenzosyre (2.12) i 500 ml etanol/vannblanding (2.13)
- 2.15. Mobil fase til tyntsjiktskromatografi:
 - 2.15.1. Acetatbuffer: Tilsett 6,35 g natriumacetat (2.7) og 20 ml eddiksyre (2.8) til 1 l vann og bland
 - 2.15.2. Tilbered den mobile fasen ved å blande ni volumdeler acetatbuffer (2.15.1) med en volumdel acetonitril (2.9)
- 2.16. Stamlløsning av konserveringsmidler
Vei opp ca. 0,05 g 4-hydroksybenzosyre (2.3), 0,2 g salisylsyre (2.4), 0,2 g benzosyre (2.5) og 0,05 g sorbinsyre (2.6) nøyaktig i en 50 ml målekolbe og fyll opp til merket med etanol/vannblandingen (2.13). Oppbevar løsningen i kjøleskap. Den er holdbar i en uke.
- 2.17. Standardløsning av konserveringsmidler
Overfør henholdsvis 8,00, 4,00, 2,00, 1,00 og 0,50 ml av stamlløsningen (2.16) til 20 ml målekolber. Tilsett 10,00 ml intern standardløsning (2.14) og 0,5 ml svovelsyre 2 M (2.10) til hver kolbe. Fyll opp til merket med etanol/vannblandingen (2.13). Løsningene må være nylig tilberedte.
3. **Apparatur**
Vanlig laboratorieutstyr ikke spesifisert andre steder, og:
 - 3.1. Vannbad ved 60 °C
 - 3.2. Høytrykksvæskekromatograf med en 10 ml injeksjonssløyfe og en UV-detektor med variabel bølgelengde
 - 3.3. Analysekolonne
Rustfritt stål, lengde 12,5-25 cm, innvendig diameter 4,6 mm, pakket med Nucleosil 5C18 eller tilsvarende
 - 3.4. Filterpapir, diameter 90 mm, Schleicher og Schull, Weissband nr. 5892 eller tilsvarende
 - 3.5. 50 ml reagensglass med skrulokk
 - 3.6. 5 ml prøveglass
 - 3.7. Kokstein, karborundum, størrelse 2-4 mm, eller tilsvarende

4. Framgangsmåte

4.1. Tilberedning av prøven

4.1.1. Tilberedning av prøven uten tilsetning av intern standard

Vei opp 1 g av prøven i et 50 ml reagensglass med skrulokk (3.5). Pipetter 1,00 ml svovelsyre 2 M (2.10) og 40,0 ml etanol/vannblanding (2.13) i glasset. Tilsett ca. 1 g kokstein (3.7), lukk glasset og ryst kraftig i minst ett minutt til det er dannet en homogen suspensjon. La glasset stå i vannbad (3.1) ved 60 °C i nøyaktig fem minutter for å lette ekstraksjonen av konserveringsmidlene over på etanolfasen.

Avkjøl glasset straks under rennende vann og oppbevar ekstraktet i én time ved 5 °C.

Filtrer ekstraktet gjennom et filterpapir (3.4). Overfør ca. 2 ml av ekstraktet til et prøveglass (3.6). Oppbevar ekstraktet ved 5 °C og utfør høytrykksvæskekromatografien innen 24 timer etter ekstraksjon.

4.1.2. Tilberedning av prøven med tilsetning av intern standard

Vei opp til tredje desimal $1,0 \pm 0,1$ g (a gram) av prøven i et 50 ml reagensglass med skrulokk (3.5). Tilsett 1,00 ml svovelsyre 2 M (2.10) med pipette og tilsett deretter 30,0 ml etanol/vannblanding (2.13). Tilsett ca. 1 g kokstein (3.7) og 10,0 ml intern standardløsning (2.14). Lukk glasset og ryst kraftig i minst ett minutt til det er dannet en homogen suspensjon. La glasset stå i vannbad (3.1) ved 60 °C i nøyaktig fem minutter for å lette ekstraksjonen av konserveringsmidlene over på etanolfasen.

Avkjøl glasset straks under rennende vann og oppbevar ekstraktet i én time ved 5 °C.

Filtrer ekstraktet gjennom et filterpapir (3.4). Overfør ca. 2 ml av filtratet til et prøveglass (3.6). Oppbevar filtratet ved 5 °C og utfør høytrykksvæskekromatografien innen 24 timer etter ekstraksjon.

4.2. Høytrykksvæskekromatografi

Mobil fase: acetonitril/acetatbuffer (2.15)

Innstill den mobile fases strømningshastighet gjennom kolonnen på $2,0 \pm 0,5$ ml/min. Innstill detektorens bølgelengde på 240 nm.

4.2.1. Kalibrering

Sprøyt inn 10 ml av hver av standardløsningene av konserveringsmidler (2.17) i væskekromatografen (3.2). Bestem forholdet mellom de undersøkte konserveringsmidlenes topphøyde og den interne standards topphøyde ved de oppnådde kromatogrammene. Tegn en kurve for hvert konserveringsmiddel, som viser topphøydeforholdet mot hver standardløsningskonsentrasjon.

Kontroller at det oppnås en lineær kurve for standardløsningene.

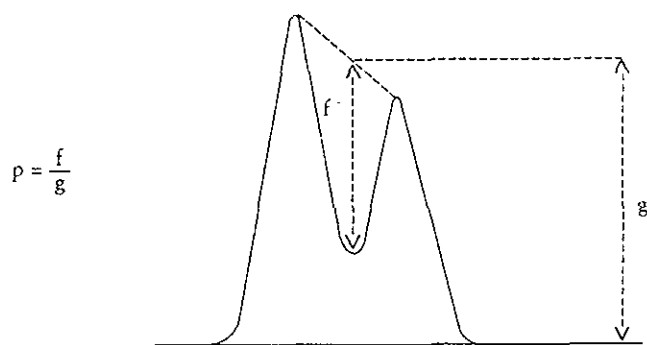
4.2.2. Bestemmelse

Sprøyt inn 10 ml prøveekstrakt (4.1.1.) i væskekromatografen (3.2) og registrer kromatogrammet. Sprøyt inn 10 ml standardløsning av konserveringsmiddelet (2.17) og registrer kromatogrammet. Sammenlign kromatogrammene. Dersom det i prøveekstraktets (4.1.1) kromatogram ikke synes å være en topp med omtrent samme retensjonstid som 2-metoksybenzoylsyre (anbefalt intern standard), sprøyt inn 10 ml prøveekstrakt tilsatt intern standard (4.1.2) i væskekromatografen og registrer kromatogrammet.

Dersom det inntreffer en interfererende topp i prøveekstraktets (4.1.1) kromatogram med samme retensjonstid som 2-metoksybenzoesyre, bør det velges en mer egnet intern standard. (Dersom et av de undersøkte konserveringsmidlene ikke forekommer i kromatogrammet, kan det brukes som intern standard.)

Det må påses at kromatogrammene av en standardløsning og av prøveløsningen oppfyller følgende krav:

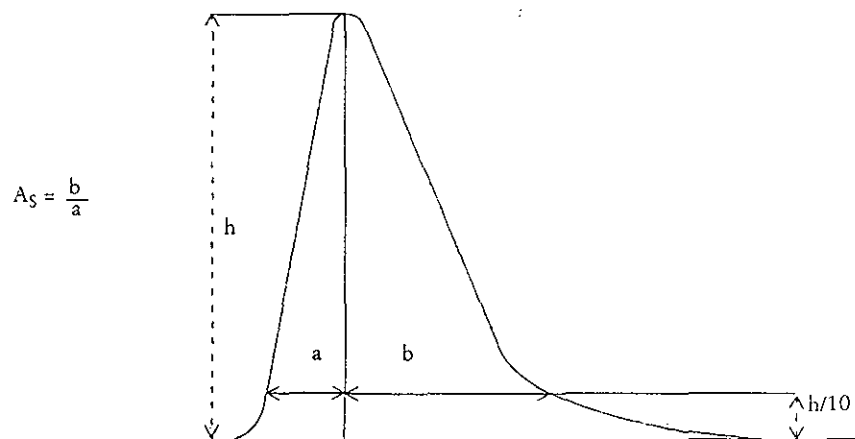
- toppatskillelsen for de to nærmest liggende toppene skal være minst 0,9. (Toppatskillelse er definert i figur 1.)



Figur 1 Toppatskillelse (p)

Dersom den krevde atskillelse ikke oppnås, bør det anvendes en mer effektiv kolonne, eller den mobile fases sammensetning bør korrigeres slik at kravet blir oppfylt.

- assymetriefaktoren A_s skal for alle topper være mellom 0,9 og 1,5. (Assymetriefaktoren er definert i figur 2.) For registrering av kromatogram til bestemmelse av assymetriefaktor anbefales en papirhastighet på minst 2 cm/min,



Figur 2 Assymetriefaktor (A_s)

- grunnlinjen skal være stabil.

5. Beregning

Bruk forholdet mellom det undersøkte konserveringsmiddelets topphøyde og topphøyden av 2-metoksybenzoesyre (intern standard) og kalibreringskurven til beregning av konsentrasjonen av syrekonserveringsmiddel i prøveløsningen. Beregn innholdet av benzoesyre, 4-hydroksybenzoesyre, sorbinsyre og salisylsyre i prøven som masseprosent X_i ved formelen:

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

der

a = masse (g) av prøven (4.1.2)

b = konsentrasjon (mg/ml) av konserveringsmiddelet i prøveekstraktet (4.1.2), avlest på kalibreringskurven

6. Repeterbarhet⁽¹⁾

Ved et innhold av 4-hydroksybenzoesyre på 0,40 % bør avviket mellom resultatene av to parallelle bestemmelser utført på samme prøve ikke overstige en absolutt verdi på 0,035 %.

Ved et innhold av benzoesyre på 0,50 % bør avviket mellom resultatene av to parallelle bestemmelser utført på samme prøve ikke overstige en absolutt verdi på 0,050 %.

Ved et innhold av salisylsyre på 0,50 % bør avviket mellom resultatene av to parallelle bestemmelser utført på samme prøve ikke overstige en absolutt verdi på 0,045 %.

Ved et innhold av sorbinsyre på 0,60 % bør avviket mellom resultatene av to parallelle bestemmelser utført på samme prøve ikke overstige en absolutt verdi på 0,035 %.

7. Merknader

7.1. Resultater av en robusthetstest på metoden viste at den anvendte mengde svovelsyre til ekstraksjon av syrekonserveringsmidlene fra prøven kan påvirke resultatet, og at den tilberedte prøvemengde bør holdes innenfor de foreskrevne grenser.

7.2. Dersom det er ønskelig, kan en egnet forkolonne anvendes.

C. BESTEMMELSE AV PROPIONSRYRE

1. Formål og anvendelsesområde

Denne metoden kan anvendes til bestemmelse av propionsyre, maksimumskonsentrasjon 2 % (m/m), i kosmetiske produkter.

2. Definisjon

Propionsyrekonsentrasjonen målt ved denne metode uttrykkes som masseprosent (% m/m) av produktet.

⁽¹⁾ ISO 5725.

3. **Prinsipp**

Etter ekstraksjon av propionsyre fra produktet utføres bestemmelsen ved gasskromatografi ved hjelp av 2-metylpropionsyre som intern standard.

4. **Reagenser**

Alle reagenser skal være av analysekvalitet. Vann skal være destillert eller av tilsvarende kvalitet.

4.1. Etanol 96 % (v/v)

4.2. Propionsyre

4.3. 2-metylpropionsyre

4.4. Ortofosforsyre 10 % (m/v)

4.5. Propionsyreløsning

Vei opp ca. 1,00 g (p gram) propionsyre nøyaktig i en 50 ml målekolbe og fyll opp til merket med etanol (4.1).

4.6. Intern standardløsning

Vei opp ca. 1,00 g (e gram) 2-metylpropionsyre nøyaktig i en 50 ml målekolbe og fyll opp til merket med etanol (4.1).

5. **Apparatur**

5.1. Vanlig laboratorieutstyr, og:

5.2. Gasskromatograf med flammeionisasjonsdetektor

5.3. Reagensglass (20 x 150 mm) med skrulokk

5.4. Vannbad ved 60 °C

5.5. 10 ml glassprøyte med membranfilter (porestørrelse 0,45 mm)

6. **Framgangsmåte**

6.1. Tilberedning av prøven

6.1.1. Tilberedning av prøven uten intern standard

Vei opp ca. 1 g av prøven i et reagensglass (5.3). Tilsett 0,5 ml fosforsyre (4.4) og 9,5 ml etanol (4.1).

Lukk glasset og ryst kraftig. Plasser om nødvendig glasset i et vannbad ved 60 °C (5.4) i fem minutter slik at fettfasen oppløses fullstendig. Avkjøl raskt under rennende vann. Filtrer en del av løsningen gjennom et membranfilter (5.5). Kromatografer filtratet samme dag.

6.1.2. Tilberedning av prøven med intern standard

Vei opp med tre desimaler $1 \pm 0,1$ g (a gram) av prøven i et reagensglass (5.3). Tilsett 0,5 ml fosforsyre (4.4), 0,50 ml intern standardløsning (4.6) og 9 ml etanol (4.1).

Lukk glasset og ryst kraftig. Plasser om nødvendig glasset i et vannbad ved 60 °C (5.4) i fem minutter slik at fettfasen oppløses. Avkjøl raskt under rennende vann. Filtrer en del av løsningen gjennom et membranfilter (5.5). Kromatografer filtratet samme dag.

6.2. Vilkår for gasskromatografi

Følgende vilkår anbefales:

Kolonne

Type	Rustfritt stål
Lengde	2 m
Diameter	1/8"
Pakking	10 % SP™ 1000 (eller tilsvarende) + 1 % H ₃ PO ₄ på Chromosorb WAW 100-120 mesh

Temperatur

Injektor	200 °C
Kolonne	120 °C
Detektor	200 °C
Bæregass	Nitrogen
Strømning	25 ml/min

6.3. **Kromatografi**

6.3.1. Kalibrering

Overfør med pipette henholdsvis 0,25, 0,50, 1,00, 2,00 og 4,00 ml propionsyreløsning (4.5) til en serie med 20 ml målekolber. Tilsett med pipette 1,00 ml intern standardløsning (4.6) til hver målekolbe. Fyll opp til streken med etanol (4.1) og bland. Løsninger tilberedt på denne måten inneholder e mg/ml 2-metylpropionsyre som intern standard (dvs. 1 mg/ml dersom 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 dersom p = 1 000).

Sprøyt inn 1 ml av hver løsning og tegn kalibreringskurven ved å opptegne forholdet mellom propionsyremasse og 2-metylpropionsyremasse på x-aksen og forholdet mellom de tilsvarende topparealer på y-aksen.

Foreta tre innsprøytinger av hver løsning og beregn gjennomsnittlige topparealforhold.

6.3.2. Bestemmelse

Sprøyt inn 1 ml av prøvefiltratet 6.1.1. Sammenlign kromatogrammet med kromatogrammet for en av standardløsningene (6.3.1). Dersom en topp har omtrent samme retensjonstid som 2-metylpropionsyre, endres den interne standard. Dersom det ikke observeres interferens, sprøyt inn 1 ml av prøvefiltratet 6.1.2 og mål topparealet av propionsyre og intern standard.

Foreta tre innsprøytinger av hver løsning og beregn gjennomsnittlige topparealforhold.

7. **Beregning**

7.1. Les av på kalibreringskurven i 6.3.1 masseforholdet (K) tilsvarende topparealforholdet beregnet i 6.3.2.

- 7.2. Beregn prøvens innhold av propionsyre (X) som masseprosent på grunnlag av de oppnådde masseforhold ved anvendelse av følgende formel:

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

der

K = forholdet beregnet i 7.1

e = massen i gram av den interne standard veid i 4.6

a = massen i gram av prøven veid i 6.1.2

Rund av resultatene til en desimal.

8. Repeterbarhet⁽¹⁾

For et propionsyreinnhold på 2 % (m/m) må avviket mellom resultatene av to parallelle bestemmelser utført på samme prøve ikke overstige 0,12 %.

II. IDENTIFIKASJON OG BESTEMMELSE AV HYDROKINON, HYDROKINONMONOMETYLETER, HYDROKINONMONOETYLETER OG HYDROKINONMONOBENZYLETER I KOSMETISKE PRODUKTER

A. IDENTIFIKASJON

1. Formål og anvendelsesområde

Denne metode anvendes ved påvisning og identifikasjon av hydrokinon, hydrokinonmonometyleter, hydrokinonmonoetyleter og hydrokinonmonobenzyleter i kosmetiske produkter til bleking av hud.

2. Prinsipp

Hydrokinon og dets etere identifiseres ved tyntsjikt-kromatografi (TLC).

3. Reagenser

Alle reagenser skal være av analysekvalitet.

3.1. Etanol, 96 % (v/v)

3.2. Kloroform

3.3. Dietyleter

3.4. Framkallingsvæske:

Kloroform/dietyleter, 66/33 (v/v)

3.5. Ammoniakk, 25 % (m/m) ($d \frac{20}{4} = 0,91$ g/ml)

3.6. Askorbinsyre

(1) ISO 5725.

- 3.7. Hydrokinon
- 3.8. Hydrokinonmonometyleter
- 3.9. Hydrokinonmonoetyleter
- 3.10. Hydrokinonmonobenzyleter (monobenzon)
- 3.11. Referanseløsninger

Følgende referanseløsninger skal være nylig tilberedte, og de er holdbare én dag:

- 3.11.1. Vei opp 0,5 g hydrokinon (3.7) i et 10 ml måleglass med inndeling. Tilsett 0,250 g askorbinsyre (3.6) og 5 ml etanol (3.1). Tilsett ammoniakk (3.5) inntil pH-verdien er 10 og fyll opp til 10 ml med etanol (3.1).
- 3.11.2. Vei opp 0,05 g hydrokinonmonometyleter (3.8) i et 10 ml måleglass med inndeling. Tilsett 0,250 g askorbinsyre (3.6) og 5 ml etanol (3.1). Tilsett ammoniakk (3.5) inntil pH-verdien er 10 og fyll opp til 10 ml med etanol (3.1).
- 3.11.3. Vei opp 0,05 g hydrokinonmonoetyleter (3.9) i et 10 ml måleglass med inndeling. Tilsett 0,250 g askorbinsyre (3.6) og 5 ml etanol (3.1). Tilsett ammoniakk (3.5) inntil pH-verdien er 10 og fyll opp til 10 ml med etanol (3.1).
- 3.11.4. Vei opp 0,05 g hydrokinonmonobenzyleter (3.10) i et 10 ml måleglass med inndeling. Tilsett 0,250 g askorbinsyre (3.6) og 5 ml etanol (3.1). Tilsett ammoniakk (3.5) inntil pH-verdien er 10 og fyll opp til 10 ml med etanol (3.1).
- 3.12. Sølvnitrat
- 3.13. 12-fosformolybdensyre
- 3.14. Kaliumferrocyanid-heksahydrat
- 3.15. Jernklorid-heksahydrat
- 3.16. Sprayreagenser
- 3.16.1. Tilsett ammoniakk (3.5) til en 5 % (m/v) vandig løsning av sølvnitrat (3.12) inntil det bunnfallet som dannes, er forsvunnet.

Advarsel:

Løsningen må kastes etter bruk, ettersom den blir ustabil og eksplosjonsfarlig når den står.

- 3.16.2. 10 % (m/v) løsning av 12-fosformolybdensyre (3.13) i etanol (3.1).
- 3.16.3. Tilbered en 1 % (m/v) vandig løsning av kaliumferrocyanid (3.14) og en 2 % (m/v) vandig løsning av jernklorid (3.15). Bland like deler av begge løsninger like før bruk.

4. **Apparatur**

Vanlig laboratorieutstyr og:

- 4.1. Vanlig TLC-utstyr
- 4.2. TLC-plater, klare til bruk: Silicagel GHR/UV₂₅₄, 20 x 20 cm (Machery, Nagel eller tilsvarende). Sjikstykkelser 0,25 mm

4.3. Ultralydbad

4.4. Sentrifuge

4.5. UV-lampe, 354 nm

5. **Framgangsmåte**

5.1. Tilberedning av prøven

Vei opp 3,0 g av prøven i et 10 ml måleglass med inndeling. Tilsett 0,250 g askorbinsyre (3.6) og 5 ml etanol (3.1). Juster pH til 10 med ammoniakk (3.5). Fyll opp til 10 ml med etanol (3.1). Sett propp i glasset og homogeniser i et ultralydbad i 10 minutter. Filtrer gjennom et filterpapir eller sentrifuger ved 3 000 omdreininger per minutt.

5.2. TLC

5.2.1. Mett kromatografikaret med framkallingsvæske (3.4).

5.2.2. Sett 2 ml av hver av referanseløsningene (3.11) og 2 ml av prøveløsningen (5.1) på en TLC-plate. Framkall platen i mørket ved romtemperatur inntil væskefronten har vandret 15 cm fra startpunktet.

5.2.3. Fjern platen og la den tørke ved romtemperatur.

5.3. Påvisning

5.3.1. Observer platen under UV-lys ved 254 nm og marker flekkenes posisjon.

5.3.2. Sprøyt platen med

- sølvnitratreagens (3.16.1) eller
- 12-fosformolybdensyrereagens (3.16.2) og varm opp til 120 °C, eller
- løsning av kaliumferrocyanid og jernklorid (3.16.3).

6. **Identifikasjon**

Beregn R_f-verdien av hver flekk.

Sammenlign flekkene oppnådd for prøveløsningen med flekkene for referanseløsningene med hensyn til R_f-verdier, flekkenes farge under UV-stråling og flekkenes farge etter synliggjøring med sprayreagens.

Utfør HPLC som beskrevet i avsnitt B nedenfor og sammenlign retensjonstidene for prøvens topper med referanseløsningenes retensjonstider.

Kombiner resultatene av TLC og HPLC for å identifisere tilstedeværelse av hydrokinon og/eller dets etere.

7. **Merknader**

På de fastsatte vilkårene var R_f-verdiene som følger:

hydrokinon	0,32
hydrokinonmonometyleter	0,53
hydrokinonmonoetyleter	0,55
hydrokinonmonobenzyleter	0,58

B. BESTEMMELSE

1. Formål og anvendelsesområde

Denne metode beskriver framgangsmåten ved bestemmelse av hydrokinon, hydrokinonmonometyleter, hydrokinonmonoetyleter og hydrokinonmonobenzyleter i kosmetiske produkter til bleking av hud.

2. Prinsipp

Ekstraher prøven med vann/etanol ved svak varme for å oppløse eventuelle fettstoffer. Filtrer blandingen. Bestem analyttene i filtratet ved omvendt fase-væskekromatografi med UV-deteksjon.

3. Reagenser

3.1. Alle reagenser skal være av analysekvalitet. Vann skal være destillert eller av minst tilsvarende kvalitet.

3.2. Metanol

3.3. Hydrokinon

3.4. Hydrokinonmonometyleter

3.5. Hydrokinonmonoetyleter

3.6. Hydrokinonmonobenzyleter (monobenzen)

3.7. Tetrahydrofuran, HPLC-kvalitet

3.8. Vann/metanolblanding 1 : 1 (v/v)

Bland 1 del vann og 1 del metanol (3.2)

3.9. Mobil fase: Tetrahydrofuran/vannblanding 45 : 55 (v/v)

Bland 45 volumdeler tetrahydrofuran (3.7) og 55 volumdeler vann.

3.10. Referanseløsning

Vei opp 0,06 g hydrokinon (3.3), 0,08 g hydrokinonmonometyleter (3.4), 0,10 g hydrokinonmonoetyleter (3.5) og 0,12 g hydrokinonmonobenzyleter (3.6) i en 50 ml målekolbe. Løs opp og fyll opp med metanol (3.2) til merket. Tilbered referanseløsningen ved å fortynne 10,00 ml av denne løsningen til 50,00 ml med vann/metanolblandingen (3.8). Disse løsningene skal være nylig tilberedte.

4. Apparat

Vanlig laboratoriestyr og:

- 4.1. Vannbad ved 60 °C.
- 4.2. Høytrykksvæskrokromatografi med UV-detektor med variabel bølgelengde og 10 ml injeksjonssløyfe.
- 4.3. Analysekolonne
- Kromatografikolonne av rustfritt stål, lengde 250 mm, innvendig diameter 4,6 mm, pakket med Zorbax-fenyl, eller tilsvarende. Det må ikke brukes forkolonne, unntatt fenylkolonne eller tilsvarende.
- 4.4. Filterpapir, diameter 90 mm, Schleicher & Schull, Weissband nr. 5892, eller tilsvarende.

5. Framgangsmåte

5.1. Tilberedning av prøven

Vei opp $1 \pm 0,1$ g av prøven med en nøyaktighet på tre desimaler i en 50 ml målekolbe. Disperger prøven i en 25 ml vann/metanolblanding (3.8). Sett kork i kolben og ryst kraftig til det dannes en homogen suspensjon. Ryst i minst ett minutt. Sett kolben i et vannbad (4.1) ved 60 °C for å fremme ekstraksjonen. Avkjøl kolben og fyll opp til merket med vann/metanol (3.8). Filtrer ekstraktet med et filterpapir (4.4). Utfør HPLC-bestemmelsen innen 24 timer etter at ekstraktet er tilberedt.

5.2. Høytrykksvæskrokromatografi

5.2.1. Innstill den mobile fases (3.9) strømningshastighet til 1,0 ml/min. og detektorbølgelengden på 295 nm.

5.2.2. Sprøyt inn 10 ml av prøveløsningen beskrevet i avsnitt 5.1 og registrer kromatogrammet. Mål topparealene. Utfør kalibrering som beskrevet i 5.2.3. Sammenlign kromatogrammene for prøveløsningene med kromatogrammene for standardløsningene. Bruk topparealene og responsfaktorene (RF) beregnet i 5.2.3 for å beregne analyttenes konsentrasjon i prøveløsningen.

5.2.3. Kalibrering

Sprøyt inn 10 ml av referanseløsningen (3.10) og registrer kromatogrammet. Sprøyt inn flere ganger inntil det oppnås et konstant toppareal.

Beregn responsfaktoren RF_i :

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

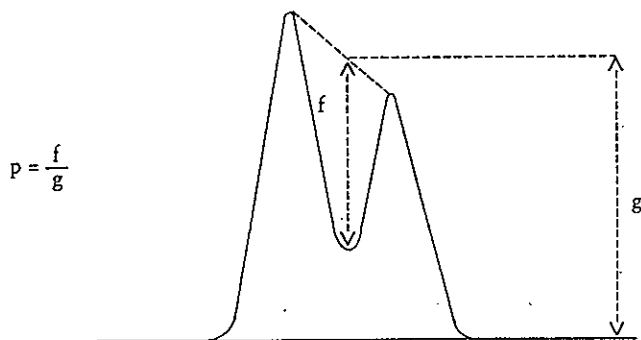
der:

p_i = topparealet for hydrokinon, hydrokinonmonometyleter, hydrokinonmonoetyleter eller hydrokinonmonobenzyleter, og

c_i = referanseløsningens (3.10) konsentrasjon (g/50 ml) av hydrokinon, hydrokinonmonometyleter, hydrokinonmonoetyleter eller hydrokinonmonobenzyleter.

Kontroller at kromatogrammene av standardløsning og prøveløsning oppfyller følgende krav:

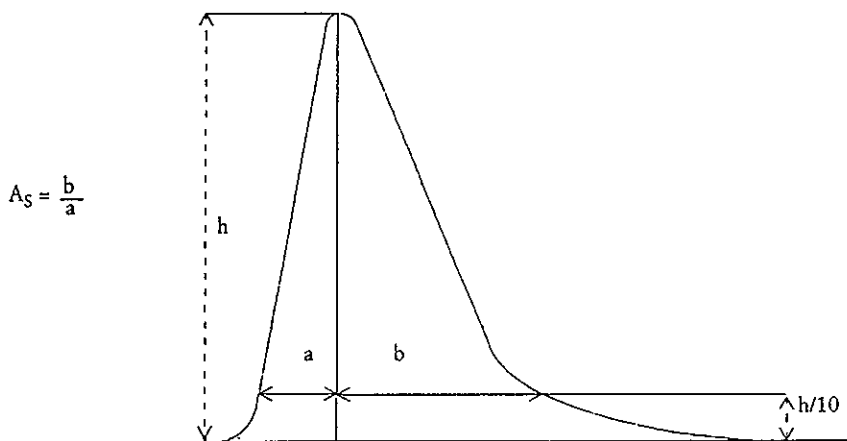
- toppatskillelsen for de to nærmest liggende toppene skal være minst 0,90. Toppatskillelsen er definert i figur 1.



Figur 1: Toppatskillelse (p)

Dersom den krevde atskillelse ikke oppnås, bør det anvendes en mer effektiv kolonne, eller den mobile fases sammensetning bør korrigeres slik at kravet blir oppfylt,

- assymetriefaktoren A_s skal for alle topper være mellom 0,9 og 1,5. (Assymetriefaktoren er definert i figur 2.) For registrering av kromatogram til bestemmelse av assymetriefaktor anbefales en papirhastighet på minst 2 cm/min.



Figur 2 Asymmetrifaktor (A_s)

- grunnlinjen skal være stabil.

6. Beregning

Bruk analyttoppenes arealer for å beregne analyttenes konsentrasjon i prøven. Beregn analyttkonsentrasjonen ved formelen:

$$x_i \% (m/m) = \frac{b_i \cdot 100}{RF_{i,x} \cdot a}$$

der

a = massen av prøven i gram
b_i = toppareal av analytt «i» i prøven

7. Repeterbarhet⁽¹⁾

- 7.1. Ved et innhold av hydrokinon på 2 % bør avviket mellom resultatene av to parallelle bestemmelser utført på samme prøve ikke overstige en absolutt verdi på 0,13 %.
- 7.2. Ved et innhold av hydrokinonmonometyleter på 1,0 % bør avviket mellom resultatene av to parallelle bestemmelser utført på samme prøve ikke overstige en absolutt verdi på 0,1 %.
- 7.3. Ved et innhold av hydrokinonmonoetyleter på 1,0 % bør avviket mellom resultatene av to parallelle bestemmelser utført på samme prøve ikke overstige en absolutt verdi på 0,11 %.
- 7.4. Ved et innhold av hydrokinonmonobenzyletyleter på 1,0 % bør avviket mellom resultatene av to parallelle bestemmelser utført på samme prøve ikke overstige en absolutt verdi på 0,11 %.

8. Reproducerbarhet⁽¹⁾

- 8.1. Ved et innhold av hydrokinon på 2,0 % bør avviket mellom resultatene av to bestemmelser utført på samme prøve under ulike forhold (forskjellig laboratorium, operatør, utstyr og/eller tidspunkt) ikke overstige en absolutt verdi på 0,37 %.
- 8.2. Ved et innhold av hydrokinonmonometyleter på 1,0 % bør avviket mellom resultatene av to bestemmelser utført på samme prøve under ulike forhold (forskjellig laboratorium, operatør, utstyr og/eller tidspunkt) ikke overstige en absolutt verdi på 0,21 %.
- 8.3. Ved et innhold av hydrokinonmonoetyleter på 1,0 % bør avviket mellom resultatene av to bestemmelser utført på samme prøve under ulike forhold (forskjellig laboratorium, operatør, utstyr og/eller tidspunkt) ikke overstige en absolutt verdi på 0,19 %.
- 8.4. Ved et innhold av hydrokinonmonobenzyletyleter på 1,0 % bør avviket mellom resultatene av to bestemmelser utført på samme prøve under ulike forhold (forskjellig laboratorium, operatør, utstyr og/eller tidspunkt) ikke overstige en absolutt verdi på 0,11 %.

9. Merknader

- 9.1. Når et innhold av hydrokinon i en prøve er betydelig større enn 2 %, og det kreves en nøyaktig bestemmelse av innholdet, fortynnes prøveekstraktet (5.1) til en konsentrasjon tilsvarende den som ville ha blitt oppnådd ved en prøve som inneholder 2 % hydrokinon, og bestemmelsen gjentas.

(I enkelte instrumenter kan absorbanse for høye hydrokinonkonsentrasjoner være utenfor detektorens lineære område).

- 9.2. Interferens

Metoden beskrevet ovenfor muliggjør bestemmelse av hydrokinon og dets etere i et enkelt isokratisk løp. Bruken av fenyl-kolonne sikrer tilstrekkelig retensjon av hydrokinon, noe som ikke kan garanteres dersom en C18-kolonne brukes med den beskrevne mobile fase.

Ved denne metode er det imidlertid tilbøyelighet til interferens med flere parabener. I slike tilfeller skal bestemmelsen gjentas ved bruk av et annet system med mobil fase/stasjonær fase. Egnede metoder er beskrevet i henvisning ⁽²⁾ og ⁽³⁾, dvs.

⁽¹⁾ ISO 5725

⁽²⁾ 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).

⁽³⁾ J. Firth and I. Rix, Determination of Hydroquinone in skin toning creams, Analyst (1986), 111, p. 129.

- 1) Kolonne: Zorbax ODS, 4,6 mm x 25 cm eller tilsvarende:
- Temperatur: 36 °C
- Strømning: 1,5 ml/min
- Mobil fase:
- hydrokinon: metanol/vann 5/95 (v/v)
 - hydrokinonmonometyleter: metanol/vann 30/70 (v/v)
 - hydrokinonmonobenzyleter: metanol/vann 80/20 (v/v)⁽¹⁾
- 2) Kolonne: Spherisorb S5-ODS eller tilsvarende
- Mobil fase: vann/metanol 90/10 (v/v)
- Strømning: 1,5 ml/min
- Disse vilkårene er egnet til analyse av hydrokinon⁽²⁾.