

DIN EN 16956



ICS 71.100.70

Einsprüche bis 2016-03-08

Entwurf

**Kosmetische Mittel –
Untersuchungsverfahren –
HPLC/UV Verfahren für die Identifizierung und Bestimmung von
Hydrochinon, Hydrochinonethern und Kortikosteroide in
hautaufhellenden kosmetischen Mitteln;
Deutsche und Englische Fassung prEN 16956:2016**

Cosmetics –

Analytical methods –

HPLC/UV method for the identification and assay of hydroquinone, ethers of hydroquinone and corticosteroids in skin whitening cosmetic products;

German and English version prEN 16956:2016

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;

Version allemande et anglaise prEN 16956:2016

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2016-01-08 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfes besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal des DIN unter www.entwuerfe.din.de bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an nal@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/stellungnahme oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL), 10772 Berlin (Hausanschrift: Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin).

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 71 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 16956:2016) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 392 „Kosmetische Mittel“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom AFNOR (Frankreich) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-07-01 AA „Kosmetische Mittel“ des DIN-Normenausschusses Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung des prEN 16956 beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

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

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

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

ICS:

Deskriptoren

Dokument-Typ: Europäische Norm

Dokument-Untertyp:

Dokument-Stage: CEN-Umfrage

Dokument-Sprache: D

STD Version 2.7g

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
Einleitung	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Kurzbeschreibungen	5
2.1 Identifizierung und Quantifizierung von Hydrochinon, drei Hydrochinonethern und vier der am häufigsten vorgefundenen Kortikosteroide	5
2.2 Screening-Verfahren zur Identifizierung von Hydrochinon, drei Hydrochinonestern und 38 Kortikosteroiden	5
3 Reagenzien	5
4 Geräte und Hilfsmittel	10
5 Durchführung	11
5.1 Probenvorbereitung	11
5.1.1 Probenvorbereitung für Identifizierungs- und Quantifizierungsverfahren, siehe 2.1	11
5.1.2 Probenvorbereitung für die Screening-Verfahren, siehe 2.2	12
5.1.3 Messbedingungen bei der Flüssigchromatographie	12
5.1.4 Nachweis	13
6 Auswertung	13
6.1 Auswertung für Identifizierungs- und Quantifizierungsverfahren, siehe 2.1	13
6.1.1 Identifizierung	13
6.1.2 Quantitative Bestimmung	14
6.1.3 Auswertung	14
6.2 Auswertung für die Screening-Verfahren, siehe 2.2	14
6.2.1 Identifizierung	14
7 Prüfbericht	17
Anhang A (informativ) Beispiele von erhaltenen Chromatogrammen (siehe 2.1)	18
Anhang B (informativ) Validierungsdaten für das quantitative Bestimmungsverfahren von Hydrochinon und dessen drei Ethern (siehe 2.1)	19
Anhang C (informativ) Validierungsdaten für das quantitative Verfahren – Die vier am häufigsten vorgefundenen Kortikosteroide (siehe 2.1)	24
Anhang D (informativ) Beispiel von Chromatogrammen, erhalten mit Standardlösungen von 50 µg/ml (siehe 2.2)	30
Anhang E (informativ) Alternatives HPLC/UV-Verfahren zur Identifizierung von coeluierten Verbindungen unter Anwendung des HPLC-Screening-Verfahrens (siehe 2.2)	33
Anhang F (informativ) Mit dem HPLC-Haupt-Screening-Verfahren erhaltene Validierungsdaten (siehe 2.2)	34
Literaturhinweise	36

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 16956:2016) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 392 „Kosmetische Mittel“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom AFNOR gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Einleitung

Hydrochinon wird in kosmetischen Produkten nicht mehr zur Hautaufhellung und Depigmentierung von Hautflecken oder Hautunreinheiten verwendet. Aufgrund seiner zytotoxischen Wirkung wurde dessen Verwendung reglementiert. Hydrochinon und drei von dessen Ethern (Hydrochinonmonomethylether (MME), Hydrochinonmonoethylether (MEE) und Hydrochinonmonobenzylether (MBE)) werden seit dem 11. Juli 2013 von der Kosmetikverordnung 1223/2009 geregelt. Heute ist dessen Verwendung 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 Produkten vorgefunden werden, die entgegen den Vorschriften als kosmetische Mittel verkauft werden, sind Clobetasolpropionat, Fluocinonid, Betamethasondipropionat und Fluocinolonacetonid (siehe Bild 1). Kortikosteroide sind in der Liste I von Giften (6 Art.L.5132-CSP) und in der Verordnung 1223/2009, Anhang II, „Liste der Stoffe, die in kosmetischen Mitteln verboten sind“ (Referenznummer 300) registriert, und als solche ist deren Verwendung in kosmetischen Mitteln verboten.

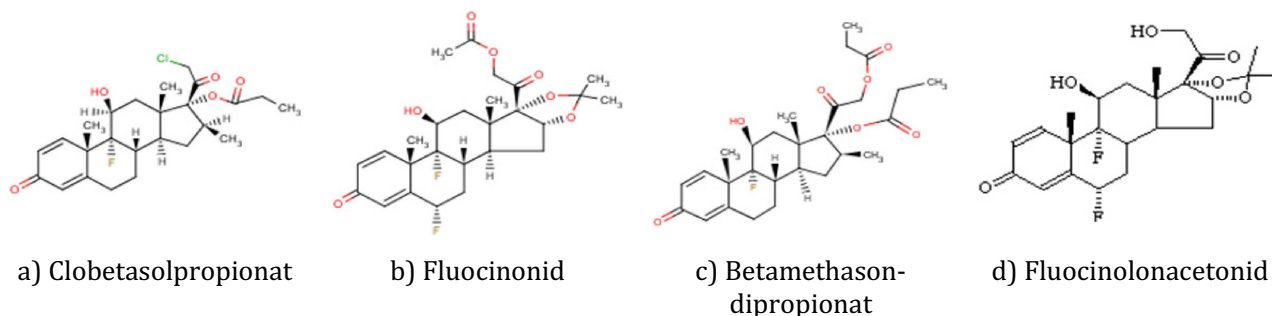


Bild 1 — Am häufigsten in verbotenen kosmetischen Mitteln vorgefundene Kortikosteroide

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

Die Kosmetikrichtlinie 95/32/EG [2] bietet ein analytisches Verfahren zur Bestimmung von Hydrochinon und von dreien seiner Ether (Hydrochinonmonomethylether (MME), Hydrochinonmonoethylether (MEE) und Hydrochinonmonobenzylether (MBE)) in kosmetischen Mitteln zur Aufhellung der Haut. Zur Aktualisierung und Erweiterung dieses offiziellen Verfahrens für die Identifizierung und Bestimmung von Kortikosteroiden in kosmetischen Produkten beschreibt diese Norm ein HPLC/UV-Verfahren für die Identifizierung und Bestimmung von Hydrochinon, Hydrochinonethern und Kortikosteroiden in kosmetischen Produkten.

1 Anwendungsbereich

Diese Europäische Norm legt ein HPLC/UV-Verfahren zur Bestimmung 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 schlägt außerdem HPLC/UV-Verfahren zur Identifizierung von 38 Kortikosteroiden vor, die in Hautaufhellungsprodukten vorkommen könnten. Tatsächlich könnten Kortikosteroide trotz der Tatsache, dass deren Verwendung verboten ist, absichtlich in kosmetischen Mitteln zur Hautaufhellung eingebracht werden; eine Identifizierung des Vorhandenseins einer dieser unzulässigen Verbindungen könnte für eine Überwachung und Marktuntersuchung ausreichen.

Diese Norm ist nicht für künstliche Nagelpflegeprodukte oder Seifen vorgesehen.

2 Kurzbeschreibungen

2.1 Identifizierung und Quantifizierung von Hydrochinon, drei Hydrochinonethern und vier der am häufigsten vorgefundenen Kortikosteroide

Die in Betracht kommenden Kortikosteroide sind Clobetasolpropionat, Betamethasondipropionat, Fluocinonid und Fluocinolonacetonid.

Die Probe wird mit einem Wasser-Methanol-Gemisch unter vorsichtigem Erwärmen extrahiert, 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.

2.2 Screening-Verfahren zur Identifizierung von Hydrochinon, drei Hydrochinonestern und 38 Kortikosteroiden

Weil Kortikosteroide in kosmetischen Mitteln nicht zu verwenden sind und als Kontaminanten oder Verunreinigungen nicht vorhanden sein dürfen, könnte eine Identifizierung des Vorhandenseins einer dieser unerlaubten Verbindungen für Marktforschung und -überwachung ausreichend sein. Sobald unerlaubte Kortikosteroide identifiziert sind, könnte dann gegebenenfalls eine genaue Quantifizierung dieser Verbindungen unter Anwendung geeigneter validierter Verfahren vorgenommen werden.

Die Probe wird mit einem Wasser-Methanol-Gemisch unter vorsichtigem Erwärmen extrahiert, um die im Produkt vorhandenen Verbindungen herauszulösen. Das erhaltene Gemisch wird filtriert. Die Bestimmung der in der Lösung vorliegenden Verbindungen erfolgt durch Umkehrphasen-HPLC mit DAD-Nachweis.

Um alle Verbindungen zu trennen, sind zwei Elutionsgradienten notwendig. Der Hauptlösungsgradient ermöglicht in 45 min die Trennung von 39 Verbindungen unter den 43 in Betracht gezogenen Verbindungen. Für nicht getrennte Verbindungen wird eine ergänzende Gradientenelution unter Verwendung der gleichen Lösemittel vorgeschlagen.

3 Reagenzien

Sofern nicht anders festgelegt, sind analysenreine Reagenzien zu verwenden; 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 ^a	Reinheit %	Angewendetes Verfahren – Abschnitt
Alclometasondipropionat (ACD)	66734-13-2	USP	99,2	2.2
Amcinonid (AMC)	51022-69-6	Sigma	97,9	2.2
Beclomethasondipropionat (BCD)	5593-20-4	Sigma	99	2.2
Betamethasonacetat (BMA)	987-24-6	Sigma	98,6	2.2
Betamethason (BM)	378-44-9	Sigma	98,4	2.2
Betamethasondipropionat (BMD)	5593-20-4	Sigma	98,6	2.1/2.2
Betamethasonvalerat (BMV)	2152-44-5	Sigma	98,1	2.2
Budesonid (BUD)	51333-22-3	Ph. Eur.	99,7	2.2
Clobetasolpropionat (CP)	25122-46-7	Sigma	98,8	2.1/2.2
Clocortolonpivalat (CLP)	34097-16-0	USP	98,9	2.2
Cortison (CS)	53-06-5	Sigma	98,3	2.2
Desonid (DSN)	638-94-8	Cil	98	2.2
Desoximetason (DXM)	382-67-2	Sigma	99	2.2
Dexamethasonphosphat (DMPS)	2392-39-4	Sigma	100,2	2.2
Dexamethasonacetat (DMA)	1177-87-3	Sigma	99	2.2
Diflorasondiacetat (DFD)	33564-31-7	USP	99,8	2.2
Diflucortolonvalerat (DFCV)	59198-70-8	Schering	/	2.2
Difluprednat (DFP)	23674-86-4	Sigma	99,5	2.2
Flumethasonpivalat (FMP)	2002-29-1	Farmabios	100,4	2.2
Fluocinolonacetat (FCA)	67-73-2	Sigma	99,6	2.1/2.2
Fluocinonid (FCAA)	356-12-7	Sigma	99	2.1/2.2
Fluocortolonhexanoat (FCH)	303-40-2	Schering	/	2.2
Fluocortolonpivalat (FCP)	29205-06-9	Ph. Eur.	/	2.2
Flurandrenolid (FDL)	1524-88-5	USP	/	2.2
Halcinonid (HAL)	3093-35-4	Sigma	99	2.2
Hydrocortison (HC)	3093-25-4	Sigma	98	2.2
Hydrocortisonaceponat (HCAP)	74050-20-7	Toronto Research Chemicals	98	2.2

Verbindung	CAS-Nr.	Hersteller^a	Reinheit %	Angewandetes Verfahren - Abschnitt
Hydrocortisonebutyrat (HCB)	13609-67-1	Sigma	99,1	2.2
Hydrocortisonvalerat (HCV)	57524-89-7	Sigma	99	2.2
Methylprednisolonacetat (MPLA)	53-36-1	USP	99,8	2.2
Mometasonfuroat (MMF)	83919-23-7	USP	99,8	2.2
Prednicarbat (PCN)	73771-04-7	Ph. Eur.	/	2.2
Prednisolon (PL)	50-24-8	Aventis Pharma	98	2.2
Prednisolonacetat (PLA)	52-21-1	Dr Ehrenstorfer	99,4	2.2
Prednisolonhexanoat (PLH)	69164-69-8	Schering	/	2.2
Prednisolonsulfobenzoat-Natrium (PLSB)	630-67-1	Pharmaceutical drug	/	2.2
Triamcinolon (TRI)	124-94-7	Sigma	98,2	2.2
Triamcinolonacetamid (TRA)	76-25-5	Sigma	99,6	2.2
Hydrochinon (HQ)	123-31-9	Sigma	> 99,9	2.1/2.2
Hydrochinonmonomethylether (MME)	150-76-5	Sigma	99,7	2.1/2.2
Hydrochinonmonoethylether (MEE)	622-62-8	Sigma	99,9	2.1/2.2
Hydrochinonmonobenzylether (MBE)	103-16-2	Sigma	99,5	2.1/2,2
^a Beispiele von Herstellern				

3.5 Mobile Phase für die HPLC in 3.7.1, Mobile Phase A: Methanol (3.1); Mobile Phase B: Wasser (3.2).

3.6 Spezifische Reagenzien für die Screening-Verfahren, siehe 2.2.

3.6.1 Acetonitril, HPLC-Qualität.

3.6.2 Ameisensäure, Reinheit > 98 %.

3.6.3 Ethanol, HPLC-Qualität.

3.6.4 Mobile Phase für HPLC in 3.7.2

Mobile Phase A: 1,0 ml Ameisensäure (3.6.2) wird zu 500 ml Acetonitril (3.6.1) in einem 1-l-Messkolben hinzugefügt. Zum Durchmischen wird umgeschwenkt und mit Acetonitril (3.6.1) verdünnt. Die endgültige Lösung ist 0,1%ige Ameisensäure in Acetonitril.

Mobile Phase B: 1,0 ml Ameisensäure (3.6.2) wird zu 500 ml Wasser (3.2) in einem 1-l-Messkolben hinzugefügt. Zum Durchmischen wird umgeschwenkt und mit Wasser (3.2) verdünnt. Die endgültige Lösung ist 0,1%ige Ameisensäure in wässriger Lösung.

3.7 Kalibrierlösungen

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

3.7.1 Besondere Kalibrierlösungen für Identifizierungs- und Quantifizierungsverfahren, siehe 2.1.

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

In einen 25-ml-Messkolben werden etwa:

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

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

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

In einen 10 ml Messkolben werden separat etwa:

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

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

Anschließend wird von den vier Kortikosteroiden eine Tochterlösung in einem 100-ml-Messkolben durch Hinzufügen von 1 ml mit einer Glaspipette von jeder Standard-Stammlösung hergestellt. Das Volumen wird bis zur Marke mit dem Methanol-Wasser-Gemisch (3.3) aufgefüllt.

3.7.1.3 Kalibrierlösungen von Hydrochinon und dessen drei Ethern

Die Kalibrierlösungen müssen frisch hergestellt werden (siehe Tabelle 2). Mit einer Glaspipette wird das jeweilige Volumen der Standard-Stammlösung (3.7.1.2) in einen Messkolben überführt, und danach wird das Volumen bis zur Marke mit dem Methanol-Wasser-Gemisch (3.3) aufgefüllt.

Tabelle 2 — Kalibrierlösungen

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

3.7.1.4 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 (3.7.1.3) in einen Messkolben überführt, und danach wird das Volumen bis zur Marke mit dem Methanol-Wasser-Gemisch (3.3) aufgefüllt.

Tabelle 3 — Kalibrierlösung

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

3.7.2 Besondere Kalibrierlösungen für die Screening-Verfahren, siehe 2.2.

3.7.2.1 Stammlösung des Referenzstoffes des internen Standards (1 000 µg/ml)

Für die Bestimmung der relativen Retentionszeit (RRT) der vorhandenen Stoffe wird eine Stammlösung des Referenzstoffes Propylparaben des internen Standards durch Einwiegen von etwa 10 mg in einen 10-ml-Messkolben hergestellt. Zunächst wird es in einer kleinen Menge Methanol (3.1) gelöst und dann wird das Volumen bis zur Marke mit Methanol aufgefüllt.

In dieser Norm werden, berechnet für in der Probe enthaltene Stoffe, Hydrochinon, Hydrochinonether und Kortikosteroide durch Vergleich der relativen Retentionszeit (RRT) mit denen von Standardlösungen identifiziert. Wenn Propylparaben oder eine störende Verbindung in der Probe enthalten ist, könnte die Identifizierung direkt über die Retentionszeit (anstatt der RR) durchgeführt werden. Bei Bedarf könnte auch eine Bestätigung der Identität der Verbindung unter Einsatz einer aufgestockten Probe oder mit massenspektrometrischem Nachweis durchgeführt werden (d. h. verwendete mobile Phasen sind mit der LC-MS-Analyse kompatibel).

3.7.2.2 Standard-Stammlösungen (1 000 µg/ml)

Von jeder Standardsubstanz nach Tabelle 6 werden durch Einwägen von etwa 10,0 mg in einem 10-ml-Messkolben Stammlösungen hergestellt. Zunächst wird die Substanz in einer kleinen Menge Methanol (3.1) gelöst und anschließend wird das Volumen bis zur Marke mit Methanol aufgefüllt.

3.7.2.3 Qualitative Analyse (Identifizierung)

3.7.2.3.1 Screening-Standardlösungen

Von jeder ausgewählten Stammlösung werden 250 µl durch Vermischen in einem 5-ml-Messkolben vier Standardlösungen (Gemische A, B, C und D) hergestellt. Die Messkolben werden bis zur Marke mit Methanol aufgefüllt.

3.7.2.3.2 Gemischte Standardlösung A (50 µg/ml), Hydrochinon (HQ), Clobetasolpropionat (CP), Flucanid (FCAA), Hydrochinonmonomethylether (MME), Hydrochinonmonobenzylether (MBE), Hydrochinonmonoethylether (MEE), Betamethasondipropionat (BMD), Fluocinolonacetonid (FCA).

3.7.2.3.3 Gemischte Standardlösung B (50 µg/ml), Hydrocortison (HC), Prednisolonsulfobenzoat (PLSB), Triamcinolonacetonid (TRA), Prednisolonacetat (PLA), Dexamethasonacetat (DMA) Hydrocortisonvalerat (HCV), Difluprednat (DFP), Amcinonid (AMC), Difluocortolonvalerat (DFCV), Fluocortolonpivalat (FCP), Fluocortolonhexanoat (FCH).

3.7.2.3.4 Gemischte Standardlösung C (50 µg/ml), Triamcinolon (TRI), Prednisolon (PL), Betamethason (BM), Desoximethason (DXM), Betamethasonacetat (BMA), Hydrocortisonbutyrat (HCB), Diflorasondiacetat (DFD), Halcinonid (HAL), Prednisolonhexanoat (PLH), Prednicarbat (PCN), Beclometasondipropionat (BCD).

3.7.2.3.5 Gemischte Standardlösung D (50 µg/ml), Dexamethasonphosphat (DMPS), Cortison (CS), Flurandrenolid (FDL), Desonid (DSN), Budesonid (BUD), Betamethasonvalerat (BMV), Flumethasonpivalat (FMP), Alclometasondipropionat (ACD), Mometasonfuroat (MMF), Clacortolonpivalat (CLP).

Zur Identifizierung wird eine gründlich durchmischte Standardzubereitung durch Mischen von 1 ml von jeder vorhergehend gemischten Standardlösung (A, B, C und D) in einem 5-ml-Messkolben hergestellt. Zu dieser Zubereitung werden 100 µl der ISTD-Stammlösung (3.7.2.2) hinzugefügt. Das Volumen wird bis zur Marke mit Methanol aufgefüllt, und die Zubereitung wird zum Identifizieren der Kortikosteroide, die in der analysierten Probe vorhanden sein können, injiziert. Die gründlich durchmischte Standardlösung hat von jedem Kortikosteroid eine Konzentration von 10 µg/ml und von der ISTD 20 µg/ml.

Alternativ kann direkt eine einzige gemischte Zubereitung aller Standards durch Mischen von 100 µl von jeder Stammlösung (3.7.2.2) in einem 10-ml-Messkolben vorbereitet werden. Dann werden 200 µl der ISTD-Stammlösung (3.7.2.2) hinzugefügt. Das Volumen wird bis zur Marke mit Methanol aufgefüllt, und die Zubereitung wird injiziert, um das Kortikosteroid, das in der analysierten Probe vorhanden sein kann, zu identifizieren.

4 Geräte und Hilfsmittel

Zusätzlich zu der üblichen Laborausstattung ist Folgendes erforderlich.

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

4.2 Laborschüttelgerät

4.3 Wasserbad, mit der Möglichkeit zum Erwärmen auf 60 °C.

4.4 Hochleistungsflüssigchromatograph, bestehend aus:

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

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

4.6 Spezielle Geräte und Hilfsmittel für Identifizierungs- und Quantifizierungsverfahren, siehe 2.1.

4.6.1 Analytische Trennsäule, z. B. Thermo Fisher Scientific Hypurity Aquastar C18-Trennsäule¹⁾, Länge = 0,25 m, Innendurchmesser = 4,6 mm, Partikelgröße = 5 µm im Durchmesser.

4.6.2 Membranfilter, für die Probenfiltration, z. B. Polypropylen, Porengröße 0,45 µm.

4.6.3 Papierfilter, für die Probenfiltration, z. B. gefaltet, Mediumqualität, 210 mm, b/100.

4.7 Spezielle Geräte und Hilfsmittel für Screening-Verfahren, siehe 2.2.

4.7.1 Ultraschallbad, mit temperaturgeregelter Heizung.

4.7.2 Magnetrührer.

4.7.3 Analytische Trennsäule, z. B. Zorbax Phenyl, l = 0,25 m, Ø = 4,6 mm, d_p = 5 µm.²⁾

5 Durchführung

5.1 Probenvorbereitung

5.1.1 Probenvorbereitung für Identifizierungs- und Quantifizierungsverfahren, siehe 2.1.

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. Die Extraktflüssigkeit wird durch einen Papierfilter filtriert und anschließend durch einen Membranfilter (0,45 µm). Das Filtrat wird innerhalb der folgenden 24 Stunden in eine HPLC-Anlage nach 5.1.3.1 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.

2) Das 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.

5.1.2 Probenvorbereitung für die Screening-Verfahren, siehe 2.2.

1 g Probe wird eingewogen. Die Probe wird in der Hälfte des Volumens der Extraktionslösung (3.3, etwa 25 ml) durch kräftiges Schütteln mit einem Laborschüttelgerät dispergiert, bis eine homogene Suspension erreicht ist (es könnte ein Ultraschallbad angewendet werden, um die Extraktion zu verbessern). Falls erforderlich, wird das Gemisch für 5 min in einem Wasserbad bei 60 °C untergebracht, um die Dispersion zu verbessern, es wird abgekühlt und mit der Extraktionslösung (3.3) auf 50 ml eingestellt. Die Probe wird für 30 min bis 1 h mit einem Magnetrührer gerührt und anschließend durch ein Acrodisc Premium-Filter von 0,45 µm Porengröße filtriert. Das Filtrat wird in die HPLC-Anlage injiziert.

5.1.3 Messbedingungen bei der Flüssigchromatographie

5.1.3.1 Bedingungen für Identifizierungs- und Quantifizierungsverfahren, siehe 2.1.

Bei Anwendung der HPLC-Anlage (4.4) und der analytischen Trennsäule (4.6.1) haben sich die folgenden Bedingungen als brauchbar erwiesen:

- Flussrate: 1,5 ml/min
- Erfassungszeit (Analysedauer): 25 min
- Injektionsvolumen: 10 µl
- Säulenofentemperatur: (36 ± 2) °C
- Nachweis: Diodenarray-Nachweis mit 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 min	Volumenanteil Mobile Phase A %	Volumenanteil Mobile Phase B %
0	5	95
20	80	20
21	5	95
25	5	95

5.1.3.2 Bedingungen für die Screening-Verfahren, siehe 2.2.

Bei Anwendung der HPLC-Anlage (4.4) und der analytischen Trennsäule (4.7.3) haben sich die folgenden Bedingungen als brauchbar erwiesen:

- Flussrate: 1,0 ml/min
- Erfassungszeit: 45 min
- Injektionsvolumen: 10 µl
- Autosamplertemperatur: 5 °C

- Säulenofentemperatur: 45 °C
- Nachweis: DAD mit den Wellenlängen: 240 nm (Kortikoide) und 295 nm (Hydrochinon und dessen Ether)
- Mobile Phasen: Mobile Phase A: 0,1 % Ameisensäure in Acetonitril
Mobile Phase B: 0,1 % Ameisensäure in Wasser

Siehe Tabelle 5 für die Gradiententrennung.

Tabelle 5 — Gradiententrennung

Zeit min	Volumenanteil Mobile Phase A %	Volumenanteil Mobile Phase B %
0	95	5
2	95	5
7	60	40
25	60	40
45	30	70
46	95	5
50	95	5

5.1.4 Nachweis

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

6 Auswertung

6.1 Auswertung für Identifizierungs- und Quantifizierungsverfahren, siehe 2.1

6.1.1 Identifizierung

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

Tabelle 6 enthält chromatographische Parameter für die Identifizierung von Verbindungen mit dem in 5.1.3.1 vorgeschlagenen Analysenverfahren. Anhang A enthält Chromatogramme von Standardlösungen bei den beiden untersuchten Wellenlängen.

Tabelle 6 — Chromatographische Parameter für die Identifizierung von Verbindungen

Verbindung	<i>R_t</i> min	<i>λ</i> 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

6.1.2 Quantitative Bestimmung

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

Der Massenanteil der Verbindung, in g je 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 % (µg/100 g);
- C* die Konzentration der Verbindungen, in g/l, die in der gegebenen Probenlösung durch die HPLC-Bewertung nachgewiesen werden;
- V* das Volumen der Verdünnung für die Probe, in ml;
- SW* das Gewicht der Probe, in g;
- F* der mögliche Verdünnungsfaktor.

6.1.3 Auswertung

Die Menge wird in Prozent oder in g je 100 g angegeben und auf das nächste Zehntelprozent gerundet.

Die Anhänge B und C enthalten Validierungsdaten.

6.2 Auswertung für die Screening-Verfahren, siehe 2.2

6.2.1 Identifizierung

Hydrochinon und Kortikosteroide werden durch Vergleich der relativen Retentionszeit (RRT) der Probe mit denen von Standardlösungen ermittelt. Tabelle 7 enthält chromatographische Parameter für die Identifizierung von Verbindungen mit dem vorgeschlagenen Analysenverfahren.

Um die Spezifität des Nachweises sicherzustellen, muss die Identifizierung der Hautaufhellungsverbindung in zwei Schritten durchgeführt werden. Zunächst wird eine vorausgehende Identifizierung des in der Probenlösung vorhandenen Aufhellungsmittels mit RR und gegebenenfalls DAD-Spektren durchgeführt. Empfohlen wird, sobald die Verbindung identifiziert ist, eine Injektion einer Standardlösung von diesem identifizierten Aufhellungsmittel vorzunehmen, um die korrekte Identifizierung sicherzustellen. Bei Bedarf kann dann eine Bestätigung der Identität der Verbindung auch unter Verwendung einer aufgestockten Zubereitung oder mit massenspektrometrischem Nachweis durchgeführt werden (d. h. verwendete mobile Phasen sind mit der LC-MS-Analyse kompatibel).

Weil Verbindungen von Hautaufhellungsmitteln meist einzeln, oder höchstens zwei, in Produkten zur Hautaufhellung vorhanden sind, könnte die in Anhang D zwischen einigen chromatographischen Peaks beobachtete geringe Auflösung als ausreichend angesehen werden. Tatsächlich sollte die chromatographische Trennung nur Identifizierungen von Peaks ermöglichen; eine Auflösung zwischen den Peaks höher als 1,5 ist nicht zwingend notwendig. Eine vollständige Trennung ($R_s > 1,5$) der neun Aufhellungsverbindungen (HQ, MME, MEE, FCA, MBE, FCAA, BMV, CP und BMD) ist bereits, jedoch unter Anwendung des Hauptverfahrens, in der Literatur beschrieben.

Chromatographische Parameter für die Identifizierung von Verbindungen sind in der Tabelle 7 angegeben.

Tabelle 7 — Chromatographische Parameter für die Identifizierung von Verbindungen

Verbindung	<i>R_t</i> min	<i>RR</i>	λ nm
Hydrochinon (HQ) ^a	5,90	0,41	295
Hydrocortisonaceponat (HCAP) ^b	9,87	0,68	240
Methoxyphenol (MME) ^a	10,14	0,70	295
Triamcinolon (TRI)	11,15	0,77	240
Dexamethasonphosphat (DMPS)	11,36	0,78	240
Ethoxyphenol (MEE) ^a	11,28	0,78	295
Hydrocortison (HC)	12,64	0,87	240
Prednisolon (PL)	12,81	0,88	240
Cortison (CS)	13,11	0,90	240
Betamethason (BM)	14,22	0,98	240
Prednisolonsulfobenzoat (PLSB)	14,76	1,01	240
Flurandrenolid (FDL)	16,75	1,15	240
Fluocinolonacetonid (FCA) ^a	16,96	1,17	240
Triamcinolonacetonid (TRA)	17,25	1,19	240
Monobenzon (MBE) ^a	17,74	1,22	295
Desoxymethason (DXM)	18,47	1,27	240
Desonid (DSN)	18,75	1,29	240
Prednisolonacetat (PLA)	18,97	1,30	240
Betamethasonacetat (BMA)	21,35	1,47	240
Methylprednisolonacetat (MPLA) ^b	21,87	1,50	240

Verbindung	Rt min	RR	λ nm
Dexamethasonacetat (DMA)	22,97	1,58	240
Hydrocortisonbutyrat (HCB)	25,66	1,76	240
Budesonid 1 (BUD1)	27,67	1,90	240
Budesonid 2 (BUD2)	30,16	2,07	240
Fluocinonid (FCAA) ^a	31,49	2,16	240
Hydrocortisonvalerat (HCV)	31,93	2,19	240
Diflorasondiacetat (DFD)	32,41	2,23	240
Betamethasonvalerat (BMV)	35,15	2,42	240
Difluprednat (DFP) ^c	35,71	2,45	240
Halcinonide (HAL) ^c	35,71	2,45	240
Flumethasonpivalat (FMP)	37,86	2,60	240
Amcinonid (AMC)	38,22	2,63	240
Clobetasolpropionat (CP) ^a	38,89	2,67	240
Prednisolonhexanoat (PLH)	39,31	2,70	240
Alclomethasondipropionat (ACD)	39,98	2,75	240
Betamethasondipropionat (BMD) ^a	40,18	2,76	240
Prednicarbat (PCN)	40,46	2,78	240
Mometasonfuroat (MMF)	41,22	2,83	240
Difluocortolonvalerat (DFCV)	41,50	2,85	240
Fluocortolonpivalat (FCP) ^c	42,25	2,90	240
Beclomethasondipropionat (BCD) ^c	42,25	2,90	240
Clocortolonpivalat (CLP)	42,93	2,95	240
Fluocortolonhexanoat (FCH)	44,54	3,06	240
Propylparaben (ISTD)	14,55	1,00	240

^a Am häufigsten gefundener Aufheller in verbotenen kosmetischen Hautpflegeprodukten.

^b Die Verbindung wird von Standardlösungsgemischen getrennt injiziert.

^c Coeluierte Verbindungen. Die Identifizierung kann nach dem in Anhang E angegebenen Verfahren durchgeführt werden.

7 Prüfbericht

Der Prüfbericht sollte die Angaben nach EN ISO/IEC 17025 [1] und mindestens die folgenden Informationen enthalten:

- a) alle für die Identifizierung der Probe notwendigen Angaben (Art der Probe, der Herkunft der Probe, Bezeichnung);
- b) eine Verweisung auf diese Europäische Norm;
- c) das Datum und die Art des Probenahmeverfahrens (falls bekannt);
- d) der Tag der Entgegennahme der Probe;
- e) das Datum der Prüfung;
- f) die Prüfergebnisse und die Einheiten, in denen sie angegeben wurden;
- g) besondere Beobachtungen im Verlauf der Prüfung;
- h) alle Vorgänge, die nicht im Verfahren festgelegt oder als optional angesehen werden, die die Ergebnisse beeinflusst haben könnten.

Anhang A (informativ)

Beispiele von erhaltenen Chromatogrammen (siehe 2.1)

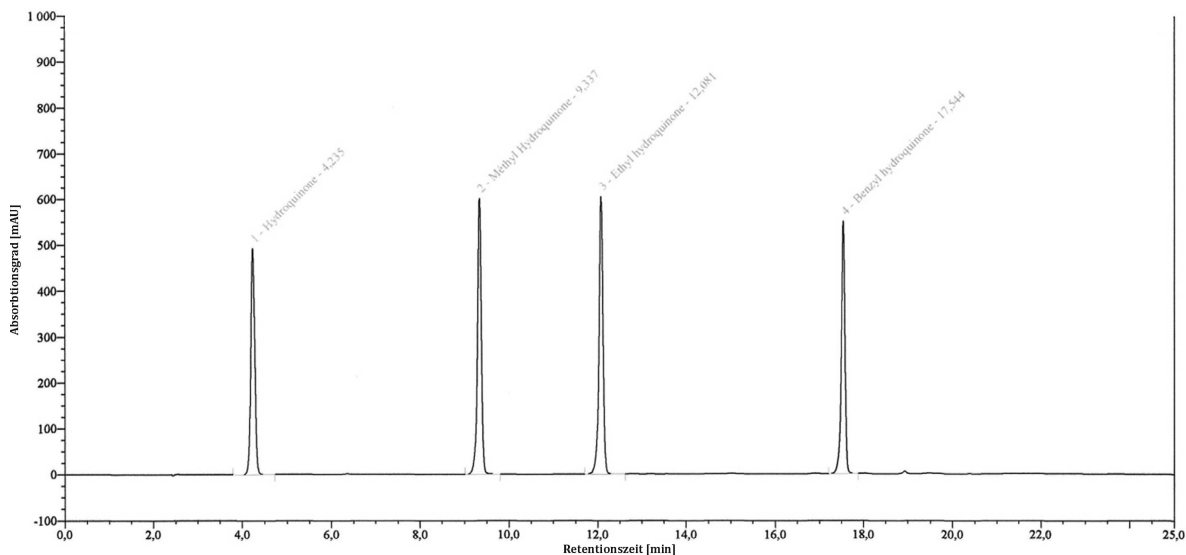


Bild A.1 — Beispielchromatogramm, erhalten für Standardlösungen von Hydrochinon und dessen Ethern zwischen 0,5 mg/ml und 1 mg/ml

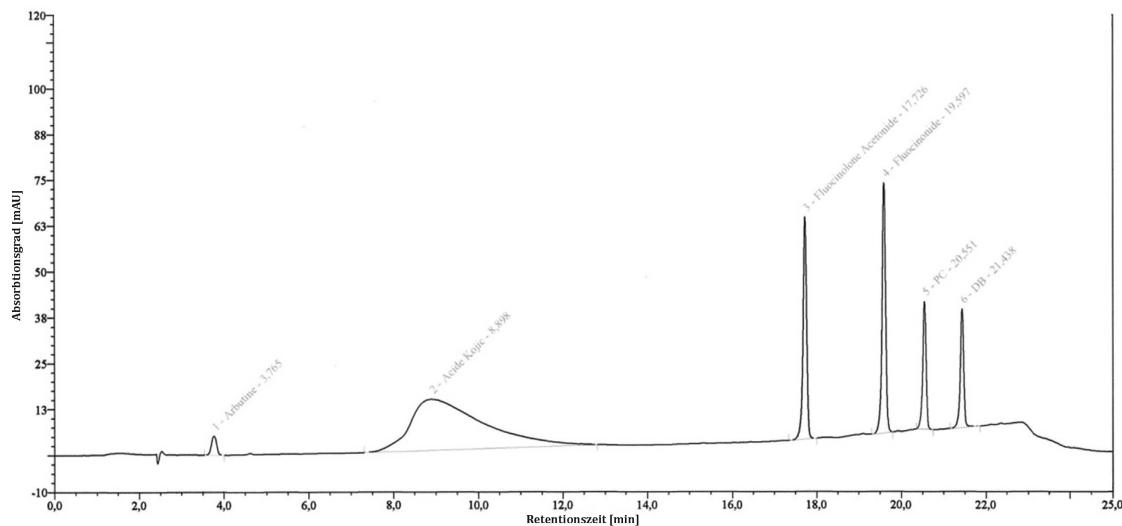


Bild A.2 — Beispielchromatogramm, erhalten für Standardlösungen von Kortikoiden von 5 µg/ml

Anhang B (informativ)

Validierungsdaten für das quantitative Bestimmungsverfahren von Hydrochinon und dessen drei Ethern (siehe 2.1)

Diese Validierungsdaten wurden vom Service Commun des Laboratoires (SCL) du Ministère de l'Economie et des Finances – Laboratoire de Lyon-Oullins – Unité Produits – Section Cosmétiques erhalten.

Nachweisgrenze: 0,01 % (w/w), validiert mit Standardlösungen an drei HPLC-Anlagen.

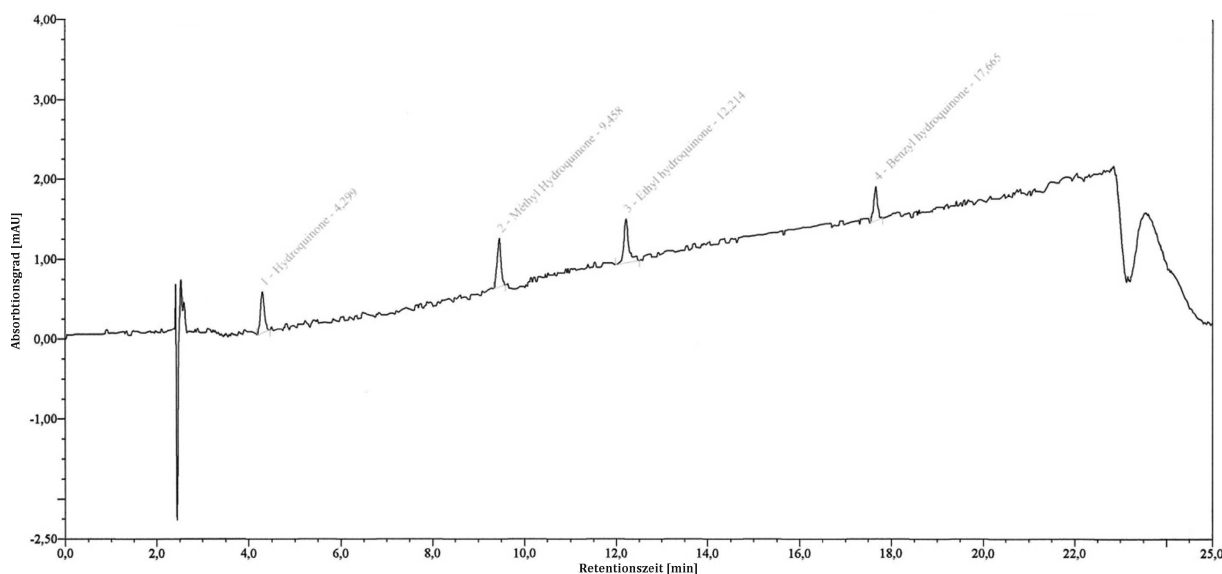


Bild B.1 — Chromatogramm von Hydrochinon und dessen drei Ether-Standardlösungen

Tabelle B.1 — Bestimmungsgrenzen (LOQ), validiert mit aufgestockten Matrizen, analysiert im Verlauf von fünf Tagen von vier Analytikern an drei HPLC-Anlagen

Verbindung	Matrix: Aufhellungscreme			Matrix: Aufhellungslösung		
	LOQ	RSD der Wiederholpräzision	RSD der internen Vergleichpräzision	LOQ	RSD der Wiederholpräzision	RSD der internen Vergleichpräzision
	% (w/w)	%	%	% (w/w)	%	%
Hydrochinon	0,1	2,3	12,6	0,1	2,8	25,3
Methylether	0,2	0,0	9,2	0,2	3,0	27,1
Ethylether	0,2	2,2	10,9	0,2	2,6	21,0
Benzylether	0,3	1,3	7,0	0,2	3,5	15,6

Tabelle B.2 — Linearitätsstudie, validiert mit acht Kalibrierstufen (Standardlösungen), analysiert im Verlauf von fünf Tagen von vier Analytikern mit zwei verschiedenen HPLC-Anlagen (Nr. 2 und Nr. 3)

Verbindung	Ermitteltes relatives maximales Bias (systembedingte Abweichung)							
	%							
	Stufe 1 (LOQ)	Stufe 2	Stufe 3	Stufe 4	Stufe 5	Stufe 6	Stufe 7	Stufe 8
Hydrochinon	6,3 µg/ml	12,5 µg/ml	25,0 µg/ml	49,9 µg/ml	124,9 µg/ml	249,7 µg/ml	374,6 µg/ml	499,4 µg/ml
	27,7	10,7	3,7	-2,9	-1,6	1,7	1,5	-0,6
Methylether	8,1 µg/ml	16,1 µg/ml	32,2 µg/ml	64,4 µg/ml	161,1 µg/ml	322,1 µg/ml	483,2 µg/ml	644,2 µg/ml
	11,1	-7,5	-2,5	-1,7	1,8	1,8	1,5	-0,8
Ethylether	10,1 µg/ml	20,2 µg/ml	40,5 µg/ml	81 µg/ml	202,5 µg/ml	405,1 µg/ml	607,6 µg/ml	810,2 µg/ml
	-11,0	-7,0	3,0	-1,8	1,8	1,7	1,5	-0,8
Benzylether	12,2 µg/ml	24,5 µg/ml	48,9 µg/ml	97,9 µg/ml	244,8 µg/ml	489,6 µg/ml	734,3 µg/ml	979,1 µg/ml
	-10,9	-9,0	-5,6	-1,8	2,5	1,6	1,5	-0,8

Die Konzentrationen, in µg/ml, sind die Mittelwerte der fünf unterschiedlichen Mengen jedes Tages. Der Fisher-Test wird bei allen Kalibrieranalyten durchgeführt.

Tabelle B.3 — Linearitätsstudie, validiert mit fünf Kalibrierstufen (Standardlösungen), analysiert im Verlauf von fünf Tagen von vier Analytikern mit zwei verschiedenen HPLC-Anlagen (Nr. 1 und Nr. 2)

Verbindung	Maximal erhaltene relative Bias				
	%				
	Stufe 1 (LOQ)	Stufe 2	Stufe 3	Stufe 4	Stufe 5
Hydrochinon	6,4 µg/ml	25,5 µg/ml	127,7 µg/ml	251,7 µg/ml	510,6 µg/ml
	-40,6	-13,2	-3,1	6,9	-1,3
Methylether	8,1 µg/ml	16,1 µg/ml	32,2 µg/ml	64,4 µg/ml	161,1 µg/ml
	-35,3	-6,1	2,7	-1,7	0,4
Ethylether	10,1 µg/ml	20,2 µg/ml	40,5 µg/ml	81 µg/ml	202,5 µg/ml
	-31,7	-3,9	2,6	-1,7	0,4
Benzylether	12,2 µg/ml	24,5 µg/ml	48,9 µg/ml	97,9 µg/ml	244,8 µg/ml
	26,7	-5,0	1,9	-1,8	0,4

Die Konzentrationen, in µg/ml, sind die Mittelwerte der fünf unterschiedlichen Mengen jedes Tages. Der Fisher-Test wird bei allen Kalibrieranalyten durchgeführt.