

MINISTERIE VAN SOCIALE ZAKEN,  
VOLKSGEZONDHEID EN LEEFMILIEU

N. 98 — 2474

[C - 98/22305]

**16 APRIL 1998. — Koninklijk besluit tot wijziging van het koninklijk besluit van 26 november 1981 betreffende referentieanalysemethoden die moeten worden toegepast om de samenstelling van cosmetica te controleren**

ALBERT II, Koning der Belgen,

Aan allen die nu zijn en hierna wezen zullen, Onze Groet.

Gelet op de wet van 24 januari 1977 betreffende de bescherming van de gezondheid van de verbruikers op het stuk van de voedingsmiddelen en andere producten, inzonderheid op artikel 12, gewijzigd door de wet van 22 maart 1989;

Gelet op het koninklijk besluit van 26 november 1981 betreffende referentieanalysemethoden die moeten worden toegepast om de samenstelling van cosmetica te controleren, gewijzigd door de koninklijke besluiten van 19 februari 1985, 5 november 1985, 30 juni 1986, 11 september 1987, 5 december 1990, 16 september 1991 en 1 april 1996;

Gelet op de zesde richtlijn 95/32/EG van de Commissie van 7 juli 1995 en de zevende richtlijn 96/45/EG van de Commissie van 2 juli 1996 inzake analysemethoden die moeten worden toegepast om de samenstelling van cosmetische producten te controleren;

Gelet op de wetten op de Raad van State, gecoördineerd op 12 januari 1973, inzonderheid op artikel 3, § 1, gewijzigd door de wetten van 9 augustus 1980, 16 juni 1989 en 4 juli 1989;

Gelet op de dringende noodzakelijkheid, verantwoord door de ingebrekestelling van de Commissie van 29 december 1997;

Op de voordracht van Onze Minister van Volksgezondheid en Pensioenen,

Hebben Wij besloten en besluiten Wij :

**Artikel 1.** De analysemethoden, opgenomen in de bijlage van het koninklijk besluit van 26 november 1981 betreffende referentieanalysemethoden die moeten worden toegepast om de samenstelling van cosmetica te controleren, worden met de bepalingen XXXV tot XXXVII, opgenomen in bijlage van dit besluit, aangevuld.

**Art. 2.** Onze Minister van Volksgezondheid en Pensioenen is belast met de uitvoering van dit besluit.

Gegeven te Châteauneuf-de-Grasse, 16 april 1998.

ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van Volksgezondheid en Pensioenen,  
M. COLLA

MINISTERE DES AFFAIRES SOCIALES,  
DE LA SANTE PUBLIQUE ET DE L'ENVIRONNEMENT

F. 98 — 2474

[C - 98/22305]

**16 AVRIL 1998. — Arrêté royal modifiant l'arrêté royal du 26 novembre 1981 relatif aux méthodes d'analyse de référence nécessaires au contrôle de la composition des produits cosmétiques**

ALBERT II, Roi des Belges,

A tous, présents et à venir, Salut.

Vu la loi du 24 janvier 1977 relative à la protection de la santé des consommateurs en ce qui concerne les denrées alimentaires et les autres produits, notamment l'article 12, modifié par la loi du 22 mars 1989;

Vu l'arrêté royal du 26 novembre 1981 relatif aux méthodes d'analyse de référence nécessaires au contrôle de la composition des produits cosmétiques, modifié par les arrêtés royaux des 19 février 1985, 5 novembre 1985, 30 juin 1986, 11 septembre 1987, 5 décembre 1990, 16 septembre 1991 et 1<sup>er</sup> avril 1996;

Considérant la sixième directive 95/32/CE de la Commission du 7 juillet 1995 et la septième directive 96/45/CE de la Commission du 2 juillet 1996 relatives aux méthodes d'analyse nécessaires au contrôle de la composition des produits cosmétiques;

Vu les lois sur le Conseil d'Etat, coordonnées le 12 janvier 1973, notamment l'article 3, § 1<sup>er</sup>, modifié par les lois des 9 août 1980, 16 juin 1989 et 4 juillet 1989;

Vu l'urgence, justifiée par la mise en demeure de la Commission en date du 29 décembre 1997;

Sur la proposition de Notre Ministre de la Santé publique et des Pensions,

Nous avons arrêté et arrêtons :

**Article 1<sup>er</sup>.** Les méthodes d'analyses, reprises à l'annexe de l'arrêté royal du 26 novembre 1981 relatif aux méthodes d'analyse de référence nécessaires au contrôle de la composition des produits cosmétiques, sont complétées par les dispositions XXXV à XXXVII, reprises à l'annexe du présent arrêté.

**Art. 2.** Notre Ministre de la Santé publique et des Pensions est chargé de l'exécution du présent arrêté.

Donné à Châteauneuf-de-Grasse, le 16 avril 1998.

ALBERT

Par le Roi :

Le Ministre de la Santé publique et des Pensions,  
M. COLLA

Bijlage

**XXXV. Kwalitatieve en kwantitatieve analyse van benzoëzuur, 4-hydroxybenzoëzuur, sorbinezuur, salicylzuur en propionzuur in cosmetica**

1. Doel en toepassingsgebied

Dit voorschrift beschrijft de kwalitatieve en de kwantitatieve analyse van benzoëzuur, 4-hydroxybenzoëzuur, sorbinezuur, salicylzuur en propionzuur in cosmetica. Er worden afzonderlijke methoden beschreven voor de kwalitatieve analyse van deze conserveermiddelen, voor de kwantitatieve analyse van propionzuur en voor die van 4-hydroxybenzoëzuur, salicylzuur, sorbinezuur en benzoëzuur.

2. Definitie

De volgens deze methode bepaalde gehalten aan benzoëzuur, 4-hydroxybenzoëzuur, salicylzuur, sorbinezuur en propionzuur worden uitgedrukt als massapercentage van de vrije zuren in het product.

A. Kwalitatieve analyse

1. Beginsel

Na zuur/base-extractie van de conserveermiddelen wordt het extract geanalyseerd met behulp van dunne-laagchromatografie (DLC) met derivatisering op de plaat. Afhankelijk van de resultaten wordt de identificatie bevestigd met behulp van hogedruk-vloeistofchromatografie of, in het geval van propionzuur, gaschromatografie.

## 2. Reagentia

### 2.1. Algemeen

Alle reagentia moeten van analysekwaliteit zijn. Het gebruikte water dient gedistilleerd water of water van minstens vergelijkbare zuiverheid te zijn.

### 2.2. Aceton.

### 2.3. Diëthylether.

### 2.4. Acetonitril.

### 2.5. Toluëen.

### 2.6. n-Hexaan.

### 2.7. Paraffine, vloeibaar.

### 2.8. Zoutzuur, 4 M.

### 2.9. Kaliumhydroxide, 4 M in water.

### 2.10. Calciumchloride, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

### 2.11. Lithiumcarbonaat, $\text{Li}_2\text{CO}_3$ .

### 2.12. 2-Broom-2'-acetonafon.

### 2.13. 4-Hydroxybenzoëzuur.

### 2.14. Salicylzuur.

### 2.15. Benzoëzuur.

### 2.16. Sorbinezuur.

### 2.17. Propionzuur.

### 2.18. Referentieoplossingen

Bereid oplossingen van 0,1 % (m/v) (100 mg/100 ml) van elk van de vijf conserveermiddelen (2.13 t/m 2.17) in diëthylether (2.3).

### 2.19. Derivatiseringsreagens

Een oplossing van 0,5 % (m/v) 2-broom-2'-acetonafon (2.12) in acetonitril (2.4) (50 mg/10 ml). Deze oplossing moet wekelijks vers worden bereid en in de koelkast worden bewaard.

### 2.20. Katalysatoroplossing

Een oplossing van 0,3 % (m/v) lithiumcarbonaat (2.11) in water (300 mg/100 ml). Deze oplossing moet vers worden bereid.

### 2.21. Loopvloeistof

Toluëen (2.5)/aceton (2.2) (20:0,05; v/v).

2.22. Vloeibare paraffine (2.7)/n-hexaan (2.6) (1:2, v/v).

## 3. Apparatuur

Gangbare laboratoriumuitrusting.

3.1. Waterbad, in staat de temperatuur op 60 °C te houden.

3.2. Ontwikkeltank.

3.3. UV-stralingsbron, 254 en 366 nm.

3.4. Dunne-laagplaten, kieselgel 60, zonder fluorescentie-indicator, 20 x 20 cm, laagdikte 0,25 mm met een concentreringszone van 2,5 x 20 cm (Merck 11845, of gelijkwaardig).

3.5. Injectiespuit, 10 µl.

3.6. Injectiespuit, 25 µl.

3.7. Oven, geschikt voor temperaturen tot 105 °C.

3.8. Glazen buizen met schroefdop, 50 ml.

3.9. Filtreerpapier, diameter 90 mm, Schleicher & Schüll, Weissband no. 5892, of gelijkwaardig.

3.10. Universeel pH-indicatorpapier, pH 1-11.

3.11. Glazen monsterflesjes (vials), 5 ml.

3.12. Rotatieverdamer (Rotavapor of gelijkwaardig).

3.13. Verwarmingsplaat.

## 4. Werkwijze

### 4.1. Monstervoorbereiding

Weeg in een 50 ml glazen buis met schroefdop (3.8) circa 1 g monster af. Voeg vier druppels zoutzuur 4 M (2.8) en 40 ml aceton (2.2) toe. Bij sterk alkalische producten, zoals toiletzeep, moeten 20 druppels zoutzuur 4 M worden toegevoegd. Controleer met indicatorpapier (3.10) dat de pH ongeveer 2 is. Sluit de buis en schud krachtig gedurende 1 minuut.

Om de extractie van de conserveermiddelen in de acetonfase te bevorderen, kan het mengsel zonodig voorzichtig tot circa 60 °C verwarmd worden, zodat de vetfase smelt. Koel de oplossing af tot kamertemperatuur en filtreer over een papieren filter (3.9) in een erlenmeyer.

Breng 20 ml van het filtraat over in een erlenmeyer van 200 ml, voeg 20 ml water toe en meng. Breng de pH van het mengsel met kaliumhydroxide 4 M (2.9) op ongeveer 10; gebruik indicatorpapier (3.10) om de pH te bepalen.

Voeg 1 g calciumchloride (2.10) toe en schud krachtig. Filtreer over een papieren filter (3.9) in een scheitrechter van 250 ml die 75 ml diëthylether (2.3) bevat en schud krachtig gedurende 1 minuut. Wacht tot de fasen gescheiden zijn en verzamel de waterlaag in een erlenmeyer van 250 ml. Verwerp de etherlaag. Breng op geleide van indicatorpapier de pH van de waterige oplossing door toevoeging van zoutzuur 4 M op ongeveer 2. Voeg 10 ml diëthylether toe, sluit de kolf en schud krachtig gedurende 1 minuut. Wacht tot de fasen gescheiden zijn en breng de etherlaag over in een rotatieverdamer (3.12). Verwerp de waterlaag.

Damp de etherfractie in tot deze bijna droog is en los het residu op in 1 ml diëthylether (2.3). Breng de aldus verkregen oplossing over in een monsterflesje (3.11).

### 4.2. Dunne-laagchromatografie

Breng voor elk van de te chromatografieren referentieoplossingen en monsteroplossingen op de startlijn in de concentreringszone van een DLC-plaat (3.4) met een injectiespuit (3.5) op gelijke afstanden circa 3 µl lithiumcarbonaatoplossing (2.20) op en droog de plaat in een koude luchtstroom.

Leg de DLC-plaat op een op 40 °C gebrachte verwarmingsplaat (3.13) teneinde de vlekken zo klein mogelijk te houden. Breng met een injectiespuit 10 µl van elk van de referentieoplossingen (2.18) en van de monsteroplossingen (4.1) op de startlijn van de plaat op, exact op de plaatsen waar tevoren de lithiumcarbonaatoplossing is opgebracht.

Breng tenslotte op exact dezelfde plaatsen, waar de referentieoplossingen, respectievelijk de monsteroplossingen en de lithiumcarbonaatoplossing zijn opgebracht, circa 15 µl derivatiseringsreagens (2.19) (oplossing van 2-broom-2'-acetonafon) op.

Verwarm de DLC-plaat gedurende 45 minuten in een oven (3.7) op 80 °C. Laat de plaat afkoelen en plaats hem in een ontwikkeltank (3.2) met loopvloeistof (2.21) (tolueen/aceton), die gedurende 15 minuten geconditioneerd is (zonder filtreerpapierbekleding). Ontwikkel de plaat tot het vloeistoffront een afstand van 15 cm heeft afgelegd (dit duurt circa 80 minuten).

Droog de plaat in een koude luchtstroom en bekijk de verkregen vlekken onder UV-licht (3.3). Om de fluorescentie van de zwakke vlekken te verbeteren kan de DLC-plaat in vloeibare paraffine/n-hexaan (2.22) worden gedompeld.

#### 5. Identificatie

Bereken de Rf-waarde van de verkregen vlekken.

Vergelijk de Rf-waarde en het gedrag onder UV-bestraling van het monster met de resultaten van de referentieoplossingen.

Trek een voorlopige conclusie omtrent de identiteit van de aanwezige conserveermiddelen. Verricht de in deel B beschreven HPLC-analyse of, indien propionzuur aanwezig lijkt, de in deel C beschreven GC-analyse. Vergelijk de voor het monster verkregen retentietijden met die van de referentieoplossingen.

Bepaal aan de hand van de gecombineerde resultaten van DLC en HPLC of GC welke conserveermiddelen in het monster aanwezig waren.

#### B. Kwantitatieve analyse van benzoëzuur, 4-hydroxybenzoëzuur, sorbinezuur en salicylzuur

##### 1. Beginsel

Het monster wordt na aanzuren geëxtraheerd met een mengsel van ethanol en water. Na filtratie worden de conserveermiddelen kwantitatief bepaald met behulp van hogedruk-vloeistof-chromatografie (HPLC).

##### 2. Reagentia

2.1. Alle reagentia moeten van analysekwaliteit en waar van toepassing geschikt voor HPLC zijn. Het gebruikte water dient gedistilleerd water of water van minstens vergelijkbare zuiverheid te zijn.

2.2. Ethanol, absoluut.

2.3. 4-Hydroxybenzoëzuur.

2.4. Salicylzuur.

2.5. Benzoëzuur.

2.6. Sorbinezuur.

2.7. Natriumacetaat ( $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ).

2.8. Azijnzuur,  $d_4^{20} = 1,05 \text{ g/ml}$ .

2.9. Acetonitril.

2.10. Zwavelzuur, 2 M.

2.11. Kaliumhydroxide, 0,2 M in water.

2.12. 2-Methoxybenzoëzuur.

2.13. Ethanol/watermengsel

Meng negen volumedelen ethanol (2.2) met één volumedeel water (2.1)

2.14. Interne-standaardoplossing

Bereid een oplossing van circa 1 g 2-methoxybenzoëzuur (2.12) in 500 ml ethanol/watermengsel (2.13)

2.15. Mobiele fase voor HPLC

2.15.1. Acetaatbuffer : voeg aan 1 liter water 6,35 g natriumacetaat (2.7) en 20 ml azijnzuur (2.8) toe.

2.15.2. Bereid de mobiele fase door negen volumedelen acetaatbuffer (2.15.1) te mengen met één volumedeel acetonitril (2.9).

2.16. Stamoplossing conserveermiddelen

Weeg in een maatkolf van 50 ml ongeveer 0,05 g 4-hydroxybenzoëzuur (2.3), 0,2 g salicylzuur (2.4), 0,2 g benzoëzuur (2.5) en 0,05 g sorbinezuur (2.6) nauwkeurig af en vul aan met ethanol/watermengsel (2.13). Bewaar de oplossing in de koelkast. Deze oplossing is een week houdbaar.

2.17. Standaardoplossingen conserveermiddelen

Breng respectievelijk 8, 4, 2, 1 en 0,5 ml van de stamoplossing (2.16) over in maatkolven van 20 ml. Voeg telkens 10 ml interne-standaardoplossing (2.14) en 0,5 ml zwavelzuur 2 M (2.10) toe. Vul aan met ethanol/watermengsel (2.13). Deze oplossingen moeten vers worden bereid.

#### 3. Apparatuur

Gangbare laboratoriumuitrusting, alsmede

3.1. Waterbad, 60 °C.

3.2. Hogedruk-vloeistofchromatograaf, voorzien van een variabele golfengete UV-detector en een injectielus van 10 µl.

3.3. Analytische kolom

Roestvrij staal, lengte 12,5-25 cm, inwendige diameter 5,6 mm, gepakt met Nucleosil 5C18, of gelijkwaardig.

3.4. Filtreerpapier, diameter 90 mm, Schleicher & Schüll, Weissband no. 5892, of gelijkwaardig.

3.5. Glazen buizen met schroefdop, 50 ml.

3.6. Glazen monsterflesjes (vials), 5 ml.

3.7. Kooksteentjes, carborundum, afmeting 2-4 mm, of gelijkwaardig.

#### 4. Werkwijze

##### 4.1. Monstervoorbereiding

4.1.1. Monstervoorbereiding zonder toevoeging van de interne standaard.

Weeg in een 50 ml glazen buis met schroefdop (3.5) 1 g van het monster af. Pipetteer 1 ml zwavelzuur 2 M (2.10) en vervolgens 40 ml ethanol/watermengsel (2.13) in de buis. Voeg circa 1 g kooksteentjes (3.7) toe, sluit de buis en schud krachtig gedurende ten minste 1 minuut tot een homogene suspensie is verkregen. Plaats de buis gedurende precies 5 minuten in een waterbad (3.1) op 60 °C om de extractie van de conserveermiddelen naar de ethanolfase te bevorderen.

Koel de buis hierna onmiddellijk onder koud stromend water en laat het extract gedurende 1 uur bij 5 °C staan.

Filtreer het extract over een papieren filter (3.4). Breng circa 2 ml van het filtraat over in een monsterflesje (3.6). Bewaar het extract bij 5 °C en voer de HPLC-bepaling binnen 24 uur na de bereiding van het extract uit.

4.1.2. Monstervoorbereiding met toevoeging van de interne standaard.

Weeg in een 50 ml glazen buis met schroefdop  $1 \pm 0,1$  g monster op drie cijfers na de komma af (= a g). Pipetteer 1 ml zwavelzuur 2 M (2.10) en vervolgens 30 ml ethanol/watermengsel (2.13) in de buis. Voeg circa 1 g kooksteentjes (3.7) en 10 ml interne-standaardoplossing (2.14) toe. Sluit de buis en schud krachtig gedurende tenminste 1 minuut tot een homogene suspensie is verkregen. Plaats de buis gedurende precies 5 minuten in een waterbad op  $60^\circ\text{C}$  (3.1) om de extractie van de conserveermiddelen naar de ethanolfase te bevorderen. Koel de buis hierna onmiddellijk onder koud stromend water en laat het extract gedurende 1 uur bij  $5^\circ\text{C}$  staan.

Filtreer het extract over een papieren filter (3.4). Breng circa 2 ml van het filtraat over in een monsterflesje (3.6). Bewaar het filtraat bij  $5^\circ\text{C}$  en voer de HPLC-bepaling binnen 24 uur na de bereiding van het extract uit.

#### 4.2. HPLC

Mobiele fase : acetonitril/acetaatbuffer (2.15).

Stel het debiet van de mobiele fase door de kolom in op  $2 \pm 0,5$  ml/minuut. Stel de detectorgolflengte in op 240 nm.

##### 4.2.1. Ijklijn

Injecteer achtereenvolgens  $10\ \mu\text{l}$  van elk van de standaard-conserveermiddeloplossingen (2.17) in de vloeistofchromatograaf (3.2). Bepaal in de verkregen chromatogrammen de verhouding tussen de piekhoogtes van de onderzochte conserveermiddelen en die van de interne standaard. Maak voor elk conserveermiddel een ijklijn door de aldus bepaalde verhoudingen uit te zetten tegen de concentratie van het conserveermiddel in de respectieve standaardoplossingen.

Controleer dat hierbij een lineaire afhankelijkheid wordt verkregen.

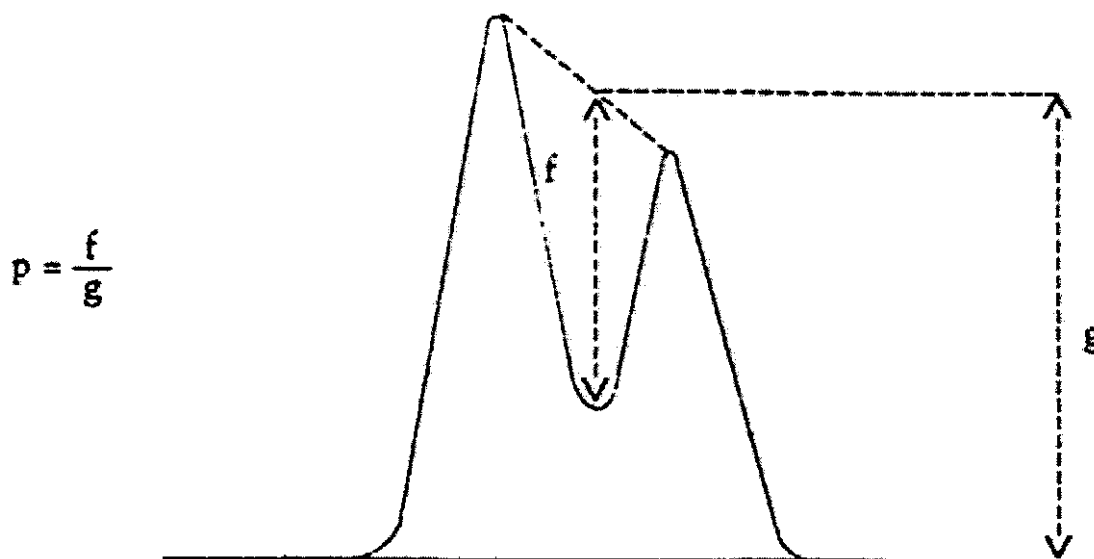
##### 4.2.2. Bepaling

Injecteer  $10\ \mu\text{l}$  van het geëxtraheerde monster (4.1.1) in de vloeistofchromatograaf en neem het chromatogram op. Injecteer  $10\ \mu\text{l}$  van één van de standaardoplossingen conserveermiddelen (2.17) en neem het chromatogram op. Vergelijk de beide chromatogrammen. Als er in het chromatogram van het monster (4.1.1) geen pieken aanwezig zijn met ongeveer dezelfde retentietijd als 2-methoxybenzoëzuur (aanbevolen interne standaard), injecteer dan  $10\ \mu\text{l}$  van het extract met toegevoegde interne standaard (4.1.2) in de vloeistofchromatograaf en neem het chromatogram op.

Indien in het chromatogram van het monster (4.1.1) een piek optreedt met dezelfde retentietijd als 2-methoxybenzoëzuur, moet een andere geschikte interne standaard gekozen worden (indien één van de onderzochte conserveermiddelen niet in het chromatogram verschijnt, kan dit conserveermiddel als interne standaard gebruikt worden).

Ga na dat de met de standaardoplossingen en de monsteroplossing verkregen chromatogrammen aan de volgende voorwaarden voldoen :

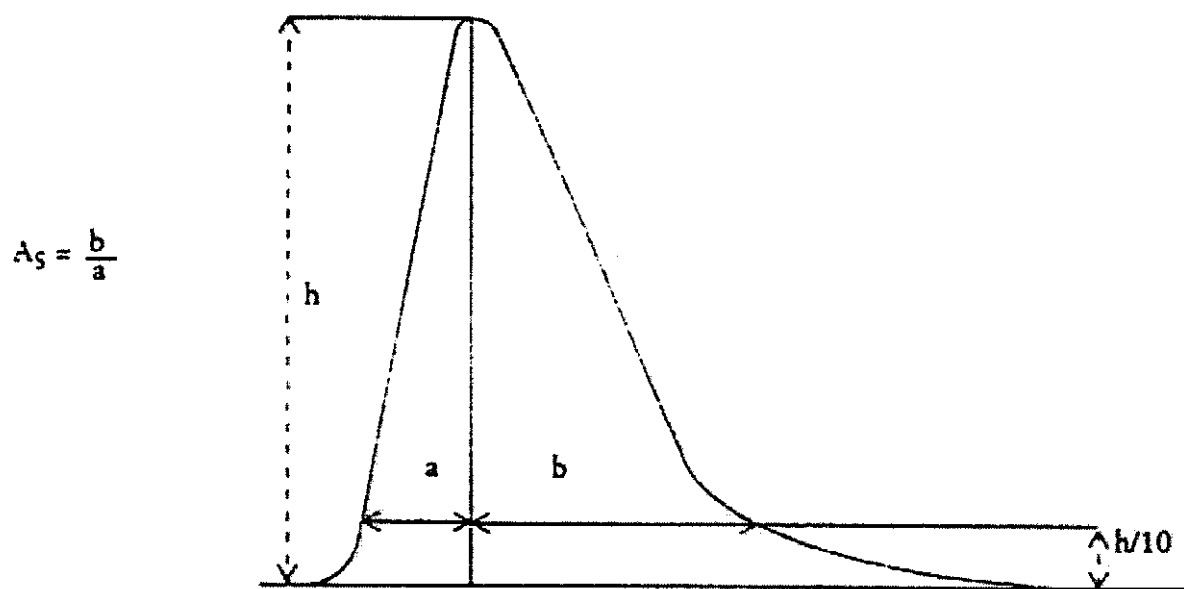
- de piekscheiding van het slechts gescheiden paar moet ten minste 0,90 zijn (voor een definitie van de piekscheiding zie figuur 1);



Figuur 1: piekscheiding

Indien de vereiste scheiding niet wordt verkregen, moet een efficiëntere kolom worden gebruikt of moet de samenstelling van de mobiele fase worden aangepast tot dit wel het geval is.

- de asymmetriefactor  $A_s$  van alle verkregen pieken moet tussen 0,9 en 1,5 liggen (voor een definitie van de piekasymmetriefactor zie figuur 2). Voor het bepalen van de asymmetriefactor wordt aanbevolen het chromatogram met een papersnelheid van minimaal 2 cm/minuut op te nemen;



Figuur 2: piekasymmetriefactor

- er moet een vlakke basislijn worden verkregen.

#### 5. Berekening

Bepaal met behulp van de ijkgrafiek de concentratie van de conserveermiddelen in het monster uit de verhoudingen van de piekhoogtes van de onderzochte conserveermiddelen tot die van 2-methoxybenzoëzuur (interne standaard). Bereken het gehalte aan benzoëzuur, 4-hydroxy-benzoëzuur, sorbinezuur of salicylzuur in het monster in massaprocenten ( $x_i$ ) met de volgende formule :

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

$b$  = concentratie ( $\mu\text{g/ml}$ ) van het conserveermiddel in het monsterextract (4.1.2), zoals afgelezen uit de ijkgrafiek;

$a$  = monsterinweeg (g) (4.1.2).

#### 6. Herhaalbaarheid (1)

Bij een gehalte aan 4-hydroxybenzoëzuur van 0,40 % mag de absolute waarde van het verschil tussen de resultaten van twee parallel aan hetzelfde monster uitgevoerde bepalingen niet meer dan 0,035 % bedragen.

Bij een gehalte aan benzoëzuur van 0,50 % mag de absolute waarde van het verschil tussen de resultaten van twee parallel aan hetzelfde monster uitgevoerde bepalingen niet meer dan 0,050 % bedragen.

Bij een gehalte aan salicylzuur van 0,50 % mag de absolute waarde van het verschil tussen de resultaten van twee parallel aan hetzelfde monster uitgevoerde bepalingen niet meer dan 0,045 % bedragen.

Bij een gehalte aan sorbinezuur van 0,60 % mag de absolute waarde van het verschil tussen de resultaten van twee parallel aan hetzelfde monster uitgevoerde bepalingen niet meer dan 0,035 % bedragen.

#### 7. Opmerkingen

7.1. Uit een op de methode uitgevoerde robuustheidstest is gebleken dat de bij de extractie van de zuren uit het monster gebruikte hoeveelheid zwavelzuur kritiek is; tevens moeten de voor de op te werken hoeveelheid monster aangegeven grenzen nauwgezet worden aangehouden.

7.2 Desgewenst kan een geschikte guardkolom gebruikt worden.

#### C. Kwantitatieve analyse van propionzuur

##### 1. Doel en toepassingsgebied

Deze methode beschrijft de kwantitatieve analyse van propionzuur tot een maximumconcentratie van 2 % (m/m) in cosmetica.

## 2. Definitie

De volgens deze methode bepaalde propionzuurconcentratie wordt uitgedrukt als massapercentage (% m/m) van het product.

## 3. Beginsel

Na extractie van het propionzuur uit het product wordt het gehalte bepaald met behulp van gaschromatografie (GC) met 2-methylpropionzuur als interne standaard.

## 4. Reagentia

Alle reagentia moeten van analysekwaliteit zijn. Het gebruikte water dient gedistilleerd water of water van gelijkwaardige kwaliteit te zijn.

## 4.1. Ethanol 96 % (v/v).

## 4.2. Propionzuur.

## 4.3. 2-Methylpropionzuur.

## 4.4. Orthofosforzuur, 10 % (m/v).

## 4.5. Propionzuuroplossing

Weeg in een maatkolf van 50 ml circa 1 g propionzuur nauwkeurig af (= p g) en vul aan met ethanol (4.1).

## 4.6. Interne-standaardoplossing

Weeg in een maatkolf van 50 ml circa 1 g 2-methylpropionzuur nauwkeurig af (= e g) en vul aan met ethanol (4.1).

## 5. Apparatuur

Gangbare laboratoriumuitrusting, alsmede

## 5.1. Gaschromatograaf met vlamionisatiedetector.

## 5.2. Glazen buis (20 % x 150 mm) met schroefdoop.

## 5.3. Waterbad, 60°C.

## 5.4. Glazen injectiespuit, 10 ml, met membraanfilter (porindiameter 0,45 µm).

## 6. Werkwijze

## 6.1. Monstervoorbereiding

## 6.1.1. Monstervoorbereiding zonder interne standaard

Weeg in een glazen buis (5.2) circa 1 g monster af. Voeg 0,5 ml orthofosforzuur (4.4) en 9,5 ml ethanol (4.1) toe. Sluit de buis en schud krachtig. Plaats de buis zonodig gedurende 5 minuten in een waterbad op 60 °C (5.3) om de vetfase volledig op te lossen. Koel snel af onder stromend water.

Filtreer een deel van de oplossing over een membraanfilter (5.4). Chromatografeer het filtraat nog dezelfde dag.

## 6.1.2. Monstervoorbereiding met interne standaard

Weeg in een glazen buis (5.2)  $1 \pm 0,1$  g monster tot op drie cijfers achter de komma af (= a g). Voeg 0,5 ml orthofosforzuur (4.4), 0,5 ml interne-standaardoplossing (4.6) en 9 ml ethanol (4.1) toe. Sluit de buis en schud krachtig. Plaats de buis zonodig gedurende 5 minuten in een waterbad op 60 °C (5.3) om de vetfase op te lossen. Koel snel af onder stromend water.

Filtreer een deel van de oplossing over een membraanfilter (5.4). Chromatografeer het filtraat nog dezelfde dag.

## 6.2. Conditie voor gaschromatografie

De volgende condities worden aanbevolen :

*Kolom*

Materiaal	roestvrij staal
Lengte	2 m
Diameter	1/8"
Vulling	10 % P <sup>TM</sup> 1000 (of gelijkwaardig) + 1 % H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , op Chromosorb WAW 100-120 mesh

*Temperatuur*

Injector 200 °C

Kolom 120 °C

Detector 200 °C

*Dragergas*

Stikstof

Debiet 25 ml/min.

## 6.3. Chromatografie

## 6.3.1. Ijklijn

Pipetteer in maatkolven van 20 ml respectievelijk 0,25, 0,5, 1, 2 en 4 ml propionzuuroplossing (4.5). Pipetteer in elke maatkolf 1 ml interne standaardoplossing (4.6), vul aan met ethanol (4.1) en meng. De aldus verkregen oplossingen bevatten e mg/ml 2-methylpropionzuur als interne standaard (d.w.z. 1 mg/ml als e = 1,000) en p/4, p/2, p, 2p en 4p mg/ml propionzuur (d.w.z. 0,25, 0,5, 1, 2 en 4 mg/ml als p = 1,000).

Injecteer achtereenvolgens 1 µl van elk van deze oplossingen in de gaschromatograaf en construeer de ijklijn door de verhouding van de piekoppervlaktes van propionzuur en 2-methylpropionzuur uit te zetten tegen de overeenkomstige massaverhouding.

Injecteer elke oplossing drie maal en bereken de gemiddelde verhouding van de piekoppervlakten.

## 6.3.2. Bepaling

Injecteer 1 µl van het volgens 6.1.1 verkregen filtraat. Vergelijk het chromatogram met dat van één van de standaardoplossingen (6.3.1). Als er een piek aanwezig is met ongeveer dezelfde retentietijd als 2-methylpropionzuur moet een andere interne standaard gekozen worden. Injecteer als er geen interferentie is 1 µl van het volgens 6.1.2 bereide filtraat en bepaal de oppervlakten van de propionzuurpiek en de piek van de interne standaard.

Injecteer elke oplossing drie maal en bereken de gemiddelde verhouding van de piekoppervlakten.

## 7. Berekening

7.1. Lees uit de in 6.3.1 verkregen ijkgrafiek de massaverhouding (K) af die overeenkomt met de volgens 6.3.2 berekende verhouding van de piekoppervlakten.

7.2. Bereken uit de aldus verkregen massaverhouding het propionzuurgehalte van het monster (X) als massapercentage met behulp van de volgende formule :

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

waarbij

K = de in 7.1 gevonden verhouding;

a = massa (g) afgewogen van de interne standaard (4.6);

e = massa (g) van het ingewogen monster (6.1.2).

Rond de resultaten af tot op één cijfer na de komma.

8. Herhaalbaarheid (1)

Bij een propionzuurgehalte van 2 % (m/m) mag het verschil tussen de resultaten van twee parallel aan hetzelfde monster uitgevoerde bepalingen niet meer dan 0,12 % bedragen.

### XXXVI. Kwalitatieve en kwantitatieve analyse van hydrochinon, hydrochinonmonomethylether, hydrochinonmonoëthylether en hydrochinonmonobenzylether in cosmetica

#### A. Identificatie

##### 1. Doel en toepassingsgebied

Deze methode beschrijft de kwalitatieve analyse van hydrochinon, hydrochinonmonomethylether, hydrochinonmonoëthylether en hydrochinonmonobenzylether (monobenzon) in huidbleekmiddelen.

##### 2. Beginsel

Hydrochinon en de ethers daarvan worden aangetoond met behulp van dunne-laagchromatografie (DLC).

##### 3. Reagentia

Alle reagentia moeten van analysekwaliteit zijn.

3.1. Ethanol, 96 % (v/v).

3.2. Chloroform.

3.3. Diëthylether.

3.4. Loopvloeistof

Chloroform/diëthylether, 66:33 (v/v).

3.5. Ammonia, 25 % (m/m) ( $d_4^{20} = 0,91$  g/ml).

3.6. Ascorbinezuur.

3.7. Hydrochinon.

3.8. Hydrochinonmonomethylether.

3.9. Hydrochinonmonoëthylether.

3.10. Hydrochinonmonobenzylether (monobenzon).

3.11. Referentieoplossingen

Onderstaande referentieoplossingen moeten vers worden bereid en zijn gedurende één dag houdbaar.

3.11.1. Weeg 0,05 g hydrochinon (3.7) af in een reageerbuis van 10 ml met maatverdeling. Voeg 0,250 g ascorbinezuur (3.6) en 5 ml ethanol (3.1) toe. Voeg ammonia (3.5) toe tot de pH 10 is en vul aan met ethanol (3.1) tot een volume van 10 ml.

3.11.2. Weeg 0,05 g hydrochinonmonomethylether (3.8) af in een reageerbuis van 10 ml met maatverdeling. Voeg 0,250 g ascorbinezuur (3.6) en 5 ml ethanol (3.1) toe. Voeg ammonia (3.5) toe tot de pH 10 is en vul aan met ethanol (3.1) tot een volume van 10 ml.

3.11.3. Weeg 0,05 g hydrochinonmonoëthylether (3.9) af in een reageerbuis van 10 ml met maatverdeling. Voeg 0,250 g ascorbinezuur (3.6) en 5 ml ethanol (3.1) toe. Voeg ammonia (3.5) toe tot de pH 10 is en vul aan met ethanol (3.1) tot een volume van 10 ml.

3.11.4. Weeg 0,05 g hydrochinonmonobenzylether (3.10) af in een reageerbuis van 10 ml met maatverdeling. Voeg 0,250 g ascorbinezuur (3.6) en 5 ml ethanol (3.1) toe. Voeg ammonia (3.5) toe tot de pH 10 is en vul aan met ethanol (3.1) tot een volume van 10 ml.

3.12. Zilvernitraat.

3.13. 12-Molybdfosforzuur.

3.14. Kaliumferrocyanide-hexahydraat.

3.15. Ferrichloride-hexahydraat.

3.16. Sporeireagentia

3.16.1. Voeg aan een 5 % (m/v) oplossing van zilvernitraat (3.12) in water ammonia (3.5) toe tot het gevormde neerslag weer oplost.

Waarschuwing :

De oplossing kan na verloop van tijd ontleden en explosief worden en moet daarom na gebruik worden weggegooid.

3.16.2. 10 % (m/v) oplossing van 12-molybdfosforzuur (3.13) in ethanol (3.1).

3.16.3. Bereid een 1 % (m/v) oplossing van kaliumferrocyanide (3.14) in water en een 2 % (m/v) oplossing van ferrichloride (3.15) in water. Meng vlak voor het gebruik gelijke delen van beide oplossingen.

(1) Volgens ISO 5725.

## 4. Apparatuur

Gangbare laboratoriumuitrusting, alsmede

4.1. Gebruikelijke DLC-uitrusting.

4.2. DLC-platen, gebruiksklaar : silicagel GHR/UV<sub>254</sub>, 20 cm x 20 cm (Machery-Nagel of gelijkwaardig), laagdikte 0,25 mm.

4.3. Ultrasoonbad.

4.4. Centrifuge.

4.5. UV-lamp, 254 nm.

5. Werkwijze

5.1. Monstervoorbereiding

Weeg 3 g monster af in een reageerbuis van 10 ml met maatverdeling. Voeg 0,250 g ascorbinezuur (3.6) en 5 ml ethanol (3.1) toe. Breng de oplossing met ammonia (3.5) op een pH van 10. Vul aan met ethanol (3.1) tot 10 ml. Sluit de buis met een stop en homogeeniseer gedurende 10 minuten in een ultrasoonbad. Filtreer over een papieren filter of centrifugeer bij 3 000 toeren/min.

5.2. Dunne-laagchromatografie

5.2.1. Verzadig een chromatografiebak met loopvloeistof (3.4).

5.2.2. Breng op een plaat 2 µl van elk van de referentieoplossingen (3.11) en 2 µl monsteroplossing (5.1) op. Ontwikkel de plaat bij kamertemperatuur in het donker, totdat het vloeistoffront een afstand van 15 cm heeft afgelegd.

5.2.3. Neem de plaat uit de bak en laat hem bij kamertemperatuur drogen.

5.3. Detectie

5.3.1. Inspecteer de plaat onder UV-licht van 254 nm en markeer de plaats van de vlekken.

5.3.2. Besproei de plaat met

- zilvernitraatreagens (3.16.1), of

- 12-molybdofosforzuurreagens (3.16.2) en verwarm tot circa 120 °C, of

- kaliumferrocyanideoplossing en ferrichlorideoplossing (3.16.3).

6. Identificatie

Bereken de Rf-waarde van de verschillende vlekken.

Vergelijk de met de monsteroplossing verkregen vlekken met die van de referentieoplossingen daarbij lettend op de Rf-waarden, de kleur van de vlekken onder UV-bestraling en de kleur na zichtbaar maken met sproeireagens.

Voer de in het volgende onderdeel (B) beschreven HPLC-bepaling uit en vergelijk de met het monster verkregen retentietijden met die van de referentieoplossingen.

Bepaal aan de hand van de gecombineerde resultaten van DLC en HPLC of hydrochinon en/of ethers daarvan aanwezig zijn.

7. Opmerkingen

Onder de beschreven omstandigheden werden de volgende Rf-waarden verkregen :

hydrochinon	0,32
hydrochinonmonomethylether	0,53
hydrochinonmonoëthylether	0,55
hydrochinonmonobenzylether	0,58

## B. Kwantitatieve analyse

1. Doel en toepassingsgebied

Deze methode beschrijft een werkwijze voor de kwantitatieve analyse van hydrochinon, hydrochinonmonomethylether, hydrochinonmonoëthylether en hydrochinonmonobenzylether in huidbleekmiddelen.

2. Beginsel

Het monster wordt met een water/methanolmengsel geëxtraheerd, onder voorzichtig verwarmen om eventuele vetten te doen smelten. De kwantitatieve analyse van de te bepalen stoffen in de verkregen oplossing wordt uitgevoerd met behulp van reversed phase vloeistofchromatografie met UV-detectie.

3. Reagentia

3.1. Alle reagentia moeten van analysekwaliteit zijn. Het gebruikte water dient gedistilleerd water of water van minstens gelijkwaardige zuiverheid te zijn.

3.2. Methanol.

3.3. Hydrochinon.

3.4. Hydrochinonmonomethylether.

3.5. Hydrochinonmonoëthylether.

3.6. Hydrochinonmonobenzylether (monobenzon).

3.7. Tetrahydrofuran, geschikt voor HPLC.

3.8. Water/methanolmengsel 1:1 (v/v). Meng één volumedeel water met één volumedeel methanol (3.2).

3.9. Mobiele fase : tetrahydrofuran/watermengsel 45:55 (v/v). Meng 45 volumedelen tetrahydrofuran (3.7) met 55 volumedelen water.

3.10. Standaardoplossing

Weeg in een maatkolf van 50 ml 0,06 g hydrochinon (3.3), 0,08 g hydrochinonmonomethylether (3.4), 0,1 g hydrochinonmonoëthylether (3.5) en 0,12 g hydrochinonmonobenzylether (3.6) af. Los op en vul aan met methanol (3.2). Bereid de standaardoplossing door 10 ml van deze oplossing met water/methanolmengsel (3.8) tot 50 ml te verdunnen. Deze oplossingen moeten vers worden bereid.

4. Apparatuur

Gangbare laboratoriumuitrusting, alsmede

4.1. Waterbad, in staat de temperatuur op 60 °C te houden.

4.2. Hogedruk-vloeistofchromatograaf, voorzien van een UV-detector met variabele golflengte en een injectielus van 10 µl.



## 4.3. Analytische kolom

Roestvrijstalen chromatografiekolom, lengte 250 mm, inwendige diameter 4,6 mm, gepakt met Zorbax phenyl (chemisch gebonden fenethylsilaan op Zorbax SIL, end-capped met trimethylchloorsilaan), deeltjesgrootte 6 µm, of gelijkwaardig. Gebruik geen guardkolom, behalve een fenylguard, of gelijkwaardig.

4.4. Filtreerpapier, diameter 90 mm, Schleicher & Schüll, Weissband No. 5892, of gelijkwaardig.

## 5. Werkwijze

## 5.1. Monstervoorbereiding

Weeg in een maatkolf van 50 ml  $1 \pm 0,1$  g monster tot op drie cijfers achter de komma af (= a g). Dispergeer het monster in 25 ml water/methanolmengsel (3.8). Sluit de kolf en schud krachtig tot een homogene suspensie is verkregen. Schud ten minste 1 minuut. Plaats de kolf in een waterbad (4.1) bij 60 °C om de extractie te bevorderen. Koel de kolf en vul aan met water/methanolmengsel (3.8). Filtreer het extract over een papieren filter (4.4). Voer de HPLC-bepaling binnen 24 uur na bereiding van het extract uit.

## 5.2. HPLC

5.2.1. Stel het debiet van de mobiele fase (3.9) op 1 ml/min. en de detectorgolfenlengte op 295 nm in.

5.2.2. Injecteer 10 µl van de volgens 5.1 verkregen monsteroplossing en neem het chromatogram op. Bepaal de oppervlakten van de pieken. Voer een ijking uit als beschreven in 5.2.3. Vergelijk de chromatogrammen van het monster en de standaardoplossingen. Bepaal aan de hand van de piekoppervlakten en de responsiefactoren (RF), berekend als aangegeven in 5.2.3, de concentratie van de te analyseren stoffen in de monsteroplossing.

## 5.2.3. Ijking

Injecteer 10 µl standaardoplossing (3.10) en neem het chromatogram op. Herhaal de meting enige malen, totdat een constante piekoppervlakte wordt verkregen.

Bepaal de responsiefactor RF :

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

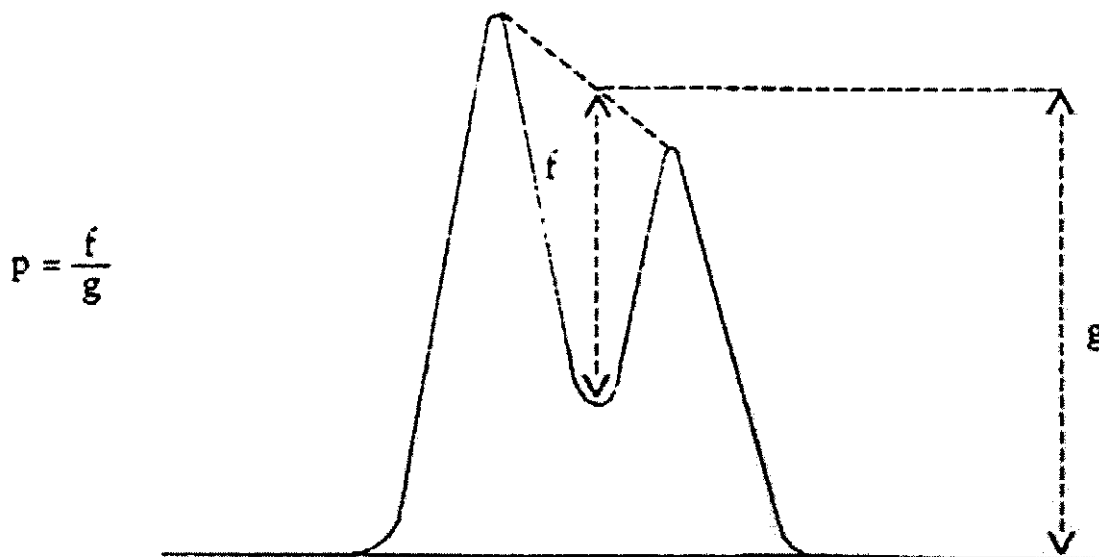
waarbij

$P_i$  = piekoppervlakte van respectievelijk hydrochinon, hydrochinonmonomethylether, hydrochinonmonoëthylether en hydrochinonmonobenzylether;

$c_i$  = concentratie (in g/50 ml) van respectievelijk hydrochinon, hydrochinonmonomethylether, hydrochinonmonoëthylether en hydrochinonmonobenzylether in de standaardoplossing (3.10);

Ga na dat de met de standaardoplossing en de monsteroplossing verkregen chromatogrammen aan de volgende voorwaarden voldoen :

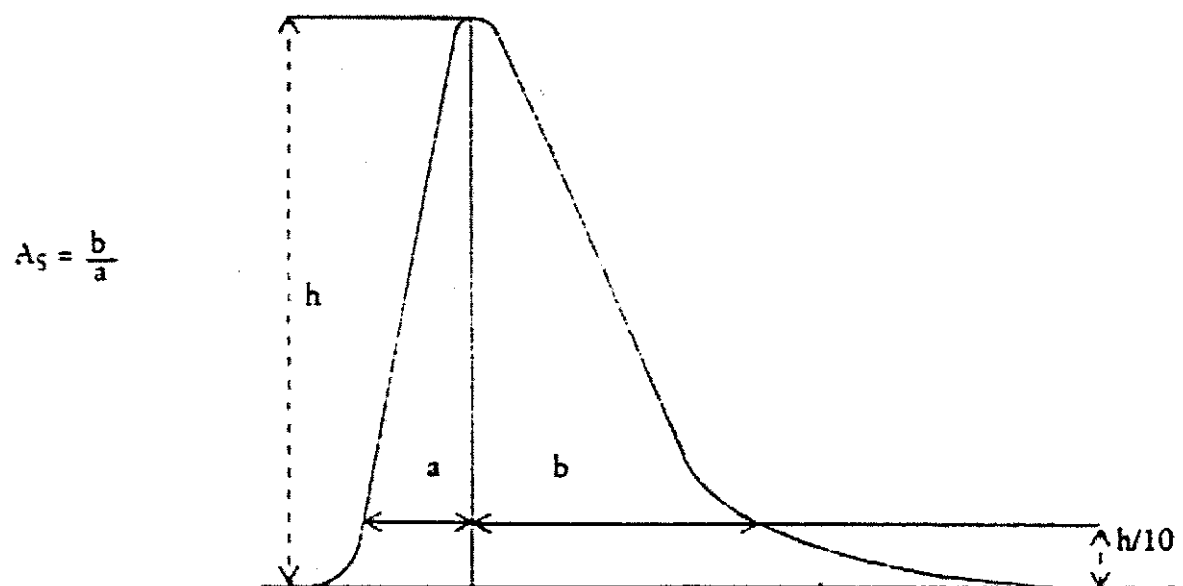
- de piekscheiding van het slechtst gescheiden paar moet minimaal 0,90 zijn (voor een definitie van de piekscheiding zie figuur 1);



Figuur 1: piekscheiding

Indien de vereiste scheiding niet wordt verkregen, moet een efficiëntere kolom worden gebruikt of moet de samenstelling van de mobiele fase worden aangepast tot dit wel het geval is.

- de asymmetriefactor  $A_s$  van alle verkregen pieken moet tussen 0,9 en 1,5 liggen (voor een definitie van de piekasymmetriefactor zie figuur 2). Voor het bepalen van de asymmetriefactor wordt aanbevolen het chromatogram met een papersnelheid van minimaal 2 cm/minuut op te nemen;



Figuur 2: piekasymmetriefactor

- er moet een vlakke basislijn worden verkregen.

#### 6. Berekening

Bereken aan de hand van de piekoppervlakten de concentratie(s) van de te bepalen stof(fen) in het monster. Bereken de concentratie ( $x_i$ ) als massapercentage met de formule

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

waarbij

a = massa (g) van het ingewogen monster;

$b_i$  = piekoppervlakte van component i van het monster.

#### 7. Herhaalbaarheid (1)

7.1. Bij een gehalte aan hydrochinon van 2 % mag de absolute waarde van het verschil tussen de resultaten van twee parallel aan hetzelfde monster uitgevoerde bepalingen niet meer dan 0,13 % bedragen.

7.2. Bij een gehalte aan hydrochinonmonomethylether van 1 % mag de absolute waarde van het verschil tussen de resultaten van twee parallel aan hetzelfde monster uitgevoerde bepalingen niet meer dan 0,1 % bedragen.

7.3. Bij een gehalte aan hydrochinonmonoëthylether van 1 % mag de absolute waarde van het verschil tussen de resultaten van twee parallel aan hetzelfde monster uitgevoerde bepalingen niet meer dan 0,11 % bedragen.

7.4. Bij een gehalte aan hydrochinonmonobenzylether van 1 % mag de absolute waarde van het verschil tussen de resultaten van twee parallel aan hetzelfde monster uitgevoerde bepalingen niet meer dan 0,11 % bedragen.

#### 8. Reproduceerbaarheid (1)

8.1. Bij een gehalte aan hydrochinon van 2 % mag de absolute waarde van het verschil tussen de resultaten van twee onder verschillende omstandigheden (verschillende laboratoria, verschillende analisten, verschillende apparatuur en/of verschillende tijdstippen) aan hetzelfde monster uitgevoerde bepalingen niet meer dan 0,37 % bedragen.

8.2. Bij een gehalte aan hydrochinonmonomethylether van 1 % mag de absolute waarde van het verschil tussen de resultaten van twee onder verschillende omstandigheden (verschillende laboratoria, verschillende analisten, verschillende apparatuur en/of verschillende tijdstippen) aan hetzelfde monster uitgevoerde bepalingen niet meer dan 0,21 % bedragen.

(1) Volgens ISO 5725.

8.3. Bij een gehalte aan hydrochinonmonoëthylether van 1,0 % mag de absolute waarde van het verschil tussen de resultaten van twee onder verschillende omstandigheden (verschillende laboratoria, verschillende analisten, verschillende apparatuur en/of verschillende tijdstippen) aan hetzelfde monster uitgevoerde bepalingen niet meer dan 0,19 % bedragen.

8.4. Bij een gehalte aan hydrochinonmonobenzylether van 1 % mag de absolute waarde van het verschil tussen de resultaten van twee onder verschillende omstandigheden (verschillende laboratoria, verschillende analisten, verschillende apparatuur en/of verschillende tijdstippen) aan hetzelfde monster uitgevoerde bepalingen niet meer dan 0,11 % bedragen.

### 9. Opmerkingen

9.1. Wanneer een hydrochinongehalte van aanzienlijk meer dan 2 % wordt gevonden en een nauwkeurige gehaltebepaling vereist is, dient het monsterextract (5.1) te worden verdund tot de concentratie ongeveer zodanig is als met een monster dat 2 % hydrochinon bevat, zou worden verkregen, waarna de bepaling wordt herhaald.

(Bij sommige apparatuur kan de extinctie bij hoge hydrochinonconcentraties buiten het lineaire gebied van de detector uitvallen).

### 9.2 Storingen

Met de hierboven beschreven methode kunnen hydrochinon en de ethers daarvan in een enkele isocratische analyse worden bepaald. Door het gebruik van een fenylkolom wordt een voldoende retentie voor hydrochinon verkregen, hetgeen niet kan worden gegarandeerd wanneer een C18-kolom met de beschreven mobiele fase wordt gebruikt.

Deze methode is echter gevoelig voor storing door een aantal parabenen. Treedt een dergelijke storing op, dan moet de bepaling herhaald worden met een andere mobiele fase/stationaire fasesysteem. Geschikte methoden staan beschreven in de referenties (1) en (2) namelijk,

kolom : Zorbax ODS, 4,6 mm x 25 cm, of gelijkwaardig

temperatuur : 36 °C

debiet : 1,5 ml/min.

mobiele fase :

voor hydrochinon : methanol/water 5:95 (v/v)

voor hydrochinonmonomethylether : methanol/water 30:70 (v/v)

voor hydrochinonmonobenzylether : methanol/water 80:20 (v/v)

kolom : Spherisorb S5-ODS, of gelijkwaardig

mobiele fase : water/methanol 90:10 (v/v)

debiet : 1,5 ml/min.

Deze condities zijn geschikt voor hydrochinon.

## XXXVII. Identificatie en gehaltebepaling van 2-fenoxyethanol, 1-fenoxypropaan-2-ol, methyl-, ethyl-, propyl-, butyl- en benzyl-4-hydroxybenzoesaat in cosmetica

### 1. Doel en toepassingsgebied

Deze methode beschrijft een DLC-procedure waarmee, in combinatie met de in onderdeel B beschreven kwantitatieve analysemethode, de aanwezigheid van 2-fenoxyethanol, 1-fenoxypropaan-2-ol, methyl-4-hydroxybenzoesaat, ethyl-4-hydroxybenzoesaat, propyl-4-hydroxybenzoesaat, butyl-4-hydroxybenzoesaat en benzyl-4-hydroxybenzoesaat in cosmetica kan worden aangetoond.

### 2. Beginsel

De conserveermiddelen worden met aceton uit het aangezuurde cosmetische monster geëxtraheerd. Na filtratie wordt de acetonoplossing met water gemengd, waarna de vetzuren in alkalisch milieu als calciumzouten worden neergeslagen. Het alkalische aceton/watermengsel wordt met diëthylether geëxtraheerd om lipofiele stoffen te verwijderen. Na aanzuren worden de conserveermiddelen met diëthylether geëxtraheerd. Een aliquot van het diëthylether-extract wordt op een met silicagel gecoate dunnelaagplaat gebracht. Na ontwikkeling van de plaat wordt het verkregen chromatogram onder UV-licht bekeken en met Millon's reagens zichtbaar gemaakt.

### 3. Reagentia

#### 3.1. Algemeen

Alle reagentia moeten van analysekwaliteit zijn. Het gebruikte water dient gedistilleerd water of water van minstens gelijkwaardige zuiverheid te zijn.

#### 3.2. Aceton.

#### 3.3. Diëthylether.

#### 3.4. n-Pentaaan.

#### 3.5. Methanol.

#### 3.6. IJsazijn.

#### 3.7. Zoutzuur, c(HCl)=4 mol/l.

#### 3.8. Kaliumhydroxideoplossing c(KOH)=4 mol/l.

#### 3.9. Calciumchloride-dihydraat (CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O).

#### 3.10. Detectiereagens : Millon's reagens.

Millon's reagens (kwik(II)nitraat) is een in de handel verkrijgbare gebruiksklare oplossing (Fluka 69820).

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

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

- 3.11. 2-Fenoxyethanol.
- 3.12. 1-Fenoxypropaan-2-ol.
- 3.13. Methyl-4-hydroxybenzoaat (methylparaben).
- 3.14. Ethyl-4-hydroxybenzoaat (ethylparaben).
- 3.15. n-Propyl-4-hydroxybenzoaat (propylparaben).
- 3.16. n-Butyl-4-hydroxybenzoaat (butylparaben).
- 3.17. Benzyl-4-hydroxybenzoaat (benzylparaben).
- 3.18. Referentieoplossingen

Bereid 0,1 %-ige (m/V) oplossingen van elk van de referentiestoffen 3.11, 3.12, 3.13, 3.14, 3.15, 3.16 en 3.17 in methanol.

- 3.19. Loopvloeistof  
Meng 88 volumedelen n-pentaaan met 12 volumedelen ijszijn.

#### 4. Apparatuur

Gangbare laboratoriumuitrusting, alsmede

- 4.1. waterbad, geschikt voor een temperatuur van 60 °C;
- 4.2. chromatografietank (zonder filtreerpapierbekleding);
- 4.3. UV-lamp, 254 nm;
- 4.4. DLC-platen, 20 cm X 20 cm, voorzien van een 0,25 mm laag silicagel 60 F<sub>254</sub>, met concentratiezone (Merck Nr. 11798, Darmstadt, of gelijkwaardig);
- 4.5. oven, geschikt voor een temperatuur van 105 °C;
- 4.6. föhn;
- 4.7. wollen verfröller, lengte circa 10 cm, buitendiameter circa 3,5 cm. De wollaag moet 2 tot 3 mm dik zijn. Zo nodig wordt de wol bijgesneden.  
Zie de opmerking in punt 5.2.
- 4.8. glazen buizen, 50 ml, met schroefdop.
- 4.9. elektrische kookplaat met thermostaat. Temperatuurinstelling : circa 80 °C. De kookplaat wordt bedekt met een aluminiumplaat van 20 cm X 20 cm en een dikte van circa 6 mm om een gelijkmatige warmteverdeling te verkrijgen.

#### 5. Werkwijze

##### 5.1. Monstervoorbereiding

Weeg circa 1 g monster in een 50 ml glazen buis met schroefdop. Voeg vier druppels zoutzuur (punt 3.7) en 40 ml aceton toe.

In geval van sterk alkalische cosmetica, zoals toiletzeep, worden 20 druppels zoutzuur toegevoegd. Sluit de buis, verwarm het mengsel voorzichtig tot circa 60 °C om de extractie van de conserveermiddelen in de acetonfase te vergemakkelijken en schud krachtig gedurende één minuut.

Bepaal de pH van de oplossing met pH-papier en zuur de oplossing aan met zoutzuur tot de pH ≤ 3 is. Schud krachtig gedurende één minuut.

Laat de oplossing afkoelen tot kamertemperatuur en filtreer over een papieren filter in een erlenmeyer. Breng 20 ml van het filtraat over in een 200 ml-erlenmeyer, voeg 60 ml water toe en meng. Breng de pH van het mengsel met kaliumhydroxideoplossing (punt 3.8) op ongeveer 10 onder gebruikmaking van pH-papier.

Voeg 1 g calciumchloride-dihydraat (punt 3.9) toe en schud krachtig. Filtreer de oplossing over een papieren filter in een 250 ml-scheitrechter die 75 ml diëthylether bevat en schud krachtig gedurende één minuut. Wacht tot de fasen gescheiden zijn en vang de waterlaag op in een 200 ml-erlenmeyer.

Breng de pH van de oplossing met zoutzuur op ongeveer 2 onder gebruikmaking van pH-papier. Voeg vervolgens 10 ml diëthylether toe en schud krachtig gedurende één minuut. Wacht tot de fasen gescheiden zijn en breng circa 2 ml van de diëthyletherlaag over in een 5 ml-monsterflesje.

##### 5.2. Dunnelaagchromatografie

Leg een DLC-plaat (punt 4.4) op de verwarmde aluminiumplaat (punt 4.9). Breng op de startlijn in de concentratiezone van de DLC-plaat 10 ml van elk van de referentieoplossingen (punt 3.18) en 100 ml van de monsteroplossing(en) (punt 5.1) op.

Desgewenst kan de verdamping van het oplosmiddel met een luchtstroom worden bevorderd. Neem de DLC-plaat van de verwarmingsplaat af en laat afkoelen tot kamertemperatuur.

Breng 100 ml van de loopvloeistof (punt 3.19) in de chromatografietank (punt 4.2). Plaats de DLC-plaat onmiddellijk in de onverzadigde tank en ontwikkel bij kamertemperatuur totdat het vloeistoffront een afstand van ongeveer 15 cm vanaf de basislijn heeft afgelegd. Neem de plaat uit de chromatografietank en droog de plaat met behulp van een föhn in een stroom hete lucht.

Bekijk de plaat onder UV-licht (punt 4.3) en markeer de positie van de vlekken. Verwarm de plaat gedurende 30 minuten in een oven (punt 4.5) op 100 °C om overtollig azijnzuur te verwijderen. Maak de conserveermiddelen zichtbaar met Millon's reagens (punt 3.10) door de verfröller (punt 4.7) in het reagens te dopen en over de DLC-plaat te rollen totdat deze gelijkmatig gevochtigd is.

Opmerking : Als alternatief kunnen de vlekken zichtbaar worden gemaakt door op elk van de onder UV-licht gemarkeerde vlekken een druppel Millon's reagens te brengen.

Esters van 4-hydroxybenzoëzuur verschijnen als rode vlekken, 2 fenoxyethanol en 1-fenoxypropaan-2-ol als gele vlekken. Er wordt echter op gewezen dat 4-hydroxybenzoëzuur zelf, dat in de monsters aanwezig kan zijn als conserveermiddel of als ontledingsproduct van de parabenen, ook als rode vlek verschijnt. Zie de punten 7.3 en 7.4.

## 6. Identificatie

Bereken de Rf-waarde van alle vlekken. Vergelijk de bij de monsterooplossing verkregen vlekken met die van de referentieoplossingen, daarbij lettend op de Rf-waarden, het gedrag onder UV-bestraling en de kleur na zichtbaar maken. Trek een voorlopige conclusie omtrent de identiteit van de conserveermiddelen.

Als er parabenen aanwezig lijken te zijn, moet de HPLC-methode zoals beschreven in onderdeel B worden uitgevoerd. Combineer de resultaten van DLC en HPLC om de aanwezigheid van 2-fenoxyethanol, 1-fenoxypropaan-2-ol en de parabenen te bevestigen.

## 7. Opmerkingen

7.1. In verband met de giftigheid van Millon's reagens kan dit het best volgens één van de beschreven methoden worden opgebracht. Sproeien wordt niet aanbevolen.

7.2. Andere verbindingen die hydroxylgroepen bevatten kunnen met Millon's reagens ook kleuren te zien geven. Een tabel met de kleuren en Rf-waarden voor een aantal conserveermiddelen, zoals die met deze DLC-methode worden verkregen, is opgenomen in : N. de Kruijf, M.A.H. de Rijk, L.A. Pranato-Soetardhi and 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, blz. 395-411).

7.3. De onderstaande Rf-waarden dienen als indicatie voor de waarden die kunnen worden verkregen.

Verbinding	hRf	Kleur
4-Hydroxybenzoëzuur	11	Rood
Methylparaben	12	Rood
Ethylparaben	17	Rood
Propylparaben	21	Rood
Butylparaben	26	Rood
Benzylparaben	16	Rood
2-Fenoxyethanol	29	Geel
1-fenoxypropaan-2-ol	50	Geel

7.4. Er wordt geen scheiding verkregen tussen 4-hydroxybenzoëzuur en methylparaben, evenmin als tussen benzylparaben en ethylparaben. De identificatie van deze verbindingen moet worden bevestigd met behulp van de in onderdeel B beschreven HPLC-methode door vergelijking van de verkregen retentietijden met die van de standaarden.

## B. Gehaltebepaling

## 1. Doel en toepassingsgebied

Deze methode beschrijft een werkwijze voor de gehaltebepaling van 2-fenoxyethanol, 1-fenoxypropaan-2-ol, methyl-4-hydroxybenzoaat, ethyl-4-hydroxybenzoaat, propyl-4-hydroxybenzoaat, butyl-4-hydroxybenzoaat en benzyl-4-hydroxybenzoaat in cosmetica.

## 2. Definitie

De volgens deze methode bepaalde gehalten aan conserveermiddelen worden uitgedrukt als massapercentage.

## 3. Beginsel

Het monster wordt aangezuurd met zwavelzuur en vervolgens gesuspendeerd in een ethanol/watermengsel. Na voorzichtig verwarmen van het mengsel om de vetfase te smelten, teneinde kwantitatieve extractie te bevorderen, wordt het mengsel gefiltreerd. De conserveermiddelen in het filtraat worden bepaald met behulp van reversed-phase HPLC, waarbij isopropyl-4-hydroxybenzoaat gebruikt wordt als interne standaard.

## 4. Reagentia

## 4.1. Algemeen

Alle reagentia moeten van analysekwaliteit en, waar van toepassing, geschikt voor HPLC zijn. Het gebruikte water dient gedistilleerd water of water van minstens gelijkwaardige zuiverheid te zijn.

## 4.2. Ethanol, absoluut.

## 4.3. 2-Fenoxyethanol.

## 4.4. 1-Fenoxypropaan-2-ol.

## 4.5. Methyl-4-hydroxybenzoaat (methylparaben).

## 4.6. Ethyl-4-hydroxybenzoaat (ethylparaben).

## 4.7. n-Propyl-4-hydroxybenzoaat (propylparaben).

## 4.8. Isopropyl-4-hydroxybenzoaat (isopropylparaben).

## 4.9. n-Butyl-4-hydroxybenzoaat (butylparaben).

## 4.10. Benzyl-4-hydroxybenzoaat (benzylparaben).

## 4.11. Tetrahydrofuran.

## 4.12. Methanol.

## 4.13. Acetonitril.

4.14. Verdund zwavelzuur,  $c(\text{H}_2\text{SO}_4)=2$  mol/l.

## 4.15. Ethanol/Watermengsel

Meng negen volumedelen ethanol (punt 4.2) met één volumedeel water.

#### 4.16. Interne-standaardoplossing

Weeg circa 0,25 g isopropylparaben (punt 4.8) nauwkeurig af, breng dit kwantitatief over in een maatkolf van 500 ml, los op en vul aan tot de streep met ethanol/watermengsel (punt 4.15).

#### 4.17. Mobiele fase : tetrahydrofuran/water/methanol/acetonitrilmengsel

Meng vijf volumedelen tetrahydrofuran, 60 volumedelen water, tien volumedelen methanol en 25 volumedelen acetonitril.

#### 4.18. Stamoplossing conserveermiddelen

Weeg nauwkeurig circa 0,2 g 2-fenoxyethanol, 0,2 g 1-fenoxypropaan-2-ol, 0,05 g methylparaben, 0,05 g ethylparaben, 0,05 g propylparaben, 0,05 g butylparaben en 0,025 g benzylparaben af in een maatkolf van 100 ml, los op en vul aan tot de streep met ethanol/watermengsel.

Bewaard in de koelkast is deze oplossing een week houdbaar.

#### 4.19. Standaardoplossingen conserveermiddelen

Breng respectievelijk 20,00 ml, 10,00 ml, 5,00 ml, 2,00 ml en 1,00 ml stamoplossing (punt 4.18) in maatkolven van 50 ml. Voeg telkens 10,00 ml interne-standaardoplossing (punt 4.16) en 1,0 ml verdund zwavelzuur (punt 4.14) toe en vul aan tot de streep met ethanol/watermengsel. Deze oplossingen moeten vers bereid worden.

### 5. Apparatuur

Gangbare laboratoriumuitrusting, alsmede :

5.1. waterbad, geschikt voor een temperatuur van  $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;

5.2. HPLC-apparaat, voorzien van een UV-detector, golflengte : 280 nm;

5.3. analytische kolom :

Roestvrij staal, 25 cm x 4,6 mm inwendige diameter (of 12,5 cm x 4,6 mm), gevuld met Nucleosil 5C18 of gelijkwaardig (zie punt 10.1);

5.4. glazen buizen, 100 ml, met schroefdop;

5.5. kooksteentjes, carborundum, afmeting 2-4 mm, of gelijkwaardig.

### 6. Werkwijze

#### 6.1. Monstervoorbereiding

##### 6.1.1. Monstervoorbereiding zonder toevoeging van interne standaard

Weeg in een glazen buis van 100 ml met schroefdop circa 1,0 g monster af. Pipetteer 1,0 ml verdund zwavelzuur (punt 4.14) en 50,0 ml ethanol/watermengsel (punt 4.15) in de buis. Voeg circa 1 g kooksteentjes (punt 5.5) toe, sluit de buis en schud krachtig tot een homogene suspensie is verkregen.

Schud ten minste één minuut. Plaats de buis gedurende vijf minuten in een waterbad (punt 5.1) op  $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  om de extractie van de conserveermiddelen in de ethanolfase te vergemakkelijken.

Koel de buis onmiddellijk onder koud stromend water en plaats het extract gedurende één uur in de koelkast. Filtreer het extract over een papieren filter. Breng circa 2 ml van het filtraat over in een monsterflesje van 5 ml. Bewaar de extracten in de koelkast en voer de HPLC-bepaling binnen 24 uur uit.

##### 6.1.2. Monstervoorbereiding met toevoeging van interne standaard

Weeg in een glazen buis van 100 ml met schroefdop tot op drie decimale plaatsen  $1,0\text{ g} \pm 0,1\text{ g}$  monster af (= a g). Pipetteer 1,0 ml verdund zwavelzuur en 40,0 ml ethanol/watermengsel in de buis. Voeg circa 1 g kooksteentjes en exact 10,00 ml interne-standaardoplossing toe. Sluit de buis en schud krachtig tot een homogene suspensie is verkregen.

Schud tenminste één minuut. Plaats de buis gedurende vijf minuten in een waterbad op  $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  om de extractie van de conserveermiddelen in de ethanolfase te vergemakkelijken.

Koel de buis onmiddellijk onder koud stromend water en plaats het extract gedurende één uur in de koelkast. Filtreer het extract over een papieren filter. Breng circa 2 ml van het filtraat over in een monsterflesje van 5 ml (proefoplossing). Bewaar de extracten in de koelkast en voer de HPLC-bepaling binnen 24 uur uit.

#### 6.2. HPLC

##### 6.2.1. Chromatografie

— Mobiele fase : tetrahydrofuran/water/methanol/acetonitril mengsel (punt 4.17).

— Debiet : 1,5 ml/minuut.

— Detectiegolflengte : 280 nm.

##### 6.2.2. IJking

Injecteer achtereenvolgens 10 ml van elk van de conserveermiddel-standaardoplossingen (punt 4.19). Bepaal in de verkregen chromatogrammen de verhouding tussen de piekhoogtes van de conserveermiddel-standaardoplossingen en die van de interne standaard. Maak voor elk conserveermiddel een ijkgrafiek door de aldus bepaalde verhouding uit te zetten tegen de concentratie van het conserveermiddel in de standaardoplossing.

##### 6.2.3. Bepaling

Injecteer 10 ml van de monsteroplossing zonder interne standaard (punt 6.1.1) in de chromatograaf en neem het chromatogram op.

Injecteer 10 ml van één van de conserveermiddel-standaardoplossingen (punt 4.19) en neem het chromatogram op. Vergelijk de verkregen chromatogrammen. Komt in het chromatogram van het monsterextract (punt 6.1.1) geen piek voor met ongeveer dezelfde retentietijd als isopropylparaben (de aanbevolen interne standaard), injecteer dan 10 ml monsteroplossing met interne standaard (punt 6.1.2). Neem het chromatogram op en meet de piekhoogtes.

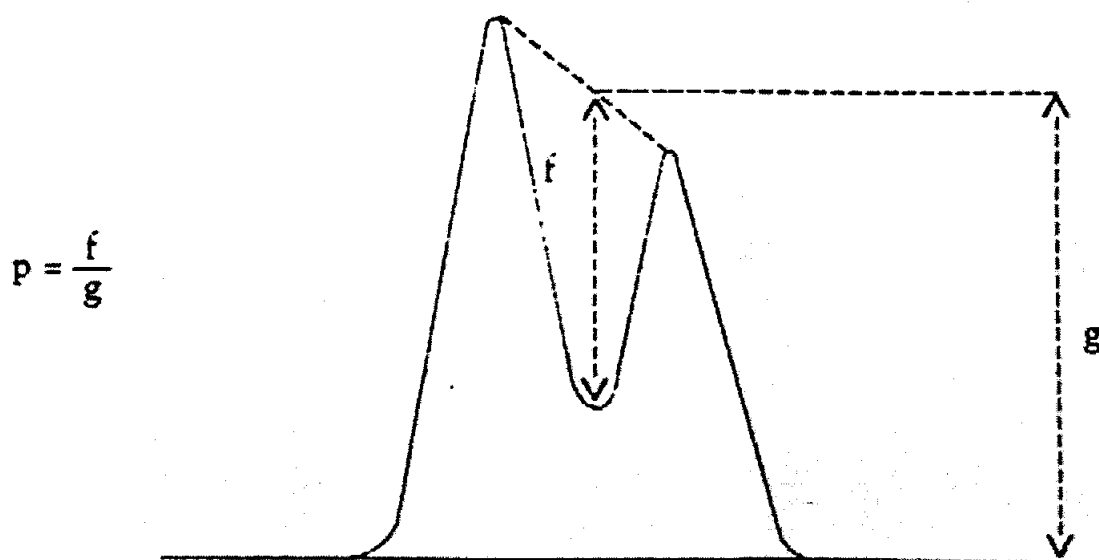
Als in het chromatogram van de monsteroplossing een storende piek aanwezig is met ongeveer dezelfde retentietijd als isopropylparaben, moet een andere interne standaard worden gekozen. Als één van de onderzochte conserveermiddelen niet in het chromatogram van het monster voorkomt, kan dit als alternatieve interne standaard gebruikt worden.

Bereken de verhoudingen van de piekhoogtes van de onderzochte conserveermiddelen tot die van de interne standaard.

Ga na of voor de standaardoplossingen bij de ijking een lineaire afhankelijkheid wordt verkregen.

Ga na of de met de standaardoplossing en de monsterooplossing verkregen chromatogrammen aan de volgende voorwaarden voldoen :

- De piekscheiding van het slechts gescheiden paar moet minimaal 0,90 zijn (voor de definitie van de piekscheiding zie figuur 1).

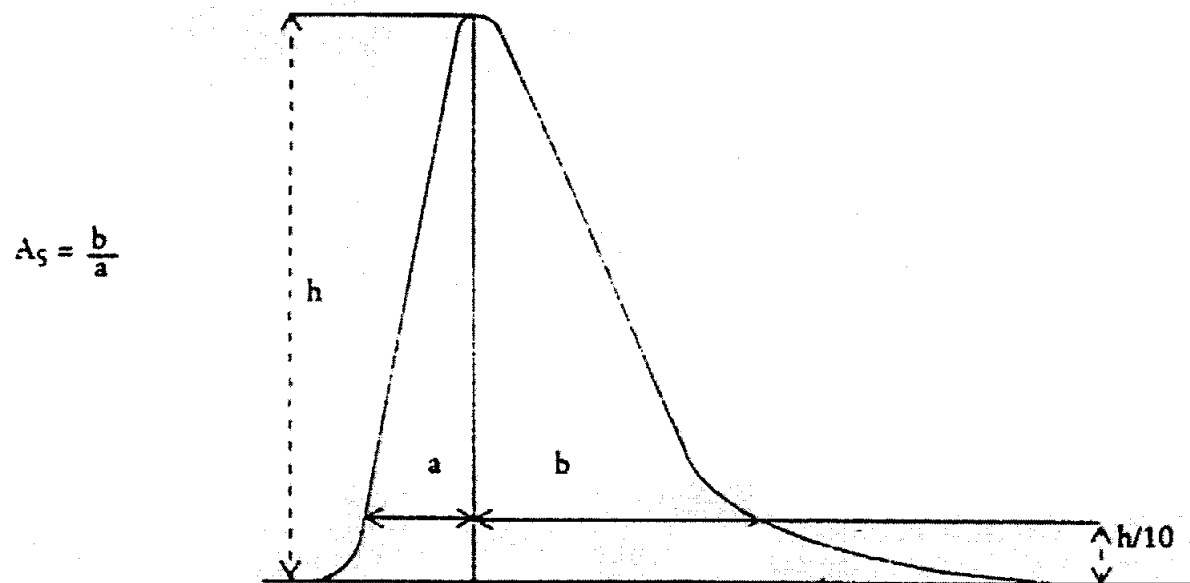


Figuur 1: piekscheiding

$p = f/g$ .

Indien de vereiste scheiding niet wordt verkregen moet er of een efficiëntere kolom worden gebruikt of moet de samenstelling van de mobiele fase worden aangepast totdat dit wel het geval is.

- De asymmetriefactor  $A_s$  van alle verkregen pieken moet tussen 0,9 en 1,5 liggen (voor een definitie van de piekasymmetriefactor zie figuur 2). Voor het bepalen van de asymmetriefactor wordt aanbevolen het chromatogram



Figuur 2: piekasymmetriefactor

met een papersnelheid van minimaal 2 cm/minuut op te nemen,

— Er moet een vlakke basislijn worden verkregen.

## 7. Berekening

Bereken uit de verhoudingen van de piekhoogtes van de onderzochte conserveermiddelen tot die van de interne standaard met behulp van de ijkgrafiek (punt 6.2.2) de concentratie van de conserveermiddelen in de monsteroplossing. Bereken het gehalte aan 2-fenoxyethanol, 1-fenoxypropaan-2-ol, methyl-4-hydroxybenzoesaat, ethyl-4-hydroxybenzoesaat, propyl-4-hydroxybenzoesaat, butyl-4-hydroxybenzoesaat en benzyl-4-hydroxybenzoesaat,  $w_i$ , als massa-percentage (% m/m) met behulp van de volgende formule :

$$\%w_i(m/m) = \frac{b_i}{200 \cdot a}$$

waarbij

$b_i$  = concentratie van het conserveermiddel  $i$  in de proefoplossing in microgram per milliliter, zoals afgelezen uit de ijkgrafiek, en

$a$  = monsterinweeg in gram.

## 8. Herhaalbaarheid (1)

Zie de opmerkingen in punt 10.5.

## 9. Reproduceerbaarheid (1)

Zie de opmerkingen in punt 10.5.

## 10. Opmerkingen

## 10.1. Stationaire fase

Het retentiegedrag bij HPLC-bepalingen hangt sterk af van het soort, het merk en de voorgeschiedenis van de stationaire fase. Of een kolom geschikt is voor de scheiding van de bestudeerde conserveermiddelen, kan worden opgemaakt uit de resultaten die met de standaardoplossingen worden verkregen (zie de opmerkingen in punt 6.2.3). Naast de voorgestelde kolompakking zijn ook Hypersil ODS en Zorbax ODS geschikt gebleken.

Eventueel kan de samenstelling van de mobiele fase worden geoptimaliseerd om de vereiste scheiding te verkrijgen.

## 10.2. Detectiegolfengte

Uit een robuustheidstest die op de beschreven methode is uitgevoerd, is gebleken dat een geringe verandering in de detectiegolfengte een aanzienlijk effect op de resultaten van de bepaling kan hebben. Daarom moet deze parameter bij de analyse zorgvuldig worden gecontroleerd.

## 10.3. Storingen

Onder de in deze methode beschreven condities worden ook tal van andere verbindingen, zoals conserveermiddelen en cosmetica-additieven, geëlueerd. Een overzicht van de retentietijden van een groot aantal conserveermiddelen die vermeld staan in bijlage VI bij de richtlijn van de Raad inzake cosmetica, is opgenomen in : N. De Kruijf, M.A.H. Rijk, L.A. Pranato-Soetardhi and A. Schouten (1987) : Determination of preservatives in cosmetic products II : High performance liquid chromatographic identification. (J. Chromatography 469, blz. 317-398).

10.4. Ter bescherming van de analytische kolom kan een geschikte guardkolom worden gebruikt.

10.5. De methode is onderzocht in een ringonderzoek waaraan negen laboratoria hebben deelgenomen. Hierbij zijn drie monsters geanalyseerd. De onderstaande tabel geeft voor elk van die drie monsters het gemiddelde gehalte als massa-percentage (m), de herhaalbaarheid (r) en de reproduceerbaarheid (R) van de daarin aanwezige analyten.

Monster	2 - F e n o x y - ethanol		1-Fenoxypropaan-2-ol	Methylparaben	Ethylparaben	Propylparaben	Butylparaben	Benzylparaben
Vitaminecrème	m	1,124		0,250	0,0628	0,031	0,0906	
	r	0,016		0,018	0,0035	0,0028	0,0044	
	R	0,176		0,030	0,0068	0,0111	0,0034	
Dagcrème	m	1,196		0,266	0,076			
	r	0,040		0,003	0,002			
	R	0,147		0,022	0,004			
Massagecrème	m		0,806			0,180	0,148	0,152
	r		0,067			0,034	0,013	0,015
	R		0,112			0,078	0,012	0,016

Ons bekend om te worden gevoegd bij Ons besluit van 16 april 1998.

ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van Volksgezondheid en Pensioenen,  
M. COLLA



## ANNEXE

**XXXV. 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  $\text{Li}_2\text{CO}_3$ 

## 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 diéthyle oxyde (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'élution

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 x 20 cm, épaisseur de la couche 0,25 mm avec zone de concentration de 2,5 x 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 Schüll, Weissband no 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. A 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 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 échantillons et des solutions témoins à chromatographier, appliquer environ 3 µl 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. A l'aide d'une microseringue (3.5), appliquer 10 µl 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 µl de réactif de dérivation (2.19) (solution d'alpha-bromo-2-acéto-naphtone) également exactement sur les taches de solutions témoins et d'échantillon ainsi que de solution Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

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<sub>f</sub> pour chaque tache.

Comparer le R<sub>f</sub> 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 (CH<sub>3</sub>COONa.3H<sub>2</sub>O)

2.8. Acide acétique d<sub>4</sub><sup>20</sup> = 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 & Schüll, Weissband no 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.

Filter 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 ± 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.

Filter 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 ± 0,5 ml/minute. Régler la longueur d'onde du détecteur à 240 nm.

#### 4.2.1. Étalonnage

Injecter 10 µl 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 µl d'extrait échantillon (4.1.1) dans le chromatographe en phase liquide (3.2) et enregistrer un chromatogramme. Injecter 10 µl 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 µl 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).

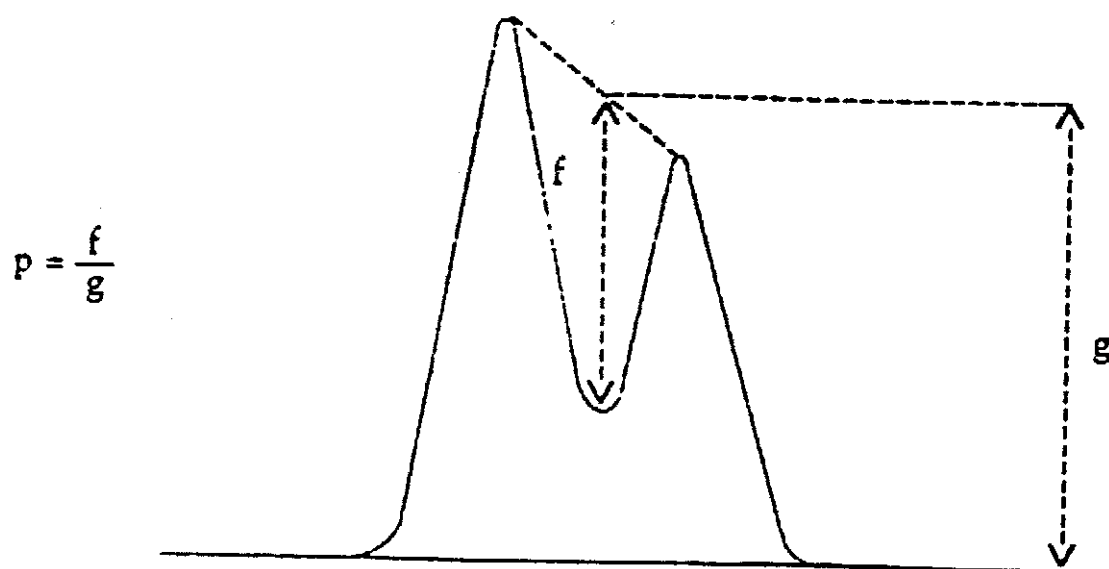


Figure 1: pic de séparation p

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,

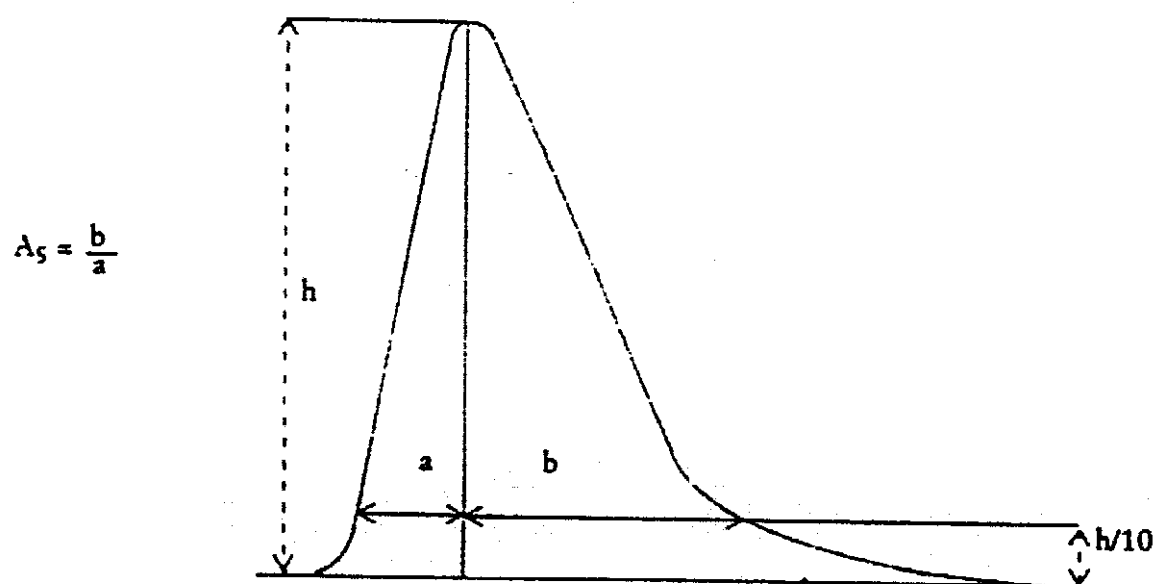


Figure 2: facteur d'asymétrie d'un pic

une ligne de base régulière doit être obtenue.

## 5. Calcul

A 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 :

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

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).

## 5. Appareillage

## 5.1. Équipement normal de laboratoire, et :

## 5.2. Chromatographe en phase gazeuse avec détecteur à ionisation de flamme

## 5.3. Bain-marie à 60 °C

## 5.4. Tube de verre (20 x 150 mm) avec bouchon à vis

5.5. Seringue en verre de 10 ml avec membrane filtrante (pore diamètre 0,45  $\mu\text{m}$ )

## 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.

(1) Selon ISO 5725.

## 6.1.2. Préparation de l'échantillon avec étalon interne

Peser à trois décimales près  $1 \pm 0,1$  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 <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 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 µl 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 µl 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 µl 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. A 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. A partir du rapport des masses ainsi obtenu, calculer le taux d'acide propionique, en pourcentage de masse, à l'aide de la formule :

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

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 %.

**XXXVI. Identification de l'hydroquinone, du monométhyléther d'hydroquinone, du monoéthyléther d'hydroquinone et du monobenzyléther 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.

(1) Selon ISO 5725.

## 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.

3.1. Éthanol à 96 % (v,v)

3.2. Chloroforme

3.3. Diéthyle oxyde

3.4. Solvant d'éluion : chloroforme/diéthyle oxyde 66/33 (v/v)

3.5. Ammoniaque à 25 % (m/m) ( $d_{40}^{20} = 0,91$  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 H<sub>2</sub>O

3.15. Chlorure ferrique 6 H<sub>2</sub>O

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/UV<sub>254</sub> 20 x 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'éluion (3.4).

5.2.2. Déposer sur une plaque 2 µl des solutions de référence (3.11) et 2 µl 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<sub>f</sub> 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<sub>f</sub>, 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<sub>f</sub> 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 (phénéthylsilane 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 & Schüll, Weissband no 5982, ou équivalent.

### 5. Mode opératoire

#### 5.1. Préparation de l'échantillon

Peser avec une précision de trois décimales 1 g ± 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. A 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  $RF_i$  :

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

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.

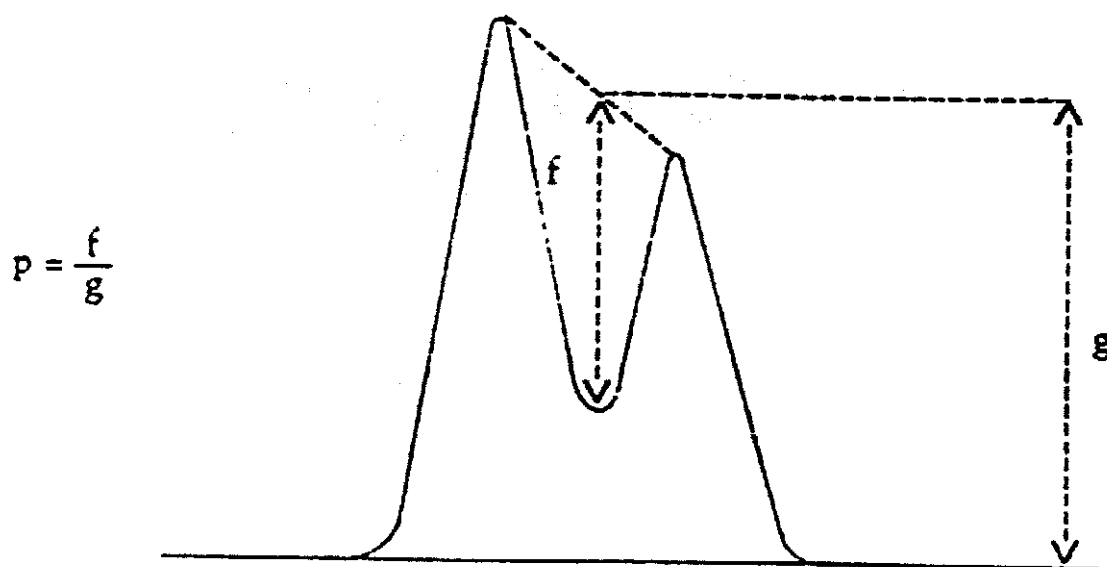


Figure 1: pic de séparation p

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.

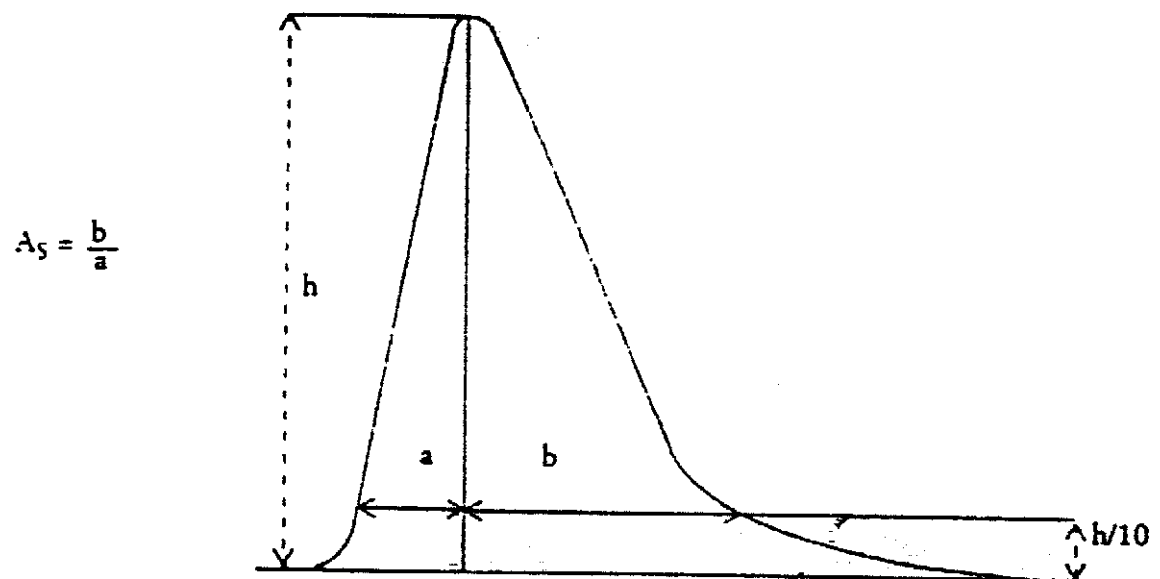


Figure 2: facteur  $A_s$  d'asymétrie du pic

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 :

où :

$a$  = masse de l'échantillon en grammes,

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

$RF_i$  = facteur de réponse (5.2.3)

Répétabilité (1)

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

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 %.

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 %.

(1) Selon ISO 5725.

## 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 x 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).

## XXXVII. Identification et dosage du phénoxy-2-éthanol, du phénoxy-1-propanediol, des hydroxy-4-benzoates de méthyle, d'éthyle, de propyle, de butyle et de benzyle dans les produits cosmétiques

### A. Identification

#### 1. Objet et champ d'application

Cette méthode décrit une chromatographie en couche mince qui, combinée à la méthode d'analyse décrite à la section B, permet l'identification du phénoxy-2-éthanol, du phénoxy-1-propanediol, des hydroxy-4-benzoates de méthyle, d'éthyle, de propyle, de butyle et de benzyle dans les produits cosmétiques.

#### 2. Principe

Les conservateurs sont extraits par l'acétone de l'échantillon acidifié. Après filtration, la solution acétonique est mélangée à de l'eau et les acides gras sont précipités en milieu alcalin sous forme de sels de calcium. Le mélange eau/acétone est extrait par l'éther diéthylique pour séparer les substances lipophiles. Après acidification, les conservateurs sont extraits par l'éther diéthylique pour séparer les substances lipophiles. Après acidification, les conservateurs sont extraits par l'éther diéthylique. Une partie aliquote de l'extrait est déposée sur une plaque de chromatographie en couche mince recouverte de gel de silice. Après développement de la plaque, le chromatogramme obtenu est observé sous lumière ultraviolette et révélé par le réactif de Millon.

#### 3. Réactifs

##### 3.1. Généralités

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

##### 3.2. Acétone

##### 3.3. Éther diéthylique

##### 3.4. n-Pentane

##### 3.5. Méthanol

##### 3.6. Acide acétique pur

##### 3.7. Acide chlorhydrique en solution, c (HCl) = 4 mol/l

##### 3.8. Hydroxyde de potassium en solution, c (KOH) = 4 mol/l

##### 3.9. Chlorure de calcium dihydraté (CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O)

##### 3.10. Réactif révélateur : réactif de Millon.

Le réactif de Millon (nitrate mercurique) est une solution toute prête en vente dans le commerce (Fluka 69820 ou équivalent)

(1) M. Herpol-Borremans et M. O. Masse : Identification et dosage de l'hydroquinone et ses éthers méthylique et benzyléther 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.

- 3.11. Phénoxy-2-éthanol
- 3.12. Phénoxy-1-propanediol
- 3.13. Hydroxy-4-benzoate de méthyle (méthyl paraben)
- 3.14. Hydroxy-4-benzoate d'éthyle (éthyl paraben)
- 3.15. n-Hydroxy-4-benzoate de propyle (propyl paraben)
- 3.16. n-Hydroxy-4-benzoate de butyle (butyl paraben)
- 3.17. Hydroxy-4-benzoate de benzyle (benzyl paraben)
- 3.18. Solutions de référence

Préparer des solutions à 0,1 % (m/V) des substances de référence des points 3.11, 3.12, 3.13, 3.14, 3.15, 3.16 et 3.17 dans du méthanol

#### 3.19. Solvant de développement

Mélanger 88 volumes de n-pentane (point 3.4) avec 12 volumes d'acide acétique (point 3.6) pur

#### 4. Appareillage

Équipement courant de laboratoire ainsi que :

- 4.1. bain-marie, capable de maintenir une température de 60 °C
- 4.2. cuve de développement (dépourvue de papier-filtre)
- 4.3. source de lumière ultraviolette, 254 nm
- 4.4. plaques pour chromatographie en couche mince, 20 cm x 20 cm, recouvertes de gel de silice 60 F<sub>254r</sub> avec zone de concentration (Merck no 11798, Darmstadt ou équivalent)
- 4.5. étuve capable de maintenir des températures allant jusqu'à 105 °C
- 4.6. sèche-cheveux à air chaud
- 4.7. rouleau à peindre en laine, longueur approximative : 10 cm, diamètre extérieur : environ 3,5 cm. L'épaisseur de la couche de laine doit être d'environ 2 à 3 mm. Désépaissir la laine si nécessaire (voir remarque au point 5.2)
- 4.8. tubes de verre de 50 ml avec bouchon à vis
- 4.9. plaque chauffante électrique avec thermostat. Réglage de température : environ 80 °C. La plaque chauffante sera recouverte d'une plaque d'aluminium de 20 cm x 20 cm et d'une épaisseur de 6 mm environ afin d'obtenir une distribution uniforme de la chaleur

#### 5. Mode opératoire

##### 5.1. Préparation des échantillons

Placer environ 1 g d'échantillon dans un tube en verre de 50 ml (point 4.8) et ajouter 4 gouttes d'acide chlorhydrique en solution (point 3.7) et 40 ml d'acétone.

Pour des produits cosmétiques très basiques, comme le savon de toilette, 20 gouttes d'acide chlorhydrique en solution seront ajoutées. Fermer le tube, porter doucement le mélange à une température de 60 °C environ afin de faciliter l'extraction des conservateurs en phase acétonique et agiter vigoureusement pendant une minute.

Mesurer le pH de la solution avec du papier indicateur de pH et ajuster ce pH à une valeur  $\leq 3$  par l'acide chlorhydrique en solution. Agiter à nouveau vigoureusement pendant une minute.

Laisser refroidir la solution à température ambiante et filtrer sur papier filtre dans une fiole conique. Transférer 20 ml de ce filtrat dans une fiole conique de 200 ml, ajouter 60 ml d'eau et mélanger. Ajuster le pH du mélange à 10 environ à l'aide d'hydroxyde de potassium en solution (point 3.8), en utilisant du papier indicateur de pH.

Ajouter 1 g de chlorure de calcium dihydraté (point 3.9) et agiter vigoureusement. Filtrer la solution sur papier filtre dans une ampoule à décanter de 250 ml contenant 75 ml d'éther diéthylique et secouer vigoureusement pendant une minute. Laisser les phases se séparer et recueillir la couche aqueuse dans une fiole conique de 200 ml. Ajuster le pH de la solution à 2 environ à l'aide d'acide chlorhydrique en solution en utilisant du papier indicateur de pH. Ajouter ensuite 10 ml d'éther diéthylique et agiter vigoureusement pendant une minute. Laisser les phases se séparer et transférer environ 2 ml de la couche d'éther diéthylique dans un flacon échantillon de 5 ml.

##### 5.2. Chromatographie en couche mince

Placer une plaque pour chromatographie en couche mince (point 4.4) sur la plaque d'aluminium chauffée (point 4.9), déposer 10  $\mu$ l de chacune des solutions de référence (point 3.18) et 100  $\mu$ l de l' (des) échantillon(s) en solution (point 5.1) sur la ligne de départ dans la zone de concentration de la plaque pour chromatographie en couche mince.

Si nécessaire, il est possible d'utiliser un flux d'air pour faciliter l'évaporation du solvant. Oter la plaque pour chromatographie en couche mince de la plaque chauffante et la laisser refroidir à température ambiante. Verser 100 ml du solvant de développement (point 3.19) dans la cuve (point 4.2). Placer la plaque pour chromatographie en couche mince immédiatement dans la cuve non saturée et développer à température ambiante jusqu'à ce que le front de solvant soit à 15 cm de la ligne de base. Oter la plaque de la cuve de développement et sécher à l'aide d'un sèche-cheveux.

Examiner la plaque sous lumière ultraviolette (point 4.3) et marquer la position des taches. Chauffer la plaque pendant 30 minutes à l'étuve (point 4.5) à 100 °C pour éliminer l'acide acétique excédentaire. Révéler les conservateurs sur le chromatogramme à l'aide de la solution de nitrate mercurique (point 3.10), en trempant le rouleau à peindre (point 4.7) dans ce réactif et en le faisant rouler sur la plaque pour chromatographie en couche mince jusqu'à ce qu'elle soit uniformément humidifiée.

Remarque : Les taches peuvent également être révélées en appliquant précautionneusement une goutte de solution de nitrate mercurique sur chacune des taches visualisées sous lumière ultraviolette.

Les esters de l'acide hydroxy-4-benzoïque apparaissent alors sous forme de taches rouges, tandis que le phénoxy-2-éthanol et le phénoxy-1-propanediol se manifestent sous forme de taches jaunes. L'acide hydroxy-4-benzoïque lui-même, qui peut être présent dans les échantillons en tant que conservateur ou produit de la décomposition des parahydrobenzoates, apparaîtra sous la forme d'une tache rouge (points 7.3 et 7.4).

## 6. Identification

Calculer la valeur du  $R_f$  pour chaque tache. Comparer les taches obtenues à partir de l'échantillon en solution avec celles obtenues avec les solutions de référence en considérant la valeur de leur  $R_f$ , leur comportement sous l'effet des rayons ultraviolets et leur couleur après révélation. En déduire les conclusions préliminaires sur l'identité des conservateurs. En présence de parahydrobenzoates, la procédure de chromatographie liquide haute performance (CLHP) décrite au point B doit être appliquée. Combiner les résultats de la chromatographie en couche mince et de la CLHP pour confirmer la présence de phénoxy-2-éthanol, de phénoxy-1-propanediol et des parahydroxybenzoates.

## 7. Remarques

7.1. En raison de la toxicité de la solution de nitrate mercurique, ce réactif doit être appliqué selon l'une des procédures décrites. La vaporisation du réactif n'est pas recommandée.

7.2. D'autres composants contenant des groupes hydroxyles peuvent également se colorer en présence de la solution de nitrate mercurique. On trouvera une table des couleurs et des valeurs de  $R_f$  d'un certain nombre de conservateurs dans la publication suivante : N. De Kruijf, M.A.H. Rijk, L.A. Pranato-Soetardhi and 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. Les valeurs de  $R_f$  figurant dans le tableau suivant sont une indication des chiffres qui peuvent être obtenus.

Composé	$hR_f$	Couleur
Acide hydroxy-4-benzoïque	11	Rouge
Methyl paraben	12	Rouge
Ethyl paraben	17	Rouge
Propyl paraben	21	Rouge
Butyl paraben	26	Rouge
Benzyl paraben	16	Rouge
Phénoxy-2-éthanol	29	Jaune
Phénoxy-1-propanediol	50	Jaune

7.4. Aucune séparation n'est obtenue pour l'acide hydroxy-4-benzoïque et le parahydrobenzoate de méthyle ou pour le parahydrobenzoate de benzyle et le parahydrobenzoate d'éthyle. L'identification de ces composés doit être confirmée par une CLHP décrite au point B en comparant les temps de rétention obtenus à partir des échantillons et des solutions de référence.

## B. DOSAGE

## 1. Objet et champ d'application

Cette méthode décrit le dosage du phénoxy-2-éthanol, du phénoxy-1-propanediol, des hydroxy-4-benzoates de méthyle, d'éthyle, de propyle, de butyle et de benzyle dans les produits cosmétiques.

## 2. Définition

Les quantités de conservateurs dosées selon cette méthode sont exprimées en pourcentage par rapport à la masse.

## 3. Principe

L'échantillon est acidifié par de l'acide sulfurique puis mis en suspension dans un mélange d'éthanol et d'eau. Après avoir été chauffé doucement pour fondre la phase lipidique afin de faciliter l'extraction quantitative, le mélange est filtré.

Les conservateurs présents dans le filtrat sont dosés par CLHP en phase inverse en utilisant comme étalon interne hydroxy-4-benzoate d'isopropyle.

## 4. Réactifs

## 4.1. Généralités

Tous les réactifs utilisés doivent être analytiquement purs. L'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou de l'eau d'une pureté au moins équivalente

## 4.2. Éthanol absolu

## 4.3. Phénoxy-2-éthanol

## 4.4. Phénoxy-1-propanediol

## 4.5. Hydroxy-4-benzoate de méthyle (méthyl parahydrobenzoate)

## 4.6. Hydroxy-4-benzoate d'éthyle (éthyl parahydrobenzoate)

## 4.7. Hydroxy-4-benzoate de n-propyle (propyl parahydrobenzoate)

## 4.8. Hydroxy-4-benzoate d'isopropyle (isopropyl parahydrobenzoate)

## 4.9. Hydroxy-4-benzoate de n-butyle (butyl parahydrobenzoate)

## 4.10. Hydroxy-4-benzoate de benzyle (benzyl parahydrobenzoate)

## 4.11. Tétrahydrofurane

## 4.12. Méthanol

## 4.13. Acétonitrile

4.14. Acide sulfurique en solution,  $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 2 \text{ mol/l}$

## 4.15. Mélange éthanol/eau :

Mélanger 9 volumes d'éthanol (4.2) et 1 volume d'eau

## 4.16. Solution d'étalon interne

Peser avec précision environ 0,25 g de hydroxy-4-benzoate d'isopropyle (point 4.8) dans une fiole conique de 500 ml. Dissoudre et compléter avec le mélange éthanol/eau (point 4.15)

## 4.17. Phase mobile

Mélanger 5 volumes de tétrahydrofurane, 60 volumes d'eau, 10 volumes de méthanol et 25 volumes d'acétonitrile

## 4.18. Solution mère de conservateurs

Peser avec soin environ 0,2 g de phénoxy-2-éthanol, 0,2 g de phénoxy-1-propanediol, 0,05 g de parahydrobenzoate de méthyle, 0,05 g de parahydrobenzoate d'éthyle, 0,05 g de parahydrobenzoate de propyle, 0,05 g de parahydrobenzoate de butyle, 0,025 g de parahydrobenzoate de benzyle, dans une fiole jaugée de 100 ml, dissoudre et compléter au volume avec le mélange éthanol/eau.

La solution reste stable pendant une semaine au réfrigérateur

## 4.19. Solution étalon des conservateurs

A partir de la solution mère (point 4.18), transférer respectivement 20 ml, 10 ml, 5 ml, 2 ml et 1 ml dans des fioles jaugées de 50 ml. Ajouter dans chaque fiole 10 ml de la solution d'étalon interne (point 4.16) et 1 ml d'acide sulfurique en solution (point 4.14). Compléter le volume par le mélange éthanol/eau. Ces solutions doivent être préparées extemporanément

## 5. Appareillage

Équipement courant de laboratoire ainsi que :

5.1. bain-marie, capable de maintenir une température de  $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

5.2. chromatographe liquide à haute performance avec détecteur ultraviolet, longueur d'ondes 280 nm

5.3. colonne :

acier inoxydable, 25 cm x 4,6 mm Ø intérieur (ou 12,5 cm x 4,6 mm Ø intérieur) remplie de Nucléosil 5C18 ou équivalent (point 10.1).

5.4. tubes en verre de 100 ml avec bouchon à vis

5.5. chips de carborundum facilitant l'ébullition, taille 2 à 4 mm, ou équivalent

## 6. Mode opératoire

## 6.1. Préparation des échantillons

## 6.1.1. Préparation des échantillons sans addition d'étalon interne

Mesurer avec précision environ 1 g d'échantillon dans un tube en verre de 100 ml avec bouchon à vis. Introduire dans le tube à l'aide d'une pipette 1 ml d'acide sulfurique en solution (point 4.14) et 50 ml du mélange éthanol/eau (point 4.15). Ajouter environ 1 g de chips (point 5.5), fermer le tube et agiter vigoureusement jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène (au moins une minute). Placer le tube pendant 5 minutes dans un bain-marie (point 5.1) à  $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  pour faciliter l'extraction des conservateurs dans la phase éthanolique.

Refroidir immédiatement le tube dans un flux d'air froid et conserver l'extrait au réfrigérateur pendant une heure. Filtrer l'extrait sur papier filtre. Transférer environ 2 ml du filtrat dans un flacon d'échantillonnage de 5 ml. Conserver les extraits au réfrigérateur et procéder à l'analyse par CLHP dans les 24 heures.

## 6.1.2. Préparation des échantillons avec addition d'étalon interne

Peser à trois décimales près  $1,0\text{ g} \pm 0,1\text{ g}$  d'échantillon dans un tube en verre de 100 ml avec bouchon à vis.

Ajouter avec une pipette 1 ml d'acide sulfurique en solution et 40 ml du mélange éthanol/eau. Ajouter environ 1 g de chips (point 5.5) et exactement 10 ml de solution d'étalon interne. Fermer le tube et agiter vigoureusement jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène (au moins une minute). Placer le tube pendant 5 minutes dans un bain-marie à  $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  pour faciliter l'extraction des conservateurs dans la phase éthanolique.

Refroidir immédiatement le tube dans un jet d'eau courante froide et conserver l'extrait au réfrigérateur pendant une heure. Filtrer l'extrait sur papier filtre.

Transférer environ 2 ml du filtrat dans un flacon d'échantillonnage de 5 ml (solution-test). Conserver les extraits au réfrigérateur et procéder à l'analyse par CLHP dans les 24 heures.

## 6.2. Chromatographie liquide haute performance

## 6.2.1. Conditions chromatographiques

- Phase mobile : mélange tétrahydrofurane/eau/méthanol/acétonitrile (point 4.17)

- Débit : 1,5 ml/minute

- Longueur d'onde de détection : 280 nm

## 6.2.2. Étalonnage

Injecter dans le chromatographe 10 µl de chacune des solutions de référence de conservateur (point 4.19). A partir des chromatogrammes ainsi obtenus, déterminer les rapports entre les hauteurs des pics des solutions de référence et la hauteur du pic de la solution d'étalon interne. Pour chaque conservateur tracer une courbe reliant ces rapports aux concentrations des solutions de référence.

## 6.2.3. Dosage

Injecter dans le chromatographe 10 µl de la solution échantillon sans étalon interne (point 6.1.1) et enregistrer le chromatogramme.

Injecter 10 µl de la solution de référence des conservateurs (point 4.19) et enregistrer le chromatogramme. Comparer les chromatogrammes ainsi obtenus.

Si dans le chromatogramme de l'extrait échantillon (point 6.1.1) aucun pic ne présente un temps de rétention voisin de celui de l'hydroxy-4-benzoate d'isopropyle (étalon interne recommandé), poursuivre en injectant 10 µl de la solution échantillon avec étalon interne (point 6.1.2). Enregistrer le chromatogramme et mesurer la hauteur des pics.

Si l'on observe, dans le chromatogramme de la solution échantillon, un pic ayant à peu près le même temps de rétention que celui de l'hydroxy-4-benzoate d'isopropyle, un autre étalon interne devra être choisi.

Si l'un des conservateurs de référence est absent du chromatogramme de l'échantillon, ce conservateur peut tenir lieu d'étalon interne.

Calculer les rapports entre les hauteurs de pic des conservateurs analysés et la hauteur de pic de l'étalon interne.

S'assurer que pour les solutions étalons utilisées la courbe d'étalonnage est une droite.

S'assurer que les chromatogrammes obtenus pour la solution de référence (point 4.19) et pour l'échantillon en solution respectent les spécifications suivantes.

- la séparation des pics de la paire la plus mal séparée doit être d'au moins 0,90 (définition de la séparation des pics, voir figure 1).

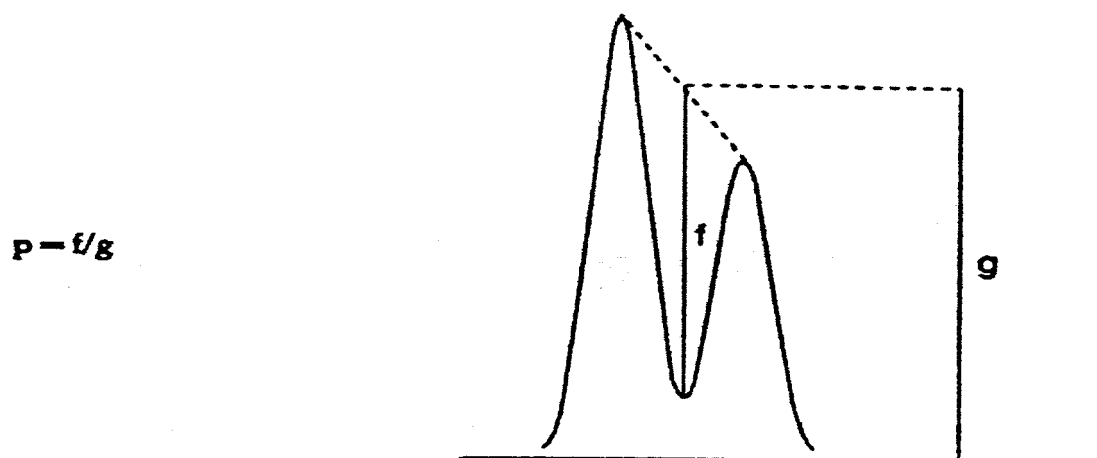


Figure 1 : Séparation des pics

Si la séparation requise n'est pas atteinte, il est nécessaire soit d'utiliser une colonne plus efficace, soit d'ajuster la composition de la phase mobile jusqu'à ce que les spécifications soient respectées.

Le facteur d'asymétrie  $A_s$  de tous les pics obtenus ira de 0,9 à 1,5 (pour une définition du facteur d'asymétrie des pics, voir figure 2). Pour enregistrer le chromatogramme pour la détermination du facteur d'asymétrie, une vitesse de déroulement du papier enregistreur d'au moins 2 cm/min est recommandée.

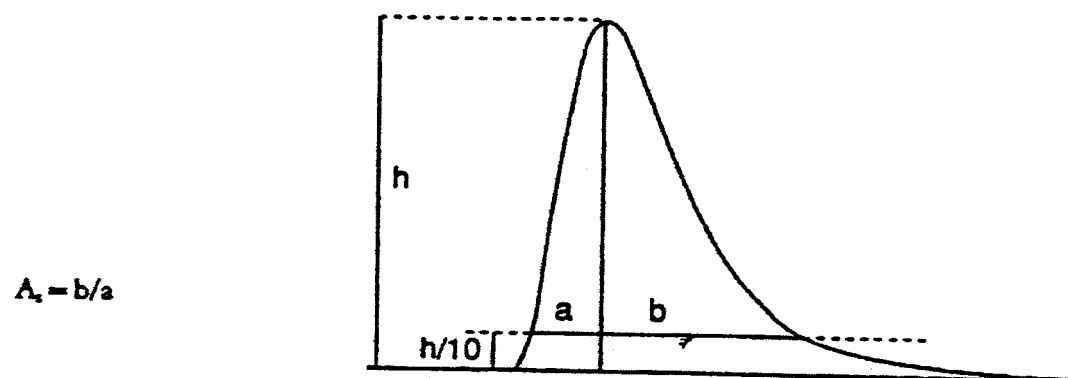


Figure 2 : facteur d'asymétrie des pics

- Une ligne de base stable devra être obtenue.

## 7. Calcul

Utiliser la courbe d'étalonnage (point 6.2.2) et les rapports entre les hauteurs de pics des conservateurs à doser et les hauteurs de pics de la solution d'étalon interne pour calculer la concentration des conservateurs dans l'échantillon. Calculer le contenu en phénoxy-2-éthanol, de phénoxy-1-propanediol, d'hydroxy-4-benzoates de méthyle, d'éthyle, de propyle, de butyle et de benzyle,  $w_i$ , sous forme de pourcentage par rapport au poids (% m/m), en utilisant la formule suivante :

$$\%w_i(m/m) = \frac{b_i}{200 \cdot a}$$

où :

$b_i$  = la concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) de conservateur  $i$  dans la solution échantillon selon lecture de la courbe d'étalonnage et

$a$  = la masse (g) de la prise d'essai.

## 8. Répétabilité (1)

Voir point 10.5

## 9. Reproductibilité (1)

(1) Voir point 10.5

## 10. Remarques

## 10.1. Phase stationnaire

La rétention des solutés dans le dosage par CLHP dépend fortement du type, de la marque et de l'histoire de la phase stationnaire. Il est possible de savoir si une colonne est utilisable pour la séparation des conservateurs étudiés (point 6.2.3) en se basant sur les résultats obtenus à partir des solutions de référence. Outre les matériaux de remplissage proposés dans la méthode, on peut également utiliser l'Hypersil ODS et le Zorbax ODS.

On peut aussi optimiser la composition de la phase mobile recommandée dans le but d'obtenir la séparation souhaitée.

## 10.2. Longueur d'onde

Un test de robustesse effectué sur la méthode décrite a montré qu'un léger changement dans la longueur d'onde de détection peut avoir une influence importante sur les résultats de l'analyse.

Dès lors, ce paramètre doit être soigneusement contrôlé au cours de l'analyse.

## 10.3. Interférences

Dans les conditions décrites dans cette méthode, de nombreux autres composants, tels que des conservateurs et des additifs cosmétiques, sont également élués. Les temps de rétention d'un grand nombre de conservateurs mentionnés dans l'annexe VI de la directive du Conseil sur les produits cosmétiques sont cités dans : N. De Kruijf, M.A.H. Rijk, L.A. Pranato-Soetardhi and A. Schouten (1989) Determination of preservatives in cosmetic products II. High performance liquid chromatographic identification (J. Chromatography 469, 317-398).

10.4. Pour protéger la colonne analytique, une colonne de protection adéquate doit être utilisée.

10.5. La méthode a été contrôlée au cours d'un essai mené par neuf laboratoires travaillant en collaboration. Trois échantillons ont été analysés. Le tableau suivant exprime, pour chacun des échantillons : les moyennes en % m/m (m), la répétabilité (r) et la reproductibilité (R) pour les conservateurs concernés.

Echantillon	Phénoxy-2-éthanol		Phénoxy-1-propanediol	Parahydrobenzoate de méthyle	Parahydrobenzoate d'éthyle	Parahydrobenzoate de propyle	Parahydrobenzoate de butyle	Parahydrobenzoate de benzyle
	m	r						
Crème vitaminée	m	1,124		0,250	0,0628	0,031	0,0906	
	r	0,016		0,018	0,0035	0,0028	0,0044	
	R	0,176		0,030	0,0068	0,0111	0,0034	
Crème de Jour	mr	1,196		0,206	0,0076			
	r	0,040		0,003	0,0002			
	R	0,147		0,022	0,0004			
Crème pour massages	m		0,806			0,180	0,148	0,152
	r		0,067			0,034	0,013	0,015
	R		0,112			0,078	0,012	0,016

Vu pour être annexé à Notre arrêté du 16 avril 1998.

ALBERT

Par le Roi :

Le Ministre de la Santé publique et des Pensions,  
M. COLLA

(1) Selon ISO 5725.