

## DIN EN 16956



ICS 71.100.70

**Kosmetische Mittel –  
Untersuchungsverfahren –  
HPLC/UV-Verfahren für die Identifizierung und Bestimmung von  
Hydrochinon, Hydrochinonethern und Kortikosteroiden in  
hautaufhellenden kosmetischen Mitteln;  
Deutsche Fassung EN 16956:2017**

Cosmetics –

Analytical methods –

HPLC/UV method for the identification and assay of hydroquinone, ethers of hydroquinone  
and corticosteroids in skin whitening cosmetic products;  
German version EN 16956:2017

Cosmétiques –

Méthodes analytiques –

Méthode de CLHP couplée à la détection UV pour l'identification et l'analyse de  
l'hydroquinone, de ses éthers et des corticostéroïdes dans les produits cosmétiques  
éclaircissants de la peau;

Version allemande EN 16956:2017

Gesamtumfang 42 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

## **Nationales Vorwort**

Dieses Dokument (EN 16956:2017) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 392 „Kosmetische Mittel“ (Sekretariat: AFNOR, Frankreich) des Europäischen Komitees für Normung (CEN) erarbeitet.

Für die deutsche Mitarbeit ist der Arbeitsausschuss NA 057-07-01 AA „Kosmetische Mittel“ des DIN-Normenausschusses Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) verantwortlich.

Deutsche Fassung

Kosmetische Mittel —  
Untersuchungsverfahren —  
HPLC/UV-Verfahren für die Identifizierung und Bestimmung  
von Hydrochinon, Hydrochinonethern und Kortikosteroiden  
in hautaufhellenden kosmetischen Mitteln

Cosmetics —  
Analytical methods —  
HPLC/UV method for the identification and  
assay of hydroquinone, ethers of hydroquinone and  
corticosteroids in skin whitening cosmetic products

Cosmétiques —  
Méthodes analytiques —  
Méthode de CLHP couplée à la détection UV pour  
l'identification et l'analyse de l'hydroquinone, de ses  
éthers et des corticostéroïdes dans les produits  
cosmétiques éclaircissants de la peau

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 19. Juni 2017 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim CEN-CENELEC-Management-Zentrum oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, der ehemaligen jugoslawischen Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, der Schweiz, Serbien, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, der Türkei, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG  
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION  
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

CEN-CENELEC Management-Zentrum: Avenue Marnix 17, B-1000 Brüssel

## Inhalt

|                                                                                                                                       | Seite |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Europäisches Vorwort .....                                                                                                            | 3     |
| Einleitung .....                                                                                                                      | 4     |
| 1 Anwendungsbereich .....                                                                                                             | 5     |
| 2 Kurzbeschreibung .....                                                                                                              | 5     |
| 3 Reagenzien .....                                                                                                                    | 5     |
| 4 Geräte und Ausrüstung .....                                                                                                         | 9     |
| 5 Durchführung .....                                                                                                                  | 9     |
| 6 Auswertung .....                                                                                                                    | 10    |
| 7 Untersuchungsbericht .....                                                                                                          | 12    |
| Anhang A (informativ) Beispiele von erhaltenen Chromatogrammen .....                                                                  | 13    |
| Anhang B (informativ) Validierungsdaten für das quantitative Bestimmungsverfahren von<br>Hydrochinon und dessen drei Ethern .....     | 14    |
| Anhang C (informativ) Validierungsdaten für das quantitative Verfahren für die 4 am<br>häufigsten vorgefundenen Kortikosteroide ..... | 21    |
| Anhang D (normativ) Screening-Verfahren zur Identifizierung von Hydrochinon,<br>drei Hydrochinonethern und 38 Kortikosteroiden .....  | 27    |
| Literaturhinweise .....                                                                                                               | 40    |

## **Europäisches Vorwort**

Dieses Dokument (EN 16956:2017) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 392 „Kosmetische Mittel“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis März 2018, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis März 2018 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Die vorhandenen Peer-Review-Validierungsdaten für Hydrochinon sind vorläufig und werden soweit verfügbar durch Ringversuchsdaten ergänzt.

Entsprechend der CEN-CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Serbien, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Türkei, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

## Einleitung

In kosmetischen Mitteln zur Hautaufhellung und Depigmentierung von Hautflecken oder Hautunreinheiten ist die Anwendung von Hydrochinon nicht gestattet. Dessen Verwendung wurde aufgrund seiner zytotoxischen Wirkung geregelt. Hydrochinon und drei von seinen Ethern (Hydrochinonmonomethylether (MME), Hydrochinonmonoethylether (MEE) und Hydrochinonmonobenzylether (MBE)) sind durch die Kosmetikverordnung 1223/2009 geregelt. Heute ist die Anwendung dieser Substanzen in hautaufhellenden kosmetischen Mitteln verboten.

Depigmentierung ist ein Nebeneffekt von topischen Steroiden; auf diese Weise könnten möglicherweise Kortikosteroide als Verbindungen in Produkten eingesetzt werden, die entgegen den Vorschriften als kosmetische Mittel verkauft werden. Kortikosteroide, die am häufigsten in diesen Produkten vorgefunden werden sind Clobetasolpropionat, Fluocinonid, Betamethasondipropionat und Fluocinolonacetonid (siehe Bild 1). Kortikosteroide sind in der Verordnung 1223/2009, Anhang II, „Liste der Stoffe, die in kosmetischen Mitteln verboten sind“ (Referenznummer 300) aufgeführt, und deren Verwendung ist in kosmetischen Mitteln ebenfalls verboten.

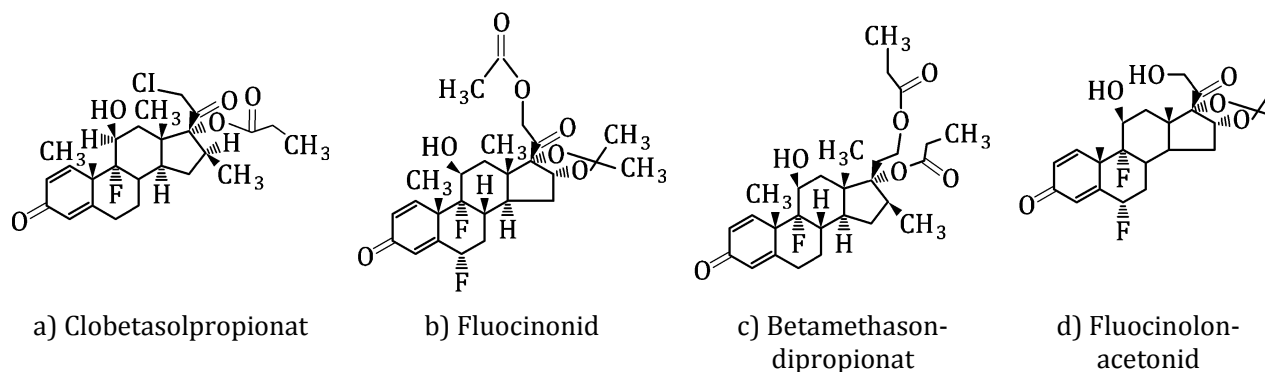


**Bild 1 — Am häufigsten in verbotenen kosmetischen Mitteln vorgefundene Kortikosteroide**

Alle diese Substanzen wirken nach dem gleichen Prinzip wie Hydrochinon, das hauptsächlich in der Hemmung der Melaninsynthese besteht.

Die Kosmetikrichtlinie 95/32/EG [2] enthält ein Untersuchungsverfahren zur Bestimmung von Hydrochinon und drei von dessen Ethern (Hydrochinonmonomethylether (MME), Hydrochinonmonoethylether (MEE) und Hydrochinonmonobenzylether (MBE)) in kosmetischen Mitteln zur Aufhellung der Haut. Zur Aktualisierung und Erweiterung dieses offiziellen Verfahrens im Sinne der Identifizierung und Bestimmung von Kortikosteroiden in kosmetischen Mitteln beschreibt diese Norm ein HPLC/UV-Verfahren für die Identifizierung und Bestimmung von Hydrochinon, Hydrochinonethern und Kortikosteroiden in kosmetischen Mitteln.

## 1 Anwendungsbereich

Diese Europäische Norm legt ein HPLC/UV-Verfahren (Hochleistungsflüssigchromatographie mit UV-Detektion, en: high performance liquid chromatography with UV detection) zur Identifizierung und Quantifizierung von Hydrochinon, drei Hydrochinonethern und vier Kortikosteroiden fest, die am häufigsten in entgegen den Vorschriften verkauften kosmetischen Mitteln zur Hautaufhellung vorgefunden werden: Clobetasolpropionat, Betamethasondipropionat, Fluocinonid und Fluocinolonacetonid.

Diese Norm enthält außerdem HPLC/UV-Verfahren zur Identifizierung von 38 Kortikosteroiden, die in Hautaufhellungsprodukten vorkommen können (siehe Anhang D).

Diese Norm ist nicht für künstliche Nagelprodukte oder Seifen vorgesehen.

## 2 Kurzbeschreibung

Die Probe wird mit einem Wasser/Methanol-Gemisch extrahiert und vorsichtig erwärmt, um die im Produkt vorhandenen Verbindungen herauszulösen. Das erhaltene Gemisch wird filtriert. Die quantitative Bestimmung der in der Lösung vorliegenden Verbindungen erfolgt durch Umkehrphasen-HPLC mit DAD-Nachweis (Diodenarray-Detektor, en: Diode Array Detector).

## 3 Reagenzien

Sofern nicht anders festgelegt, müssen analysenreine Reagenzien verwendet werden; das Wasser muss destilliert oder von entsprechender Reinheit sein. Unter einer „Lösung“ ist, sofern nicht anders festgelegt, eine wässrige Lösung zu verstehen.

### 3.1 Methanol, HPLC-Qualität.

### 3.2 Wasser, HPLC-Qualität.

### 3.3 Extraktionslösung, Methanol/Wasser (1/1).

500 ml Methanol (3.1) und 500 ml Wasser (3.2) werden in einem 1 000-ml-Erlenmeyerkolben gemischt.

### 3.4 Berücksichtigte Verbindungen, siehe Tabelle 1.

**Tabelle 1 — Berücksichtigte Verbindungen**

| Verbindung                     | CAS-Nr.    | Hersteller <sup>a</sup> | Reinheit<br>% | Angewandetes<br>Verfahren —<br>Abschnitt |
|--------------------------------|------------|-------------------------|---------------|------------------------------------------|
| Alclometasondipropionat (ACD)  | 66734-13-2 | USP                     | 99,2          | Anhang D                                 |
| Amcinonid (AMC)                | 51022-69-6 | Sigma                   | 97,9          | Anhang D                                 |
| Beclomethasondipropionat (BCD) | 5534-09-8  | Sigma                   | 99,0          | Anhang D                                 |
| Betamethasonacetat (BMA)       | 987-24-6   | Sigma                   | 98,6          | Anhang D                                 |
| Betamethason (BM)              | 378-44-9   | Sigma                   | 98,4          | Anhang D                                 |
| Betamethasondipropionat (BMD)  | 5593-20-4  | Sigma                   | 98,6          | 2/Anhang D                               |
| Betamethasonvalerat (BMV)      | 2152-44-5  | Sigma                   | 98,1          | Anhang D                                 |
| Budesonid (BUD)                | 51333-22-3 | Ph. Eur.                | 99,7          | Anhang D                                 |

**Tabelle 1** (fortgesetzt)

| <b>Verbindung</b>                    | <b>CAS-Nr.</b> | <b>Hersteller<sup>a</sup></b>    | <b>Reinheit<br/>%</b> | <b>Angewendetes<br/>Verfahren —<br/>Abschnitt</b> |
|--------------------------------------|----------------|----------------------------------|-----------------------|---------------------------------------------------|
| Clobetasolpropionat (CP)             | 25122-46-7     | Sigma                            | 98,8                  | 2/Anhang D                                        |
| Clocortolonpivalat (CLP)             | 34097-16-0     | USP                              | 98,9                  | Anhang D                                          |
| Cortison (CS)                        | 53-06-5        | Sigma                            | 98,3                  | Anhang D                                          |
| Desonid (DSN)                        | 638-94-8       | Cil                              | 98,0                  | Anhang D                                          |
| Desoximetason (DXM)                  | 382-67-2       | Sigma                            | 99,0                  | Anhang D                                          |
| Dexamethasonphosphat (DMPS)          | 2392-39-4      | Sigma                            | 100,2                 | Anhang D                                          |
| Dexamethasonacetat (DMA)             | 1177-87-3      | Sigma                            | 99,0                  | Anhang D                                          |
| Diflorasondiacetat (DFD)             | 33564-31-7     | USP                              | 99,8                  | Anhang D                                          |
| Diflucortolonvalerat (DFCV)          | 59198-70-8     | Schering                         | /                     | Anhang D                                          |
| Difluprednat (DFP)                   | 23674-86-4     | Sigma                            | 99,5                  | Anhang D                                          |
| Flumethasonpivalat (FMP)             | 2002-29-1      | Farmabios                        | 100,4                 | Anhang D                                          |
| Fluocinolonacetonid (FCA)            | 67-73-2        | Sigma                            | 99,6                  | 2/Anhang D                                        |
| Fluocinonid (FCAA)                   | 356-12-7       | Sigma                            | 99,0                  | 2/Anhang D                                        |
| Fluocortolonhexanoat (FCH)           | 303-40-2       | Schering                         | /                     | Anhang D                                          |
| Fluocortolonpivalat (FCP)            | 29205-06-9     | Ph. Eur.                         | /                     | Anhang D                                          |
| Flurandrenolid (FDL)                 | 1524-88-5      | USP                              | /                     | Anhang D                                          |
| Halcinonid (HAL)                     | 3093-35-4      | Sigma                            | 99,0                  | Anhang D                                          |
| Hydrocortison (HC)                   | 3093-25-4      | Sigma                            | 98,0                  | Anhang D                                          |
| Hydrocortisonaceponat (HCAP)         | 74050-20-7     | Toronto<br>Research<br>Chemicals | 98,0                  | Anhang D                                          |
| Hydrocortisonebutyrat (HCB)          | 13609-67-1     | Sigma                            | 99,1                  | Anhang D                                          |
| Hydrocortisonvalerat (HCV)           | 57524-89-7     | Sigma                            | 99,0                  | Anhang D                                          |
| Methylprednisolonacetat (MPLA)       | 53-36-1        | USP                              | 99,8                  | Anhang D                                          |
| Mometasonfuroat (MMF)                | 83919-23-7     | USP                              | 99,8                  | Anhang D                                          |
| Prednicarbat (PCN)                   | 73771-04-7     | Ph. Eur.                         | /                     | Anhang D                                          |
| Prednisolon (PL)                     | 50-24-8        | Aventis Pharma                   | 98,0                  | Anhang D                                          |
| Prednisolonacetat (PLA)              | 52-21-1        | Dr Ehrenstrofer                  | 99,4                  | Anhang D                                          |
| Prednisolonhexanoat (PLH)            | 69164-69-8     | Schering                         | /                     | Anhang D                                          |
| Prednisolonsulfobenzoat-Na<br>(PLSB) | 630-67-1       | Pharmaceutical<br>drug           | /                     | Anhang D                                          |
| Triamcinolon (TRI)                   | 124-94-7       | Sigma                            | 98,2                  | Anhang D                                          |
| Triamcinolonacetonid (TRA)           | 76-25-5        | Sigma                            | 99,6                  | Anhang D                                          |

**Tabelle 1** (fortgesetzt)

| Verbindung                       | CAS-Nr.  | Hersteller <sup>a</sup> | Reinheit<br>% | Angewandetes<br>Verfahren —<br>Abschnitt |
|----------------------------------|----------|-------------------------|---------------|------------------------------------------|
| Hydrochinon (HQ)                 | 123-31-9 | Sigma                   | > 99,9        | 2/Anhang D                               |
| Hydrochinonmonomethylether (MME) | 150-76-5 | Sigma                   | 99,7          | 2/Anhang D                               |
| Hydrochinonmonoethylether (MEE)  | 622-62-8 | Sigma                   | 99,9          | 2/Anhang D                               |
| Hydrochinonmonobenzylether (MBE) | 103-16-2 | Sigma                   | 99,5          | 2/Anhang D                               |
| a Beispiele von Herstellern.     |          |                         |               |                                          |

**3.5 Mobile Phase für die HPLC**, mobile Phase A: Methanol (3.1); mobile Phase B: Wasser (3.2).

### 3.6 Referenzlösungen.

Für die Herstellung von Stammlösungen wird als Lösemittel Methanol (3.1) verwendet. Standardlösungen werden durch Verdünnen in einer Methanol/Wasser-Lösung (3.3) hergestellt.

#### 3.6.1 Standard-Stammlösung von Hydrochinon und dessen drei Ethern (zwischen 1,2 mg/ml und 2,4 mg/ml).

In einen 25-ml-Messkolben eingewogen werden etwa:

- 0,03 g Hydrochinon;
- 0,04 g Hydrochinonmonomethylether;
- 0,05 g Hydrochinonmonoethylether;
- 0,06 g Hydrochinonmonobenzylether.

Zunächst wird in 15 ml Methanol (3.1) gelöst, gegebenenfalls mithilfe eines Schüttelgeräts, und dann wird bis zur Kalibriermarke mit Methanol aufgefüllt. Diese Lösung muss täglich frisch hergestellt werden.

#### 3.6.2 Standard-Stammlösungen (1 mg/ml) und Standard-Arbeitslösung von vier der am häufigsten vorgefundenen Kortikosteroide (10 µg/ml).

In einen 10-ml-Messkolben eingewogen werden separat etwa:

- 10 mg Betamethasondipropionat;
- 10 mg Clobetasolpropionat;
- 10 mg Fluocinonid;
- 10 mg Fluocinolonacetonid.

Zunächst wird in 5 ml Methanol (3.1) gelöst, gegebenenfalls mithilfe eines Schüttelgeräts, und dann wird bis zur Kalibriermarke mit Methanol aufgefüllt. Diese vier Lösungen können bis zu 6 Monate bei 4 °C gelagert werden.

Anschließend wird von vier Kortikosteroiden eine Tochterlösung in einem 100-ml-Messkolben durch Hinzufügen von 1 ml mit einer Glaspipette von jeder Standard-Stammlösung hergestellt. Es wird bis zur Marke mit dem Methanol/Wasser-Gemisch (3.3) aufgefüllt. Diese Lösung kann bis zu 6 Wochen bei 4 °C gelagert werden.

### 3.6.3 Kalibrierlösungen von Hydrochinon und dessen drei Ethern

Die Kalibrierlösungen müssen frisch hergestellt werden (siehe Tabelle 2). Mit einer Glaspipette wird das Volumen der Standard-Stammlösung (3.6.1) in einen Messkolben überführt, und danach wird bis zur Marke mit dem Methanol/Wasser-Gemisch (3.3) aufgefüllt.

**Tabelle 2 — Kalibrierlösungen**

| Nummer der Kalibrierlösung | Volumen der Standard-Stammlösung<br>ml | Volumen des Messkolbens<br>ml | Konzentration der Kalibrierlösungen<br>µg/ml |
|----------------------------|----------------------------------------|-------------------------------|----------------------------------------------|
| 1                          | 0,5                                    | 100                           | 6 - 8 - 10 - 12                              |
| 2                          | 1,0                                    | 50                            | 24 - 32 - 40 - 48                            |
| 3                          | 5,0                                    |                               | 120 - 160 - 200 - 240                        |
| 4                          | 10,0                                   |                               | 240 - 320 - 400 - 480                        |
| 5                          | 20,0                                   |                               | 480 - 640 - 800 - 960                        |

### 3.6.4 Kalibrierlösungen der vier am häufigsten vorgefundenen Kortikosteroide

Die Kalibrierlösungen müssen frisch hergestellt werden (siehe Tabelle 3). Mit einer Glaspipette wird das Volumen der jeweiligen Standard-Tochterlösung (3.6.2) in einen Messkolben überführt, und danach wird bis zur Marke mit dem Methanol/Wasser-Gemisch (3.3) aufgefüllt.

**Tabelle 3 — Kalibrierlösung**

| Nummer der Kalibrierlösung | Volumen der Standard-Stammlösung<br>ml | Volumen des Messkolbens<br>ml | Konzentration der Kalibrierlösungen<br>µg/ml |
|----------------------------|----------------------------------------|-------------------------------|----------------------------------------------|
| 6                          | 5                                      | 100                           | 0,5                                          |
| 7                          | 5                                      | 50                            | 1,0                                          |
| 8                          | 10                                     |                               | 2,0                                          |
| 9                          | 20                                     |                               | 4,0                                          |
| 10                         | 25                                     |                               | 5,0                                          |

## 4 Geräte und Ausrüstung

Zusätzlich zu der üblichen Laborausstattung ist Folgendes erforderlich.

**4.1 Analysenwaage**, mit einer Fehlergrenze von 0,1 mg.

**4.2 Laborschüttelgerät.**

**4.3 Wasserbad**, geeignet zum Erwärmen auf 60 °C.

**4.4 Hochleistungsflüssigchromatograph**, bestehend aus:

- Probenahmeverrichtung;
- Pumpensystem mit Gradientenfunktion;
- Entgasungseinrichtung;
- Säulenofen;
- Photodiodenarray-Detektor;
- Auswerteeinrichtung.

**4.5 Membranfilter**, für die Probenfiltration, z. B. aus Polypropylen, 0,45 µm Porengröße.

**4.6 Analytische Trennsäule**, z. B. Thermo Fisher Scientific Hypurity Aquastar C18-Trennsäule<sup>1)</sup>, Länge = 0,25 m, Innendurchmesser = 4,6 mm, Partikelgröße = 5 µm im Durchmesser.

**4.7 Papierfilter**, für die Probenfiltration, z. B. Faltenfilter, Mediumqualität, 210 mm im Durchmesser.

## 5 Durchführung

### 5.1 Probenvorbereitung

0,5 g der Probe werden in einen 100-ml-Messkolben eingewogen. 50 ml Extraktionslösung (3.3) werden hinzugefügt und mit einem Laborschüttelgerät geschüttelt, bis eine homogene Suspension gebildet ist. Das Gemisch wird für 5 min in einem Wasserbad bei 60 °C untergebracht, um den Lösevorgang zu verbessern. Falls erforderlich, wird das Schütteln mit einem Laborschüttelgerät wiederholt. Der Messkolben wird auf Raumtemperatur abgekühlt und mit dem Extraktionsgemisch (3.3) auf 100 ml aufgefüllt. Der Extrakt wird durch einen Papierfilter und anschließend durch einen Membranfilter (0,45 µm) filtriert. Das Filtrat wird innerhalb der folgenden 24 h in eine HPLC-Anlage nach 5.2 injiziert.

---

1) Dies ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung dieser genannten Produkte durch CEN. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu den gleichen Ergebnissen führen.

## 5.2 Messbedingungen bei der Flüssigchromatographie

Bei Anwendung des Geräts (4.4) und der Säule (4.6) haben sich die folgenden Bedingungen als brauchbar erwiesen:

- Flussrate: 1,5 ml/min
- Erfassungszeit (Analysedauer): 25 min
- Injektionsvolumen: 10 µl
- Säulenofentemperatur:  $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$
- Nachweis: Diodenarray-Nachweis bei den Wellenlängen: 240 nm (Kortikosteroide) und 295 nm (Hydrochinon und dessen Ether)
- Mobile Phasen: Mobile Phase A: Methanol  
Mobile Phase B: Wasser

Siehe Tabelle 4 für die Gradiententrennung.

**Tabelle 4 — Gradiententrennung**

| Zeit<br>min | Volumenanteil Mobile Phase A<br>% | Volumenanteil Mobile Phase B<br>% |
|-------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 0           | 5                                 | 95                                |
| 20          | 80                                | 20                                |
| 21          | 5                                 | 95                                |
| 25          | 5                                 | 95                                |

## 5.3 Nachweis

Der Nachweis und die quantitative Bestimmung können mittels DAD durchgeführt werden ( $\lambda = 240 \text{ nm}$  und  $\lambda = 295 \text{ nm}$ ).

## 6 Auswertung

### 6.1 Identifizierung

Hydrochinon, Hydrochinonether und Kortikosteroide werden durch Vergleich der Retentionszeiten und UV-Spektren der Probe mit denen der in der Standardlösung enthaltenen Substanzen identifiziert.

Tabelle 5 enthält chromatographische Parameter für die Identifizierung von Verbindungen mit dem in 5.2 vorgeschlagenen Untersuchungsverfahren. Anhang A enthält Chromatogramme von Standardlösungen bei den beiden untersuchten Wellenlängen.

**Tabelle 5 — Chromatographische Parameter für die Identifizierung von Verbindungen**

| Verbindung                       | <i>R<sub>t</sub></i><br>min | <i>λ</i><br>nm |
|----------------------------------|-----------------------------|----------------|
| Hydrochinon                      | 4,24                        | 295            |
| Hydrochinonmonomethylether (MME) | 9,34                        | 295            |
| Hydrochinonmonoethylether (MEE)  | 12,08                       | 295            |
| Hydrochinonmonobenzylether (MBE) | 17,54                       | 295            |
| Fluocinolonacetonid (FCA)        | 17,73                       | 240            |
| Fluocinonid (FCAA)               | 19,60                       | 240            |
| Clobetasolpropionat (CP)         | 20,55                       | 240            |
| Betamethasondipropionat (BMD)    | 21,44                       | 240            |

## 6.2 Quantitative Bestimmung

Die quantitative Bestimmung wird durch Anwendung der linearen Regression anhand von Peakflächen der externen Standardlösungen durchgeführt. Die Kalibrierkurve muss linear und der Korrelationskoeffizient muss größer oder gleich 0,995 sein.

Der Massenanteil der Verbindung, in g/100 g der Probe, wird nach folgender Gleichung berechnet:

$$R = \frac{C \cdot V \cdot 100 \cdot F}{1\,000 \cdot SW}$$

Dabei ist

- R* das Ergebnis der Konzentration, in Prozent % (g/100 g);
- C* die Konzentration, in g/l oder in mg/ml, der Verbindungen die in der gegebenen Probenlösung durch die HPLC-Auswertung nachgewiesen wurden;
- V* das Volumen der Verdünnung für die Probe, in ml;
- SW* das Masse der Probe, in g;
- F* der mögliche Verdünnungsfaktor.

## 6.3 Angabe der Ergebnisse

Die Menge wird in % oder in g/100 g angegeben und auf das nächste Zehntelprozent gerundet.

Die Anhänge B und C enthalten Validierungsdaten.