

SJUENDE KOMMISJONSDIREKTIV 96/45/EF**av 2. juli 1996****om nødvendige analysemetoder for kontroll av kosmetiske produkters sammensetning(*)****(Tekst som er relevant for EØS)****KOMMISJONEN FOR DE EUROPEISKE FELLESKAP HAR -**

under henvisning til traktaten om opprettelse av Det europeiske fellesskap,

under henvisning til rådsdirektiv 76/768/EØF av 27. juli 1976 om tilnærming av medlemsstatenes lovgivning om kosmetiske produkter⁽¹⁾, sist endret ved kommisjonsdirektiv 95/34/EF⁽²⁾, særlig artikkel 8 nr. 1, og

ut fra følgende betraktninger:

I direktiv 76/768/EØF er det fastsatt 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, og visse metoder er allerede vedtatt ved kommisjonsdirektiv 80/1335/EØF⁽³⁾, endret ved direktiv 87/143/EØF⁽⁴⁾, ved kommisjonsdirektiv 82/434/EØF⁽⁵⁾, endret ved direktiv 90/207/EØF⁽⁶⁾, og ved kommisjonsdirektiv 83/514/EØF⁽⁷⁾, 85/490/EØF⁽⁸⁾, 93/73/EØF⁽⁹⁾ og 95/32/EF⁽¹⁰⁾.

Identifikasjon og bestemmelse av 2-fenoksyetanol, 1-fenoksypropan-2-ol, metyl-, etyl-, propyl-, butyl- og benzyl-4-hydroksybenzoat i kosmetiske produkter utgjør sjuende 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:**Artikkel 1**

Medlemsstatene skal treffe de nødvendige tiltak for å sikre at identifikasjon og bestemmelse av 2-fenoksyetanol, 1-fenoksypropan-2-ol, metyl-, etyl-, propyl-, butyl- og benzyl-4-hydroksybenzoat 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 1997. De skal umiddelbart underrette Kommisjonen om dette.
2. 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.
3. Medlemsstatene skal oversende Kommisjonen teksten til de internrettslige bestemmelser som de vedtar på det området dette direktiv omhandler.

(*) Denne EF-rettsakten, kunngjort i EFT nr. L 213 av 22.8.1996, s. 8, er omhandlet i EØS-komiteens beslutning nr. 66/97 av 4. oktober 1997 om endring av EØS-avtalens vedlegg II (Tekniske forskrifter, standarder, prøving og sertifisering), se denne utgaven av EØS-tillegget til De Europeiske Fellesskaps Tidende.

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

(2) EFT nr. L 167 av 18.7.1995, s. 19.

(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.

(10) EFT nr. L 178 av 28.7.1995, s. 20.

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.

Utfærdiget i Brussel, 2. juli 1996.

For Kommisjonen

Emma BONINO

Medlem av Kommisjonen

VEDLEGG

IDENTIFIKASJON OG BESTEMMELSE AV 2-FENOKSYETANOL, 1-FENOKSYPROPAN-2-OL, METYL-, ETYL-, PROPYL-, BUTYL- OG BENZYL-4-HYDROKSYBENZOAT I KOSMETISKE PRODUKTER

A. IDENTIFIKASJON

1. Formål og virkeområde

Denne metode anvendes sammen med metoden beskrevet i del B og gjør det mulig å identifisere og bestemme 2-fenoksyetanol, 1-fenoksypropan-2-ol, metyl-, etyl-, propyl-, butyl- og benzyl-4-hydroksybenzoat i kosmetiske produkter ved tyntsjiktskromatografi.

2. Prinsipp

Konserveringsmidlene ekstraheres med aceton fra den sure prøven av det kosmetiske produktet. Etter filtrering blandes acetonløsningen med vann, og fettsyrene bunnfelles som kalsiumsalt i alkalisk miljø. Den alkaliske aceton/vannblandingen ekstraheres med dietyleter for å fjerne lipofile stoffer. Etter syrning ekstraheres konserveringsmidlene med dietyleter. En delmengde av dietyleterekstrakten påføres en tyntsjiktskromatografiplate belagt med silikagel. Etter utvikling av platen betraktes kromatogrammet under UV-lys og synliggjøres ved hjelp av Millons reagens.

3. Reagenser

3.1. Generelt

Alle reagenser skal være av analysekvalitet. Vannet som anvendes, skal være destillert eller vann av minst tilsvarende renhet.

3.2. Aceton

3.3. Dietyleter

3.4. n-pentan

3.5. Metanol

3.6. Isedikk

3.7. Saltsyreløsning, $c(\text{HCl}) = 4 \text{ mol/l}$

3.8. Kaliumhydroksidløsning, $c(\text{KOH}) = 4 \text{ mol/l}$

3.9. Kalsiumkloriddihydrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

3.10. Framkallingsreagens: Millons reagens

Millons reagens (kvikksølv(II)nitrat) er en bruksferdig løsning som finnes i handelen (Fluka 69820).

3.11. 2-fenoksyetanol

3.12. 1-fenoksypropan-2-ol

- 3.13. Metyl-4-hydroksybenzoat (metylparaben)
- 3.14. Etyl-4-hydroksybenzoat (etylparaben)
- 3.15. n-propyl-4-hydroksybenzoat (propylparaben)
- 3.16. n-butyl-4-hydroksybenzoat (butylparaben)
- 3.17. Benzyl-4-hydroksybenzoat (benzylparaben)
- 3.18. Referanseløsninger

Tilbered en 0,1 % (m/v) løsning i metanol av hvert av referansestoffene 3.11, 3.12, 3.13, 3.14, 3.15, 3.16 og 3.17.

- 3.19. Framkallingsvæske

Bland 88 deler n-pentan (3.4) med 12 deler isedikk (3.6).

4. Apparat

Vanlig laboratorieutstyr og:

- 4.1. Vannbad som kan holde en temperatur på 60 °C
- 4.2. Utviklingskar (uten filterpapir)
- 4.3. Ultrafiolett lyskilde, 254 nm
- 4.4. Tyntsjiktskromatografiplater, 20 cm x 20 cm, belagt med 0,25 mm silikagel 60 F₂₅₄ med konsentrasjonssone (Merck nr. 11798, Darmstadt eller tilsvarende)
- 4.5. Ovn som kan holde en temperatur på inntil 105 °C
- 4.6. Varmluftshårtørrer
- 4.7. Malerrull med ullag, lengde ca. 10 cm, utvendig diameter ca. 3,5 cm. Ullaget skal være 2-3 mm tykt. Ullaget trimmes om nødvendig.

Se merknad under 5.2.

- 4.8. 50 ml reagensrør med skrulokk
- 4.9. Elektrisk varmeplate med termostat. Temperaturinnstilling: ca. 80 °C. Varmeplaten skal være dekket av en aluminiumsplate på 20 cm x 20 cm med en tykkelse på ca. 6 mm for å sikre jevn varmefordeling.

5. Framgangsmåte

- 5.1. Tilberedning av prøven

Vei opp ca. 1 g av prøven i et 50 ml reagensrør med skrulokk (4.8). Tilsett fire dråper saltsyreløsning (3.7) og 40 ml aceton.

For sterkt basiske kosmetiske produkter, som toalettsåpe, skal 20 dråper saltsyreløsning tilsettes. Sett lokket på røret, varm forsiktig opp blandingen til ca. 60 °C for å lette ekstraksjonen av konserveringsmidlene i acetonfasen, og rist kraftig i ett minutt.

Mål løsningsens pH med pH-indikatorpapir, og juster løsningsens pH til ≤ 3 med saltsyreløsning. Rist igjen kraftig i ett minutt.

Avkjøl løsningen til romtemperatur, og filtrer den gjennom et filterpapir ned i en erlenmeyerkolbe. Overfør 20 ml av filtratet til en 200 ml erlenmeyerkolbe, tilsett 60 ml vann og bland. Juster blandingens pH til ca. 10 med kaliumhydroksidløsning (3.8), ved å bruke pH-indikatorpapir.

Tilsett 1 g kalsiumkloriddihydrat (3.9), og rist kraftig. Filtrer løsningen gjennom et filterpapir ned i en 250 ml skilletrakt som inneholder 75 ml dietyleter, og rist kraftig i ett minutt. Når fasene er atskilt, overføres den vandige fasen til en 200 ml erlenmeyerkolbe. Juster løsningsens pH til ca. 2 med saltsyreløsning, ved å bruke pH-indikatorpapir. Tilsett deretter 10 ml dietyleter, og rist kraftig i ett minutt. Når fasene er atskilt, overføres ca. 2 ml av dietyleterfasen til et 5 ml prøveglass.

5.2 Tyntsjiktskromatografi

Plasser en tyntsjiktskromatografiplate (4.4) på den oppvarmede aluminiumsplaten (4.9). Ha 10 ml av hver referanseløsning (3.18) og 100 ml av prøveløsningen(e) (5.1) på startlinjen, som avmerkes i konsentrasjonssonen på tyntsjiktskromatografiplaten.

Om nødvendig kan en luftstrøm benyttes for å lette fordampingen av løsemiddelet. Fjern tyntsjiktskromatografiplaten fra varmeplaten, og la den avkjøles til romtemperatur. Overfør 100 ml av framkallingsvæsken (3.19) til et utviklingskar (4.2).

Plasser straks tyntsjiktskromatografiplaten i det umettede karet, og la den utvikle seg til løsemiddelets front har beveget seg ca. 15 cm fra startlinjen. Fjern platen fra utviklingskaret, og blås den tørr med en varmluftshårtørrer.

Undersøk platen under UV-lys (4.3), og merk av flekkene. Varm opp platen i 30 minutter i en ovn (4.5) ved 100 °C for å fjerne overflødig isedikk. Synliggjør konserveringsmidlene i kromatogrammet ved hjelp av Millons reagens (3.10), ved å dyppe malerrullen (4.7) i reagensen og rulle den over tyntsjiktskromatografiplaten til hele platen er jevnt fuktig.

Merknad: Alternativt kan flekkene synliggjøres ved å ha en dråpe Millons reagens forsiktig på hver av flekkene som er avmerket under UV-lys.

Estere av 4-hydroksybenzoesyre framkommer som røde flekker, mens 2-fenoksyetanol og 1-fenoksypropan-2-ol framkommer som gule flekker. Legg imidlertid merke til at 4-hydroksybenzoesyren selv, som kan forekomme i prøvene som konserveringsmiddel eller som nedbrytingsprodukt av parabener, også vil framkomme som en rød flekk. Se 7.3 og 7.4.

6. Identifikasjon

Beregn R_f -verdien for hver flekk. Sammenlign flekkene fra prøveløsningen med flekkene fra referanseløsningene med hensyn til R_f -verdier, hvordan de framstår i UV-lys, og hvilken farge de har etter synliggjøring. Foreta en foreløpig identifikasjon av konserveringsmidlene.

Dersom resultatene tyder på forekomst av parabener, anvendes HPLC-metoden beskrevet i del B. Sammenhold resultatene fra tyntsjiktskromatografien med resultatene fra flytende høytytelseskromatografi for å bekrefte forekomst av 2-fenoksyetanol og 1-fenoksypropan-2-ol og parabener.

7. Merknader

- 7.1. Millons reagens bør på grunn av sin giftighet påføres etter en av metodene beskrevet nedenfor. Det anbefales ikke at reagensen sprøytes på.

7.2. Andre hydroksylforbindelser kan også farges med Millons reagens. En tabell over farger og R_f -verdier for en rekke konserveringsmidler, oppnådd ved bruk av denne metoden for tyntsjiktskromatografi, finnes i: N. de Kruijf, M.A.H. Rijk, L.A. Pranato-Soetardhi og A. Schouten (1987): «Determination of preservatives in cosmetic products I: Thin-layer chromatographic procedure for the identification of preservatives in cosmetic products» (*J. Chromatography* 410, 395-411).

7.3. R_f -verdiene oppført i tabellen nedenfor indikerer hvilke verdier som kan forventes:

Forbindelse	hR_f	Farge
4-hydroksybenzosyre	11	rød
metylparaben	12	rød
etylparaben	17	rød
propylparaben	21	rød
butylparaben	26	rød
benzylparaben	16	rød
2-fenoksyetanol	29	gul
1-fenoksypropan-2-ol	50	gul

7.4. Det oppnås ingen atskillelse av 4-hydroksybenzosyre fra metylparaben eller av benzylparaben fra etylparaben. Identifikasjon av disse forbindelsene bør bekrefte ved å anvende HPLC-metoden beskrevet i del B og sammenligne retensjonstidene for henholdsvis prøven og standardløsningene.

B. BESTEMMELSE

1. Formål og anvendelsesområde

Denne metoden anvendes til kvantitativ bestemmelse av 2-fenoksyetanol, 1-fenoksypropan-2-ol, metyl-4-hydroksybenzoat, etyl-4-hydroksybenzoat, propyl-4-hydroksybenzoat, butyl-4-hydroksybenzoat og benzyl-4-hydroksybenzoat i kosmetiske produkter.

2. Definisjon

Mengdene konserveringsmiddel som bestemmes etter denne metoden, uttrykkes i masseprosent.

3. Prinsipp

Prøven gjøres sur ved å tilsette svovelsyre og suspenderes deretter i en blanding av etanol og vann. Etter at blandingen er blitt varmet forsiktig opp til lipidfasen smelter for å oppnå kvantitativ ekstraksjon, blir den filtrert.

Konserveringsmidlene i filtratet bestemmes ved reversfase HPLC, ved anvendelse av isopropyl-4-hydroksybenzoat som intern standard.

4. Reagenser

4.1. Generelt

Alle reagenser må være av analysekvalitet og eventuelt egnet for HPLC. Vannet skal være destillert eller vann av minst tilsvarende renhet.

4.2. Absolutt etanol

- 4.3. 2-fenoksyetanol
- 4.4. 1-fenoksypropan-2-ol
- 4.5. Metyl-4-hydroksybenzoat (metylparaben)
- 4.6. Etyl-4-hydroksybenzoat (etylparaben)
- 4.7. n-propyl-4-hydroksybenzoat (propylparaben)
- 4.8. Isopropyl-4-hydroksybenzoat (isopropylparaben)
- 4.9. n-butyl-4-hydroksybenzoat (butylparaben)
- 4.10. Benzyl-4-hydroksybenzoat (benzylparaben)
- 4.11. Tetrahydrofuran
- 4.12. Metanol
- 4.13. Acetonitril
- 4.14. Svovelsyreløsning $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 2\text{mol/l}$
- 4.15. Etanol/vannblanding

Bland 9 deler etanol (4.2) og 1 del vann.

- 4.16. Intern standardløsning

I en 500 ml målekolbe veies nøyaktig opp ca. 0,25 g isopropylparaben (4.8) som løses opp, og kolben fylles opp til merket med vann/etanolblandingen (4.15).

- 4.17. Mobil fase

Bland 5 deler tetrahydrofuran, 60 deler vann, 10 deler metanol og 25 deler acetonitril.

- 4.18. Stamlløsning av konserveringsmidler

I en 100 ml målekolbe veies nøyaktig opp ca. 0,2 g 2-fenoksyetanol, 0,2 g 1-fenoksypropan-2-ol, 0,05 g metylparaben, 0,05 g etylparaben, 0,05 g propylparaben, 0,05 g butylparaben og 0,025 g benzylparaben som løses opp, og kolben fylles opp til merket med etanol/vannblandingen.

Løsningen er holdbar i én uke i kjøleskap.

- 4.19. Standardløsninger av konserveringsmidler

Fra stamlløsningen (4.18) overføres henholdsvis 20 ml, 10 ml, 5 ml, 2 ml og 1 ml til 50 ml målekolber. Hver kolbe tilsettes 10 ml av den interne standardløsningen (4.16) og 1 ml svovelsyreløsning (4.14). Fyll opp til merket med etanol/vannblandingen. Disse løsningene må tilberedes umiddelbart før anvendelse.

5. Apparat

Vanlig laboratorieutstyr og:

- 5.1. Vannbad som kan holde en temperatur på $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$
- 5.2. Apparat for flytende høy-ytelseskromatografi med UV-detektor, bølgelengde 280 nm
- 5.3. Analysekolonne

Rustfritt stål, 25 cm \times innvendig diameter 4,6 mm (eller 12,5 cm \times innvendig diameter 4,6 mm) fylt med Nucleosil 5C18 eller tilsvarende (10.1)
- 5.4. 100 ml reagensrør med skrulokk
- 5.5. Kokstein, karborundum, størrelse 2-4 mm eller tilsvarende.

6. Framgangsmåte

- 6.1. Tilberedning av prøven
 - 6.1.1. Tilberedning av prøven uten tilsetning av intern standard

Mål nøyaktig opp ca. 1 g av prøven i et 100 ml reagensrør med skrulokk. Pipetter 1 ml svovelsyreløsning (4.14) og 50 ml etanol/vannblanding (4.15) i røret. Tilsett ca. 1 g kokstein (5.5), lukk røret, og rist kraftig til det oppstår en homogen suspensjon (minst ett minutt). La røret stå fem minutter i vannbad (5.1) ved $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ for å lette ekstraksjonen av konserveringsmidler i etanolfasen.

Avkjøl røret straks i rennende kaldt vann, og oppbevar ekstrakten i kjøleskap i én time. Filtrer ekstrakten gjennom et filterpapir. Overfør ca. 2 ml av filtratet til et 5 ml prøveglass. Oppbevar ekstraktene i kjøleskap, og foreta HPLC-analysen innen 24 timer.

- 6.1.2. Tilberedning av prøven med tilsetning av intern standard

Vei opp med en nøyaktighet på tre desimaler $1\text{ g} \pm 0,1\text{ g}$ av prøven i et 100 ml reagensrør med skrulokk.

Pipetter 1 ml svovelsyreløsning og 40 ml etanol/vannblanding i røret. Tilsett ca. 1 g kokstein (5.5) og nøyaktig 10 ml intern standardløsning. Lukk røret, og rist kraftig til det oppstår en homogen suspensjon. Rist i minst ett minutt. La røret stå fem minutter i vannbad (5.1) ved $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ for å lette ekstraksjonen av konserveringsmidler i etanolfasen.

Avkjøl røret straks i rennende kaldt vann, og oppbevar ekstrakten i kjøleskap i én time. Filtrer ekstrakten gjennom et filterpapir.

Overfør ca. 2 ml av filtratet til et 5 ml prøveglass (prøveløsning). Oppbevar ekstrakten i kjøleskap, og foreta HPLC-analysen innen 24 timer.

- 6.2. Flytende høy-ytelseskromatografi (HPLC)

- 6.2.1. Vilkår for kromatografi

- Mobil fase: tetrahydrofuran/vann/metanol/acetonitril-blanding (4.17)
- Strømningshastighet: 1,5 ml per minutt
- Detektorbølgelengde: 280 nm

6.2.2. Kalibrering

Sprøyt inn 10 ml av hver standardløsning av konserveringsmidler (4.19). Bestem forholdet mellom topphøyden for standardløsningen av konserveringsmidler og topphøyden for den interne standarden. Tegn opp en kurve for hvert konserveringsmiddel som viser sammenhengen mellom topphøydeforholdene og konsentrasjonene av standardløsning.

6.2.3. Bestemmelse

Sprøyt 10 ml av prøveløsningen uten intern standard (6.1.1) inn i kromatografen, og registrer kromatogrammet.

Sprøyt inn 10 ml av en av stamløsningene av konserveringsmidler (4.19), og registrer kromatogrammet. Sammenlign kromatogrammene.

Dersom det i kromatogrammet for prøveekstrakten (6.1.1) ikke finnes noen topp som har tilnærmet samme retensjonstid som isopropylparaben (anbefalt intern standard), fortsett med å sprøyte inn 10 ml prøveløsning med intern standard (6.1.2). Registrer kromatogrammet, og mål toppenes høyde.

Dersom det i kromatogrammet observeres en interfererende topp med tilnærmet samme retensjonstid som isopropylparaben, bør en annen intern standard velges.

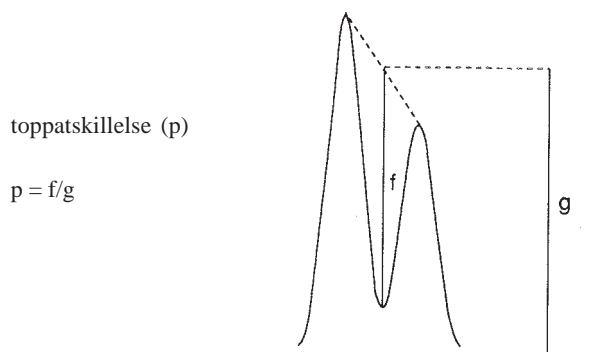
Dersom et av konserveringsmidlene som undersøkes, ikke finnes i prøvens kromatogram, kan dette konserveringsmiddelet brukes som alternativ intern standard.

Beregn forholdet mellom topphøydene for de analyserte konserveringsmidlene og topphøyden for den interne standarden.

Det må sikres at det oppnås lineær respons for standardløsningene som anvendes til kalibrering.

Det må sikres at kromatogrammene for standardløsningen og prøveløsningen oppfyller følgende krav:

- Toppatskillelsen for det dårligst skilte paret skal være minst 0,90. (Definisjonen av toppatskillelse er gitt i figur 1.)



Figur 1: Toppatskillelse