SECHSTE RICHTLINIE 95/32/EG DER KOMMISSION

vom 7. Juli 1995

über Analysemethoden zur Kontrolle der Zusammensetzung kosmetischer Mittel

(Text von Bedeutung für den EWR)

DIE KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN —

gestützt auf den Vertrag zur Gründung der Europäischen Gemeinschaft,

gestützt auf die Richtlinie 76/768/EWG des Rates vom 27. Juli 1976 zur Angleichung der Rechtsvorschriften der Mitgliedstaaten über kosmetische Mittel [1], zuletzt geändert durch die Richtlinie 94/32/EWG der Kommission [2], insbesondere auf Artikel 8 Absatz 1,

in Erwägung nachstehender Gründe:

Die Richtlinie 76/768/EWG sieht amtliche Kontrollen der kosmetischen Mittel vor, mit denen sichergestellt werden soll, daß die in den Gemeinschaftsbestimmungen über die Zusammensetzung der kosmetischen Mittel vorgeschriebenen Bedingungen erfüllt sind.

Alle erforderlichen Analysemethoden sollten so rasch wie möglich festgelegt werden. Verschiedene Methoden wurden bereits mit der Richtlinie 80/1335/EWG der Kommission [3], geändert durch Richtlinie 87/143/EWG [4], mit der Richtlinie 82/434/EWG der Kommission [5], geändert durch Richtlinie 90/207/EWG [6], und mit den Richtlinien 83/514/EWG [7], 85/490/EWG [8] und 93/73/EWG [9] der Kommission festgelegt.

Die Methoden zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung von Benzoesäure, 4-Hydroxybenzoesäure, Sorbinsäure, Salicylsäure und Propionsäure in kosmetischen Mitteln sowie zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung von Hydrochinon, Hydrochinonmonomethylether, Hydrochinonmonoethylether und Hydrochinonmonobenzylether in kosmetischen Mitteln stellen eine sechste Etappe dar.

Die in dieser Richtlinie vorgesehenen Maßnahmen entsprechen der Stellungnahme des Ausschusses für die Anpassung der Richtlinie 76/768/EWG an den technischen Fortschritt —

HAT FOLGENDE RICHTLINIE ERLASSEN:

Artikel 1

Die Mitgliedstaaten treffen alle erforderlichen Maßnahmen, damit bei der amtlichen Kontrolle der kosmetischen Mittel

— der Nachweis und die quantitative Bestimmung von Benzoesäure, 4-Hydroxybenzoesäure, Sorbinsäure, Salicylsäure und Propionsäure,

— der Nachweis und die quantitative Bestimmung von Hydrochinon, Hydrochinonmonomethylether, Hydrochinonmonoethylether und Hydrochinonmonobenzylether

nach den im Anhang beschriebenen Methoden erfolgen.

Artikel 2

(1) Die Mitgliedstaaten erlassen die erforderlichen Rechts- und Verwaltungsvorschriften, um dieser Richtlinie bis spätestens 30. September 1996 nachzukommen. Sie setzen die Kommission unverzüglich davon in Kenntnis.

Wenn die Mitgliedstaaten diese Vorschriften erlassen, nehmen sie in diesen Vorschriften selbst oder durch einen Hinweis bei der amtlichen Veröffentlichung auf diese Richtlinie Bezug. Die Mitgliedstaaten regeln die Einzelheiten dieser Bezugnahme.

(2) Die Mitgliedstaaten teilen der Kommission den Wortlaut der innerstaatlichen Rechtsvorschriften mit, die sie auf dem unter diese Richtlinie fallenden Gebiet erlassen.

Artikel 3

Diese Richtlinie tritt am zwanzigsten Tag nach ihrer Veröffentlichung im *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften* in Kraft.

Artikel 4

Diese Richtlinie ist an alle Mitgliedstaaten gerichtet.

Brüssel, den 7. Juli 1995

Für die Kommission
Emma BONINO
Mitglied der Kommission

---

[1] ABl. Nr. L 262 vom 27. 9. 1976, S. 169.
[2] ABl. Nr. L 181 vom 15. 7. 1994, S. 31.
[3] ABl. Nr. L 383 vom 31. 12. 1980, S. 27.
[4] ABl. Nr. L 57 vom 27. 2. 1987, S. 56.
[5] ABl. Nr. L 185 vom 30. 6. 1982, S. 1.
[6] ABl. Nr. L 108 vom 28. 4. 1990, S. 92.
[7] ABl. Nr. L 291 vom 24. 10. 1983, S. 9.
[8] ABl. Nr. L 295 vom 7. 11. 1985, S. 30.
[9] ABl. Nr. L 231 vom 14. 9. 1993, S. 34.

ANHANG

I. NACHWEIS UND BESTIMMUNG VON BENZOESÄURE, 4-HYDROXYBENZOESÄURE, SORBINSÄURE, SALICYLSÄURE UND PROPIONSÄURE IN KOSMETISCHEN MITTELN

1. **Zweck und Anwendungsbereich**

Diese Methode beschreibt ein Verfahren zum Nachweis und zur Bestimmung von Benzoesäure, 4-Hydroxybenzoesäure, Sorbinsäure, Salicylsäure und Propionsäure in kosmetischen Mitteln. Die Methode gliedert sich in Verfahren

— zum Nachweis dieser Konservierungsstoffe,

— zur Bestimmung von Benzoesäure, 4-Hydroxybenzoesäure, Sorbinsäure und Salicylsäure,

— zur Bestimmung von Propionsäure.

2. **Definition**

Der nach diesen Verfahren ermittelte Gehalt an Benzoesäure, 4-Hydroxybenzoesäure, Sorbinsäure, Salicylsäure und Propionsäure wird in Prozent (% m/m) an freier Säure angegeben.

A. NACHWEIS

1. **Kurzbeschreibung**

Im Anschluß an eine Säure/Base-Extraktion der Konservierungsstoffe wird der Extrakt mittels DC und Reaktionschromatographie („On-plate-Derivatisierung") analysiert. In Abhängigkeit vom Ergebnis erfolgt eine Bestätigung des Nachweises durch HPLC oder, im Fall von Propionsäure, durch GC.

2. **Reagenzien**

2.1. Alle Reagenzien müssen analysenrein sein. Wasser muß destilliert sein oder zumindest gleichwertige Reinheit aufweisen.

2.2. Aceton

2.3. Diethylether

2.4. Acetonitril

2.5. Toluen

2.6. n-Hexan

2.7. Flüssiges Paraffin

2.8. Salzsäure, 4 M

2.9. Kalilauge, 4 M

2.10. Calciumchlorid, $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$

2.11. Lithiumcarbonat, Li_2CO_3

2.12. 2-Brom-2′-acetonaphthon

2.13. 4-Hydroxybenzoesäure

2.14. Salicylsäure

2.15. Benzoesäure

2.16. Sorbinsäure

2.17. Propionsäure

2.18. Vergleichslösungen

Jeweils 0,1 %ige (m/V) Lösungen (100 mg/100 ml) der fünf Konservierungsstoffe (2.13 bis 2.17) in Diethylether.

2.19. Derivatisierungsreagenz

0,5 %ige (m/V) Lösung von 2-Brom-2'-acetonaphthon (2.12) in Acetonitril (2.4). Diese Lösung muß wöchentlich frisch hergestellt und im Kühlschrank aufbewahrt werden.

2.20. Katalysator-Lösung

0,3 %ige (m/V) Lösung von Lithiumcarbonat (2.11) in Wasser (300 mg/100 ml). Diese Lösung muß frisch hergestellt werden.

2.21. Fließmittel

Toluen(2.5)/Aceton(2.2), 20 + 0,5 (V + V)

2.22. Tauch-Lösung

Flüssiges Paraffin(2.7)/n-Hexan(2.6), 1 + 2 (V + V)

3. **Geräte**

Normale Laborausstattung und

3.1. Wasserbad, auf 60 °C konstant einstellbar

3.2. Chromatographiekammer

3.3. UV-Lampe, 254 und 366 nm

3.4. DC-Fertigplatten (200 mm × 200 mm)
Sorbensschicht: Kieselgel 60 ohne Fluoreszenzindikator
Schichtdicke: 0,25 mm mit Konzentrierungszone 25 mm × 200 mm (Merck 11845 oder gleichwertiges Erzeugnis)

3.5. Mikroliterspritze, 10 µl

3.6. Mikroliterspritze, 25 µl

3.7. Trockenschrank, bis auf 105 °C konstant einstellbar

3.8. Erlenmeyerkolben mit Schliffstopfen, 50 ml und 200 ml

3.9. Papierfilter, Durchmesser 90 mm (Schleicher und Schüll, Weißband Nr. 5892, oder gleichwertiges Erzeugnis)

3.10. Universal pH-Indikatorpapier, pH 1—11

3.11. Probenfläschchen, 5 ml

3.12. Rotationsverdampfer

3.13. Heizplatte

4. **Durchführung**

4.1. Vorbereitung der Probe

Ungefähr 1,0 g der Probe wird in einen 50-ml-Erlenmeyerkolben (3.8) mit 4 Tropfen 4 M Salzsäure (2.8) und 40 ml Aceton (2.2) versetzt.

Bei stark basischen Erzeugnissen, wie Feinseife, werden 20 Tropfen 4 M Salzsäure (2.8) hinzugefügt. Der mit Indikatorpapier (3.10) gemessene pH-Wert soll ungefähr 2 betragen.

Der Erlenmeyerkolben wird verschlossen und eine Minute lang kräftig geschüttelt. Notfalls kann die Mischung vorsichtig bis auf 60 °C erwärmt werden, damit die Fettphase schmilzt und die Extraktion der Konservierungsstoffe in die Aceton-Phase erleichtert wird.

Die Mischung wird auf Zimmertemperatur abgekühlt und durch ein Papierfilter (3.9) filtriert.

20 ml des Filtrats werden in einen 200-ml-Erlenmeyerkolben übergeführt, mit 20 ml Wasser versetzt und gemischt. Mit 4 M Kalilauge (2.9) wird der pH-Wert der Mischung gegen Indikatorpapier (3.10) auf ungefähr 10 eingestellt.

Nach Zusatz von 1 g Calciumchlorid (2.10) wird die Mischung kräftig geschüttelt und danach durch ein Papierfilter (3.9) in einen 250-ml-Scheidetrichter, der 75 ml Diethylether (2.3) enthält, filtriert. Die Mischung wird eine Minute lang kräftig geschüttelt. Nach der Phasentrennung wird die wäßrige Phase in einen weiteren 250-ml-Scheidetrichter abgelassen und die Etherphase verworfen. Mit Hilfe von Indikatorpapier (3.10) wird der pH-Wert der wäßrigen Lösung mit 4 M Salzsäure (2.8) auf ungefähr 2 eingestellt. Nach Zusatz von 10 ml Diethylether (2.3) wird die Mischung eine Minute lang kräftig geschüttelt. Nach der Phasentrennung wird die Etherphase in einen Rotationsverdampfer (3.12) übergeführt und die wäßrige Phase verworfen.

Die Etherphase wird fast zur Trockne eingedampft und der Rückstand in 1 ml Diethylether (2.3) aufgenommen. Diese Lösung wird in ein Probenfläschchen (3.11) übergeführt.

4.2. Dünnschichtchromatographie

Entsprechend der Anzahl der zu chromatographierenden Vergleichs- und Probelösungen werden auf die Startlinie in der Konzentrierungszone der Dünnschichtplatte in gleichen Abständen je 3 µl Lithiumcarbonatlösung (2.20) mit einer Mikroliterspritze (3.5) aufgetragen. Die Dünnschichtplatte wird im Kaltluftstrom getrocknet und anschließend auf eine 40 °C warme Heizplatte (3.13) gelegt, damit beim nachfolgenden Auftragen der Lösungen die Flecke möglichst klein bleiben. Mit einer Mikroliterspritze (3.5) werden von jeder Vergleichslösung (2.18) und von der Probelösung (4.1) jeweils 10 µl exakt auf die Startflecke des Lithiumcarbonats aufgetragen. Schließlich werden mit der Mikroliterspritze (3.6) exakt auf diese Startflecke jeweils etwa 15 µl Derivatisierungsreagenz (2.19) aufgetragen.

Die Dünnschichtplatte wird im Trockenschrank (3.7) 45 Minuten lang bei 80 °C erwärmt. Nach dem Abkühlen wird die Dünnschichtplatte in die vorher für 15 Minuten mit dem Fließmittel (2.21) äquilibrierte Chromatographiekammer (3.2) (ohne Filterpapier) gestellt und bis zu einer Höhe von 15 cm entwickelt (Zeitdauer etwa 80 Minuten).

Die Dünnschichtplatte wird im Kaltluftstrom getrocknet und im UV-Licht (3.3) betrachtet. Die Fluoreszenz der schwachen Flecke kann durch Tauchen der Dünnschichtplatte in flüssiges Paraffin/n-Hexan (2.22) verstärkt werden.

5. **Auswertung**

Der R_f-Wert wird für jeden Fleck berechnet.

Die für die Probelösung erhaltenen Flecke werden mit denen der Vergleichslösungen im Hinblick auf ihre R_f-Werte und ihr Verhalten im UV-Licht verglichen.

Im Ergebnis dieses Vergleichs wird eine vorläufige Schlußfolgerung gezogen, ob und welche Konservierungsstoffe vorliegen.

Man führt die im folgenden Abschnitt B beschriebene HPLC oder, im Fall der Propionsäure, die im Abschnitt C beschriebene GC durch und vergleicht die Retentionszeiten der Probenpeaks mit denen der Vergleichslösungen.

Der Nachweis der Konservierungsstoffe wird abschließend durch Kombination der Ergebnisse der DC und der HPLC bzw. GC geführt.

B. BESTIMMUNG VON BENZOESÄURE, 4-HYDROXYBENZOESÄURE, SORBINSÄURE UND SALICYLSÄURE

1. **Kurzbeschreibung**

Nach dem Ansäuern wird die Probe mit einer Mischung aus Ethanol und Wasser extrahiert. Nach der Filtration wird der Gehalt an Konservierungsstoffen durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) bestimmt.

2. **Reagenzien**

2.1. Alle Reagenzien müssen analysenrein und, wo erforderlich, für die HPLC geeignet sein. Wasser muß destilliert sein oder zumindest gleichwertige Reinheit aufweisen.

2.2. Absolutes Ethanol

2.3. 4-Hydroxybenzoesäure

2.4. Saliclysäure

2.5. Benzoesäure

2.6. Sorbinsäure

2.7. Natriumacetat, $CH_3COONa \cdot 3H_2O$

2.8. Essigsäure, $d_4^{20} = 1{,}05$ g/ml

2.9. Acetonitril

2.10. Schwefelsäure, 2 M

2.11. Kalilauge, 0,2 M

2.12. 2-Methoxybenzoesäure

2.13. Ethanol/Wasser-Mischung

9 Volumenteile Ethanol (2.2) werden mit 1 Volumenteil Wasser (2.1) gemischt.

2.14. Lösung des inneren Standards

Ungefähr 1 g 2-Methoxybenzoesäure (2.12) wird in 500 ml Ethanol/Wasser-Mischung (2.13) gelöst.

2.15. Mobile Phase

2.15.1. Acetatpuffer: 6,35 g Natriumacetat (2.7) und 20,0 ml Essigsäure (2.8) werden in 1 l Wasser gelöst.

2.15.2. Mobile Phase: 9 Volumenteile Acetatpuffer (2.15.1) und 1 Volumenteil Acetonitril (2.9) werden gemischt.

2.16. Stammlösung der Konservierungsstoffe

Ungefähr 0,05 g 4-Hydroxybenzoesäure (2.3), 0,2 g Salicylsäure (2.4), 0,2 g Benzoesäure (2.5) und 0,05 g Sorbinsäure (2.6) werden in einen 50-ml-Meßkolben genau eingewogen und mit der Ethanol/Wasser-Mischung (2.13) zur Marke aufgefüllt. Die Lösung wird im Kühlschrank aufbewahrt und ist eine Woche lang haltbar.

2.17. Standardlösungen der Konservierungsstoffe

Von der Stammlösung (2.16) werden 8,00, 4,00, 2,00, 1,00 bzw. 0,50 ml in eine Reihe von 20-ml-Meßkolben pipettiert. Nach Zusatz von jeweils 10,00 ml der Lösung des inneren Standards (2.14) mittels Pipette und 0,5 ml 2 M Schwefelsäure (2.10) wird mit der Ethanol/Wasser-Mischung (2.13) zur Marke aufgefüllt und gemischt. Die Lösungen sind frisch herzustellen.

3. Geräte

Normale Laborausstattung und

3.1. Wasserbad, auf 60 °C konstant einstellbar

3.2. Hochleistungsflüssigkeitschromatograph mit UV-Detektor mit variabler Wellenlänge und mit 10 µl-Probenschleife

3.3. Analytische Trennsäule

Material: Edelstahl

Länge: 12,5 bis 25 cm

Innendurchmesser: 4,6 mm

Aktiver Festkörper: Mit Octadecylgruppen modifiziertes Kieselgel (Nucleosil 5 C18 oder gleichwertiges Erzeugnis)

3.4. Papierfilter, Durchmesser 90 mm (Schleicher und Schüll, Weißband Nr. 5892, oder gleichwertiges Erzeugnis)

3.5. Erlenmeyerkolben, 50 ml

3.6. Probenfläschchen, 5 ml

3.7. Siedesteinchen (Karborund), Größe 2 bis 4 mm, oder gleichwertiges Material

4. **Durchführung**

4.1. Vorbereitung der Probe

4.1.1. Vorbereitung der Probe ohne Zugabe des inneren Standards

1 g der Probe wird in einen 50-ml-Erlenmeyerkolben (3.5) eingewogen. Nach Zusatz von 1,00 ml 2 M Schwefelsäure (2.10) und 40,0 ml der Ethanol/Wasser-Mischung (2.13) sowie ungefähr 1 g Siedesteinchen (3.7) wird der verschlossene Kolben kräftig geschüttelt, bis eine homogene Suspension entstanden ist, mindestens jedoch 1 Minute. Zur Verbesserung der Extraktion wird der Kolben genau 5 Minuten im Wasserbad (3.1) auf 60 °C erwärmt. Danach wird der Kolben sofort unter fließendem kaltem Wasser abgekühlt und anschließend eine Stunde lang bei 5 °C aufbewahrt. Der Extrakt wird durch ein Papierfilter (3.4) filtriert. Etwa 2 ml des Filtrats werden in ein Probenfläschchen (3.6) übergeführt und bei 5 °C aufbewahrt.

Die HPLC-Bestimmung ist innerhalb von 24 Stunden nach Herstellung der Probelösung durchzuführen.

4.1.2. Vorbereitung der Probe unter Zugabe des inneren Standards

1 g ± 0,1 g (a Gramm) der Probe wird auf drei Dezimalstellen genau in einen 50-ml-Erlenmeyerkolben (3.5) eingewogen. Nach Zusatz von 1,00 ml 2 M Schwefelsäure (2.10) und 30,0 ml der Ethanol/Wasser-Mischung (2.13) sowie ungefähr 1 g Siedesteinchen (3.7) und 10,00 ml der Lösung des inneren Standards (2.14) wird der verschlossene Kolben kräftig geschüttelt, bis eine homogene Suspension entstanden ist, mindestens jedoch 1 Minute. Zur Verbesserung der Extraktion wird der Kolben genau 5 Minuten im Wasserbad (3.1) auf 60 °C erwärmt. Danach wird der Kolben sofort unter fließendem kaltem Wasser abgekühlt und anschließend eine Stunde lang bei 5 °C aufbewahrt. Der Extrakt wird durch ein Papierfilter (3.4) filtriert. Etwa 2 ml des Filtrats werden in ein Probenfläschchen (3.6) übergeführt und bei 5 °C aufbewahrt.

Die HPLC-Bestimmung ist innerhalb von 24 Stunden nach Herstellung der Probelösung durchzuführen.

4.2. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Bedingungen für die Chromatographie

Mobile Phase: Acetonitril/Acetatpuffer (2.15.2)

Volumenstrom der mobilen Phase: 2,0 ml/min ± 0,5 ml/min

Detektionswellenlänge: 240 nm

4.2.1. Kalibrierung

10 µl jeder der 5 Standardlösungen der Konservierungsstoffe (2.17) werden chromatographiert, das Chromatogramm aufgezeichnet und die Peakhöhen ermittelt.

Für jede Standardlösung wird das Verhältnis zwischen der Peakhöhe des zu bestimmenden Konservierungsstoffes und der des inneren Standards ermittelt. Es wird eine Kalibrierkurve gezeichnet, indem das Peakhöhenverhältnis in Abhängigkeit von der Konzentration des Konservierungsstoffes aufgetragen wird, oder es wird die Regressionsgerade berechnet.

Man vergewissert sich, daß sich für die Standardlösungen eine lineare Kurve ergibt.

4.2.2. Bestimmung

Jeweils 10 µl der Probelösung (4.1.1) und einer der Standardlösungen der Konservierungsstoffe (2.17) werden chromatographiert und die Chromatogramme aufgezeichnet.

Die Chromatogramme der Probe- und der Standardlösung werden verglichen. Falls das Chromatogramm der Probelösung (4.1.1) keinen Peak mit der Retentionszeit des empfohlenen inneren Standards 2-Methoxybenzoesäure zeigt, werden 10 µl der Probelösung (4.1.2) chromatographiert und das Chromatogramm aufgezeichnet.

Falls im Chromatogramm der Probelösung (4.1.1) ein störender Peak erscheint, der dieselbe Retentionszeit wie 2-Methoxybenzoesäure aufweist, ist ein anderer geeigneter innerer Standard zu wählen. Als innerer Standard kann einer der zu bestimmenden Konservierungsstoffe verwendet werden, der nicht auf dem Chromatogramm der Probelösung erscheint.

Die Chromatogramme der Standardlösung und der Probelösung sollen folgende Bedingungen erfüllen:

— Peakauflösung: Die Peakauflösung soll mindestens 0,90 betragen (zur Definition der Peakauflösung siehe Abbildung 1).

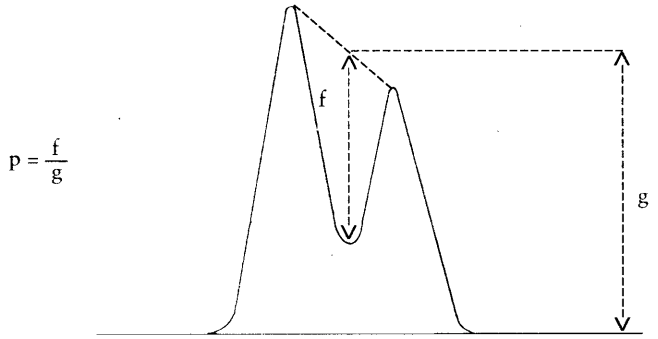

Abbildung 1: **Peakauflösung**

Falls die erforderliche Auflösung nicht erreicht wird, verwendet man entweder eine leistungsfähigere Säule oder verändert die Zusammensetzung der mobilen Phase, bis die Bedingung erfüllt ist.

— Peakasymmetrie: Der Asymmetriefaktor A_S soll zwischen 0,9 und 1,5 liegen (zur Definition des Asymmetriefaktors siehe Abbildung 2). Bei der Aufzeichnung des Chromatogramms zur Bestimmung der Peakasymmetrie sollte der Papiervorschub mindestens 2 cm/min betragen.

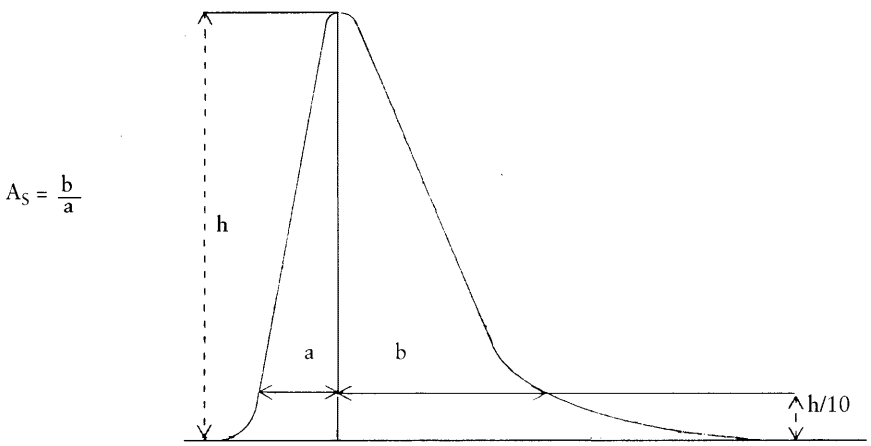

Abbildung 2: **Asymmetriefaktor A_S**

— Basislinie: Die Basislinie sollte stabil sein.

5. Berechnung

Unter Verwendung der Verhältnisse zwischen den Peakhöhen der zu bestimmenden Konservierungsstoffe und der Peakhöhe der 2-Methoxybenzoesäure (innerer Standard) wird die Konzentration der Konservierungsstoffe aus der Kalibrierkurve abgelesen bzw. aus der Gleichung für die Regressionsgerade berechnet. Der Gehalt an Benzoesäure, 4-Hydroxybenzoesäure, Sorbinsäure und Salicylsäure in Prozent (x_i) der Probe wird nach folgender Formel berechnet:

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

a = Einwaage der untersuchten Probe (4.1.2) in Gramm

b = aus der Kalibrierkurve abgelesene Konzentration des Konservierungsstoffes in der Probelösung (4.1.2) in Mikrogramm je Milliliter bzw. der aus der Gleichung für die Regressionsgerade berechnete Wert

6. **Wiederholbarkeit** (1)

Bei einem 4-Hydroxybenzoesäuregehalt von 0,40 % (m/m) dürfen die Ergebnisse zweier an derselben Probe parallel durchgeführter Bestimmungen um nicht mehr als 0,035 % (m/m) voneinander abweichen.

Bei einem Benzoesäuregehalt von 0,50 % (m/m) dürfen die Ergebnisse zweier an derselben Probe parallel durchgeführter Bestimmungen um nicht mehr als 0,05 % (m/m) voneinander abweichen.

Bei einem Salicylsäuregehalt von 0,50 % (m/m) dürfen die Ergebnisse zweier an derselben Probe parallel durchgeführter Bestimmungen um nicht mehr als 0,045 % (m/m) voneinander abweichen.

Bei einem Sorbinsäuregehalt von 0,60 % (m/m) dürfen die Ergebnisse zweier an derselben Probe parallel durchgeführter Bestimmungen um nicht mehr als 0,035 % (m/m) voneinander abweichen.

7. **Bemerkungen**

7.1. Der Robustheitstest (ruggedness test) mit dieser Methode ergab, daß die für die Extraktion der Konservierungsstoffe vorgeschriebene Menge an Schwefelsäure das Ergebnis beeinflussen kann und die Einwaage der Probe in den angegebenen Grenzen erfolgen muß.

7.2. Falls erforderlich, kann eine geeignete Vorsäule verwendet werden.

C. BESTIMMUNG VON PROPIONSÄURE

1. **Zweck und Anwendungsbereich**

Diese Methode beschreibt ein Verfahren zur Bestimmung von Propionsäure bis zu einer Höchstkonzentration von 2 % (m/m) in kosmetischen Mitteln.

2. **Definition**

Der nach diesem Verfahren ermittelte Gehalt an Propionsäure wird in Prozent (% m/m) des Erzeugnisses angegeben.

3. **Kurzbeschreibung**

Nach Extraktion der Propionsäure aus dem Erzeugnis wird die Bestimmung mittels Gaschromatographie unter Verwendung von 2-Methylpropionsäure als innerer Standard durchgeführt.

4. **Reagenzien**

Alle Reagenzien müssen analysenrein sein. Wasser muß destilliert sein oder zumindest gleichwertige Reinheit aufweisen.

4.1. Ethanol, 96 % (V/V)

4.2. Propionsäure

4.3. 2-Methylpropionsäure

4.4. Orthophosphorsäure, 10 % (m/V)

4.5. Propionsäure-Standardlösung

Ungefähr 1,00 g (p Gramm) Propionsäure wird genau in einen 50-ml-Meßkolben eingewogen und mit Ethanol (4.1) zur Marke aufgefüllt.

4.6. Lösung des inneren Standards

Ungefähr 1,00 g (e Gramm) 2-Methylpropionsäure wird genau in einen 50-ml-Meßkolben eingewogen und mit Ethanol (4.1) zur Marke aufgefüllt.

(1) ISO 5725.

5. **Geräte**

5.1. Normale Laborausstattung und

5.2. Gaschromatograph mit Flammenionisationsdetektor

5.3. Reagenzglas, 20 ml, mit Schliffstopfen

5.4. Wasserbad, auf 60 °C konstant einstellbar

5.5. 10-ml-Glasspritze mit Membranfiltereinheit, 0,45 µm

6. **Durchführung**

6.1. Vorbereitung der Probe

6.1.1. Vorbereitung der Probe ohne Zugabe des inneren Standards

1 g der Probe wird in ein Reagenzglas mit Schliffstopfen (5.3) eingewogen. Nach Zusatz von 0,50 ml Phosphorsäure (4.4) und 9,5 ml Ethanol (4.1) wird das verschlossene Reagenzglas kräftig geschüttelt. Zur Verbesserung der Extraktion (Schmelzen der Fettphase) wird das Reagenzglas 5 Minuten im Wasserbad (5.4) auf 60 °C erwärmt. Danach wird das Reagenzglas sofort unter fließendem kaltem Wasser abgekühlt. Ein Teil des Extraktes wird durch ein Membranfilter (5.5) filtriert.

Das Filtrat ist am selben Tag zu chromatographieren.

6.1.2. Vorbereitung der Probe unter Zugabe des inneren Standards

1 g ± 0,1 g der Probe wird auf drei Dezimalstellen genau in ein Reagenzglas mit Schliffstopfen (5.3) eingewogen. Nach Zusatz von 0,50 ml Phosphorsäure (4.4), 0,50 ml der Lösung des inneren Standards (4.6) und 9 ml Ethanol (4.1) wird das verschlossene Reagenzglas kräftig geschüttelt. Zur Verbesserung der Extraktion (Schmelzen der Fettphase) wird das Reagenzglas 5 Minuten im Wasserbad (5.4) auf 60 °C erwärmt. Danach wird das Reagenzglas sofort unter fließendem kaltem Wasser abgekühlt. Ein Teil des Extraktes wird durch ein Membranfilter (5.5) filtriert.

Das Filtrat ist am selben Tag zu chromatographieren.

6.2. Bedingungen für die Gaschromatographie

Folgende Betriebsbedingungen werden empfohlen:

Säule:

Material	Edelstahl
Länge	2 m
Innerer Durchmesser	$\frac{1}{8}$" (~ 3 mm)
Fester Träger	Chromosorb W AW, 100—120 msh
Stationäre Flüssigphase	10 % Polyethylenglycol 20 000 für Säuren (SP™ 1000 oder gleichwertiges Erzeugnis) und 1 % H_3PO_4

Temperatur

Injektor	200 °C
Säule	120 °C
Detektor	200 °C

Trägergas:

Stickstoff

Volumenstrom: 25 ml/min

6.3. Chromatographie

6.3.1. Kalibrierung

In eine Reihe von 20-ml-Meßkolben werden 0,25, 0,50, 1,00 2,00 bzw. 4,00 ml Propionsäurelösung (4.5) pipettiert. Nach Zusatz von 1,00 ml der Lösung des inneren Standards (4.6) mittels Pipette wird mit Ethanol (4.1) zur Marke aufgefüllt und gemischt. Diese Lösungen enthalten e mg/ml 2-Methylpropionsäure als inneren Standard (d. h. 1 mg/ml, wenn e=1,000) und p/4, p/2, p, 2p bzw. 4p mg/ml Propionsäure (d. h. 0,25, 0,50, 1,00, 2,00 bzw. 4,00 mg/ml, wenn p=1,000).

1 µl jeder dieser Standardlösungen wird chromatographiert, das Chromatogramm aufgezeichnet und die Peakflächen ermittelt.

Jede Lösung wird dreimal chromatographiert und der Mittelwert für das Peakflächenverhältnis berechnet.

Es wird eine Kalibrierkurve gezeichnet, indem das Verhältnis der Masse von Propionsäure zu 2-Methylpropionsäure als Abszisse und das Verhältnis der entsprechenden Peakflächen als Ordinate aufgetragen werden, oder es wird die Regressionsgerade berechnet.

6.3.2. Bestimmung

Jeweils 1 µl der Probelösung (6.1.1) und einer der Standardlösungen (6.3.1) werden chromatographiert und die Chromatogramme aufgezeichnet.

Die Chromatogramme der Probe- und der Standardlösung werden verglichen. Falls das Chromatogramm der Probelösung einen Peak mit etwa der gleichen Retentionszeit wie 2-Methylpropionsäure aufweist, ist ein anderer innerer Standard zu verwenden. Wenn keine Interferenz beobachtet wird, wird 1 µl der Probelösung (6.1.2) chromatographiert, das Chromatogramm aufgezeichnet und die Peakflächen der Propionsäure und des inneren Standards ermittelt.

Die Probelösung wird dreimal chromatographiert und der Mittelwert für das Peakflächenverhältnis berechnet.

7. **Berechnung**

7.1. Aus der Kalibrierkurve (6.3.1) wird das Verhältnis der Masse (K) abgelesen bzw. aus der Gleichung für die Regressionsgerade berechnet, das dem gemäß 6.3.2 berechneten Peakflächenverhältnis entspricht.

7.2. Der Propionsäuregehalt in Prozent (x) der Probe wird unter Verwendung des ermittelten Masseverhältnisses nach folgender Formel berechnet:

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

K = nach 7.1 ermitteltes Masseverhältnis

a = Einwaage der untersuchten Probe (6.1.2) in Gramm

e = Einwaage des inneren Standards (4.6) in Gramm

Das Ergebnis wird auf eine Stelle nach dem Komma gerundet angegeben.

8. **Wiederholbarkeit** (1)

Bei einem Propionsäuregehalt von 2 % (m/m) dürfen die Ergebnisse zweier an derselben Probe parallel durchgeführter Bestimmungen um nicht mehr als 0,12 % (m/m) voneinander abweichen.

II. NACHWEIS UND BESTIMMUNG VON HYDROCHINON, HYDROCHINONMONOMETHYLETHER, HYDROCHINONMONOETHYLETHER UND HYDROCHINONMONOBENZYLETHER IN KOSMETISCHEN MITTELN

A. NACHWEIS

1. **Zweck und Anwendungsbereich**

Diese Methode beschreibt ein Verfahren zum Nachweis von Hydrochinon, Hydrochinonmonomethylether, Hydrochinonmonoethylether und Hydrochinonmonobenzylether (Monobenzon) in kosmetischen Mitteln zur Aufhellung der Haut (Hautbleichmittel)

2. **Kurzbeschreibung**

Hydrochinon und seine Ether werden mittels Dünnschichtchromatographie (DC) nachgewiesen.

3. **Reagenzien**

Alle Reagenzien müssen analysenrein sein.

(1) ISO 5725.

3.1. Ethanol, 96 % (V/V)

3.2. Chloroform

Warnung:

Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen und durch Verschlucken. Reizt die Haut. Irreversibler Schaden möglich.

Hinweis:

Chloroform kann ohne Beeinflussung der Trennleistung des chromatographischen Systems durch *Dichlormethan* ersetzt werden.

3.3. Diethylether

3.4. Fließmittel: Chloroform/Diethylether, 66+33 (V+V)

3.5. Ammoniak-Lösung, 25 % (m/m) (d_4^{20} = 0,91 g/ml)

3.6. Ascorbinsäure

3.7. Hydrochinon

3.8. Hydrochinonmonomethylether

3.9. Hydrochinonmonoethylether

3.10. Hydrochinonmonobenzylether (Monobenzon)

3.11. Vergleichslösungen

Die Vergleichslösungen sind frisch herzustellen; sie sind einen Tag lang haltbar.

3.11.1. 0,05 g Hydrochinon (3.7) werde in ein graduiertes 10-ml-Reagenzglas eingewogen. Nach Zusatz von 0,25 g Ascorbinsäure (3.6) und 5 ml Ethanol (3.1) wird die Mischung mit Ammoniaklösung (3.5) auf einen pH-Wert von 10 eingestellt. Anschließend wird die Mischung mit Ethanol (3.1) zu 10 ml aufgefüllt.

3.11.2. 0,05 g Hydrochinonmonomethylether (3.8) werden in ein graduiertes 10-ml-Reagenzglas eingewogen. Nach Zusatz von 0,25 g Ascorbinsäure (3.6) und 5 ml Ethanol (3.1) wird die Mischung mit Ammoniaklösung (3.5) auf einen pH-Wert von 10 eingestellt. Anschließend wird die Mischung mit Ethanol (3.1) zu 10 ml aufgefüllt.

3.11.3. 0,05 g Hydrochinonmonoethylether (3.9) werden in ein graduiertes 10-ml-Reagenzglas eingewogen. Nach Zusatz von 0,25 g Ascorbinsäure (3.6) und 5 ml Ethanol (3.1) wird die Mischung mit Ammoniaklösung (3.5) auf einen pH-Wert von 10 eingestellt. Anschließend wird die Mischung mit Ethanol (3.1) zu 10 ml aufgefüllt.

3.11.4. 0,05 g Hydrochinonmonobenzylether (3.10) werden in ein graduiertes 10-ml-Reagenzglas eingewogen. Nach Zusatz von 0,25 g Ascorbinsäure (3.6) und 5 ml Ethanol (3.1) wird die Mischung mit Ammoniaklösung (3.5) auf einen pH-Wert von 10 eingestellt. Anschließend wird die Mischung mit Ethanol (3.1) zu 10 ml aufgefüllt.

3.12. Silbernitrat

3.13. 12-Molybdatophosphorsäure

3.14. Kaliumhexacyanoferrat (III)

3.15. Eisen (III)-chlorid-hexahydrat

3.16. Sprühreagenzien

3.16.1. Einer 5 %igen (m/V) wäßrigen Lösung von Silbernitrat (3.12) wird Ammoniak-Lösung (3.5) hinzugefügt, bis sich der gebildete Niederschlag wieder auflöst.

Warnhinweis:

Bei längerem Stehen bilden sich explosive Verbindungen. Die Lösung ist daher nach Gebrauch zu verwerfen.

3.16.2. 10 %ige (m/V) Lösung von 12-Molybdatophosphorsäure (3.13) in Ethanol (3.1).

3.16.3. Lösung 1: 1 %ige (m/V) wäßrige Lösung von Kaliumhexacyanoferrat (III) (3.14)

Lösung 2: 2 %ige (m/V) wäßrige Lösung von Eisen (III)-chlorid (3.15)

Unmittelbar vor Gebrauch werden gleiche Volumina der Lösungen 1 und 2 gemischt.

4. **Geräte**

Normale Laborausstattung und

4.1. Übliche Ausrüstung zur Dünnschichtchromatographie

4.2. DC-Fertigplatten (200 mm × 200 mm)

Sorbensschicht: Kieselgel 60 mit Fluoreszenzindikator 254 nm
Schichtdecke: 0,25 mm

4.3. Ultraschallbad

4.4. Zentrifuge

4.5. UV-Lampe, Wellenlänge 254 nm

5. **Durchführung**

5.1. Vorbereitung der Probe

3,0 g der Probe werden in ein graduiertes 10-ml-Reagenzglas eingewogen. Nach Zusatz von 0,25 g Ascorbinsäure (3.6) und 5 ml Ethanol (3.1) wird die Mischung mit Ammoniaklösung (3.5) auf einen pH-Wert von 10 eingestellt. Anschließend wird die Mischung mit Ethanol (3.1) zu 10 ml aufgefüllt. Das Reagenzglas wird verschlossen und der Inhalt im Ultraschallbad 10 min homogenisiert. Die Mischung wird durch ein Papierfilter filtriert oder bei 3 000 U/min zentrifugiert.

5.2. Dünnschichtchromatographie

5.2.1. Die Chromatographiekammer wird mit dem Fließmittel (3.4) gesättigt.

5.2.2. Je 2 µl der Vergleichslösungen (3.11) und 2 µl der Probelösung (5.1) werden auf die Dünnschichtplatte aufgetragen. Die Dünnschichtplatte wird bei Raumtemperatur und unter Lichtschutz bis zu einer Höhe von 150 mm entwickelt.

5.2.3. Die Dünnschichtplatte wird der Kammer entnommen und bei Raumtemperatur aufbewahrt, bis das Fließmittel verdunstet ist.

5.3. Detektion

5.3.1. Die Dünnschichtplatte wird im ultravioletten Licht der Wellenlänge 254 nm betrachtet; die Flecke werden markiert.

5.3.2. Anschließend wird die Dünnschichtplatte besprüht entweder mit

— dem Silbernitrat-Reagenz (3.16.1) oder

— dem 12-Molybdatophosphorsäure-Reagenz (3.16.2) und auf etwa 120 °C erhitzt oder

— der Mischung aus Kaliumhexacyanoferrat(III)-Lösung und Eisen(III)-chlorid-Lösung (3.16.3).

6. **Auswertung**

Der R_f-Wert wird für jeden Fleck berechnet.

Die für die Probelösung erhaltenen Flecke werden mit denen der Vergleichslösungen im Hinblick auf ihre R_f-Werte, die Farbe der Flecke im UV-Licht und die Farben der Flecke nach Sichtbarmachung mit dem Sprühreagenz verglichen.

Man führt die im folgenden Abschnitt B beschriebene HPLC durch und vergleicht die Retentionszeiten der Probenpeaks mit denen der Vergleichslösungen.

Der Nachweis von Hydrochinon und seiner Ether wird durch Kombination der Ergebnisse der DC und der HPLC geführt.

7. **Bemerkungen**

Unter den angegebenen Bedingungen wurden folgende R_f-Werte ermittelt:

Hydrochinon	0,32
Hydrochinonmonomethylether	0,53
Hydrochinonmonoethylether	0,55
Hydrochinonmonobenzylether	0,58

B. BESTIMMUNG

1. **Zweck und Anwendungsbereich**

Diese Methode beschreibt ein Verfahren zur Bestimmung von Hydrochinon, Hydrochinonmonomethylether, Hydrochinonmonoethylether und Hydrochinonmonobenzylether (Monobenzon) in kosmetischen Mitteln zur Aufhellung der Haut (Hautbleichmittel).

2. **Kurzbeschreibung**

Die Probe wird mit einer Wasser/Methanol-Mischung extrahiert, wobei durch schwaches Erwärmen das Schmelzen etwaig vorhandener Fette gewährleistet wird. Die Bestimmung der Analyten im Extrakt erfolgt durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit reverser Phase und UV-Detektion.

3. **Reagenzien**

3.1. Alle Reagenzien müssen analysenrein sein. Wasser muß destilliert sein oder zumindest gleichwertige Reinheit aufweisen.

3.2. Methanol

3.3. Hydrochinon

3.4. Hydrochinonmonomethylether

3.5. Hydrochinonmonoethylether

3.6. Hydrochinonmonobenzylether (Monobenzon)

3.7. Tetrahydrofuran für die HPLC

3.8. Wasser/Methanol-Mischung 1+1 (V+V): 1 Volumenteil Wasser und 1 Volumenteil Methanol (3.2) werden gemischt.

3.9. Mobile Phase: Tetrahydrofuran/Wasser-Mischung 45+55 (V+V): 45 Volumenteile Tetrahydrofuran (3.7) und 55 Volumenteile Wasser werden gemischt.

3.10. Standardlösung

0,06 g Hydrochinon (3.3), 0,08 g Hydrochinonmonomethylether (3.4), 0,10 g Hydrochinonmonoethylether (3.5) und 0,12 g Hydrochinonmonobenzylether (3.6) werden in einen 50-ml-Meßkolben genau eingewogen, in Methanol (3.2) gelöst und anschließend mit Methanol zur Marke aufgefüllt. 10,00 ml dieser Stammlösung werden mit der Wasser/Methanol-Mischung (3.8) zu 50,00 ml verdünnt.

Die Lösungen sind frisch herzustellen.

4. **Geräte**

Normale Laborausstattung und

4.1. Wasserbad, auf 60 °C konstant einstellbar

4.2. Hochleistungsflüssigkeitschromatograph mit UV-Detektor mit variabler Wellenlänge und mit 10 μl-Probenschleife

4.3. Analytische Trennsäule

Material: Edelstahl

Länge: 25 cm

Innendurchmesser: 4,6 mm

Aktiver Festkörper: Zorbax Phenyl (6 µm) oder gleichwertiges Erzeugnis (mit Phenylalkylgruppen modifiziertes Kieselgel und end-capped mit Trimethylchlorsilan)

Falls eine Vorsäule verwendet wird, muß sie die gleichen Eigenschaften wie die Trennsäule besitzen.

4.4. Papierfilter, Durchmesser 90 mm (Schleicher und Schüll, Weißband Nr. 5892, oder gleichwertiges Erzeugnis)

5. **Durchführung**

5.1. Vorbereitung der Probe

1 g ± 0,1 g (a Gramm) der Probe wird auf drei Dezimalstellen genau in einen 50-ml-Meßkolben eingewogen. Nach Zusatz von 25 ml der Wasser/Methanol-Mischung (3.8) wird der verschlossene Kolben mindestens 1 Minute kräftig geschüttelt, bis eine homogene Suspension erhalten wird. Zur Verbesserung der Extraktion wird der Kolben im Wasserbad (4.1) auf 60 °C erwärmt. Nach dem Abkühlen wird mit der Wasser/Methanol-Mischung (3.8) zur Marke aufgefüllt. Die Mischung wird durch ein Papierfilter (4.4) filtriert.

Die HPLC-Bestimmung ist innerhalb von 24 Stunden nach Herstellung der Probelösung durchzuführen.

5.2. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

5.2.1. Bedingungen für die Chromatographie

Volumenstrom der mobilen Phase (3.9): 1,0 ml/min

Detektionswellenlänge: 295 nm

5.2.2. 10 µl der Probelösung (5.1) werden chromatographiert, das Chromatogramm aufgezeichnet und die Peakflächen ermittelt.

Die Kalibrierung wird, wie unter 5.2.3 beschrieben, durchgeführt.

Die Chromatogramme der Probe- und der Standardlösung werden verglichen.

Unter Verwendung der Peakflächen und des gemäß Abschnitt 5.2.3 ermittelten Responsefaktors (RF) wird der Gehalt der Analyten in der Probelösung berechnet.

5.2.3. Kalibrierung

10 µl der Standardlösung (3.10) werden chromatographiert, das Chromatogramm aufgezeichnet und die Peakflächen ermittelt.

Die Wiederholbarkeit des Meßsignals wird durch wiederholtes Chromatographieren überprüft.

Der Responsefaktor RF_i wird wie folgt berechnet:

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

p_i = Peakfläche für Hydrochinon, Hydrochinonmonomethylether, Hydrochinonmonoethylether oder Hydrochinonmonobenzylether

c_i = Konzentration (g/50 ml) von Hydrochinon, Hydrochinonmonomethylether, Hydrochinonmonoethylether oder Hydrochinonmonobenzylether in der Standardlösung (3.10)

Die Chromatogramme der Standardlösung und der Probelösung sollen folgende Bedingungen erfüllen:

— Peakauflösung: Die Peakauflösung soll mindestens 0,90 betragen (zur Definition der Peakauflösung siehe Abbildung 1).

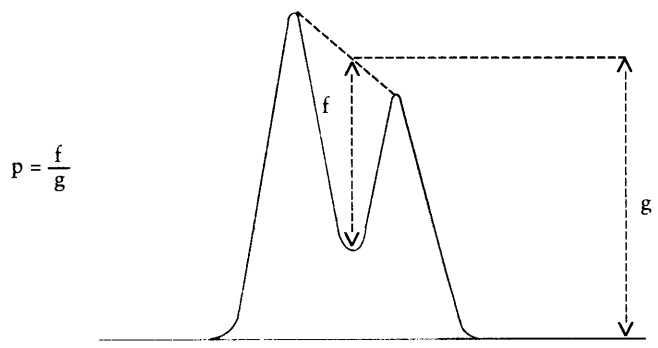

Abbildung 1: **Peakauflösung**

Falls die erforderliche Auflösung nicht erreicht wird, verwendet man entweder eine leistungsfähigere Säule oder verändert die Zusammensetzung der mobilen Phase, bis die Bedingung erfüllt ist.

— Peakasymmetrie: Der Asymmetriefaktor A_S soll zwischen 0,9 und 1,5 liegen (zur Definition des Asymmetriefaktors siehe Abbildung 2). Bei der Aufzeichnung des Chromatogramms zur Bestimmung der Peakasymmetrie sollte der Papiervorschub mindenstens 2 cm/min betragen.

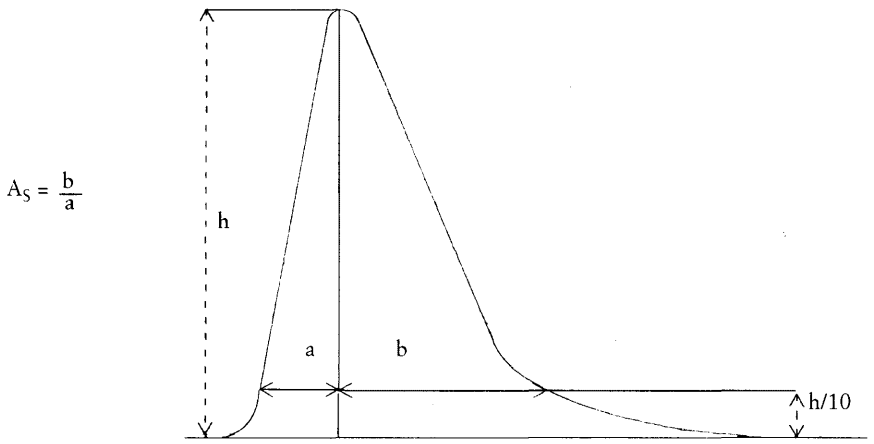

Abbildung 2: **Asymmetriefaktor A_S**

— Basislinie: Die Basislinie sollte stabil sein.

6. **Berechnung**

Der Gehalt des/der Analyten in Prozent (x_i) der Probe wird anhand der Peakflächen nach folgender Formel berechnet:

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

a = Einwaage der untersuchten Probe in Gramm

b_i = Peakfläche des Analyten i in der Probelösung

RF_i = Responsefaktor nach 5.2.3

7. **Wiederholbarkeit** (1)

7.1. Bei einem Hydrochinongehalt von 2,0 % (m/m) dürfen die Ergebnisse zweier an derselben Probe parallel durchgeführter Bestimmungen um nicht mehr als 0,13 % (m/m) voneinander abweichen.

7.2. Bei einem Hydrochinonmonomethylethergehalt von 1,0 % (m/m) dürfen die Ergebnisse zweier an derselben Probe parallel durchgeführter Bestimmungen um nicht mehr als 0,1 % (m/m) voneinander abweichen.

7.3. Bei einem Hydrochinonmonoethylethergehalt von 1,0 % (m/m) dürfen die Ergebnisse zweier an derselben Probe parallel durchgeführter Bestimmungen um nicht mehr als 0,11 % (m/m) voneinander abweichen.

7.4. Bei einem Hydrochinonmonobenzylethergehalt von 1,0 % (m/m) dürfen die Ergebnisse zweier an derselben Probe parallel durchgeführter Bestimmungen um nicht mehr als 0,11 % (m/m) voneinander abweichen.

8. **Vergleichbarkeit** (1)

8.1. Bei einem Hydrochinongehalt von 2,0 % (m/m) dürfen die Ergebnisse zweier an derselben Probe unter Vergleichsbedingungen (verschiedene Laboratorien, verschiedene Bearbeiter, verschiedene Geräteausrüstung) durchgeführter Bestimmungen um nicht mehr als 0,37 % (m/m) voneinander abweichen.

(1) ISO 5725.

8.2. Bei einem Hydrochinonmonomethylethergehalt von 1,0 % (m/m) dürfen die Ergebnisse zweier an derselben Probe unter Vergleichsbedingungen (verschiedene Laboratorien, verschiedene Bearbeiter, verschiedene Geräteausrüstung) durchgeführter Bestimmungen um nicht mehr als 0,21 % (m/m) voneinander abweichen.

8.3. Bei einem Hydrochinonmonoethylethergehalt von 1,0 % (m/m) dürfen die Ergebnisse zweier an derselben Probe unter Vergleichsbedingungen (verschiedene Laboratorien, verschiedene Bearbeiter, verschiedene Geräteausrüstung) durchgeführter Bestimmungen um nicht mehr als 0,19 % (m/m) voneinander abweichen.

8.4. Bei einem Hydrochinonmonobenzylethergehalt von 1,0 % (m/m) dürfen die Ergebnisse zweier an derselben Probe unter Vergleichsbedingungen (verschiedene Laboratorien, verschiedene Bearbeiter, verschiedene Geräteausrüstung) durchgeführter Bestimmungen um nicht mehr als 0,11 % (m/m) voneinander abweichen.

9. **Bemerkungen**

9.1. Wenn ein wesentlich höherer Hydrochinongehalt als 2 % (m/m) ermittelt wird und eine genaue Gehaltsbestimmung erforderlich ist, sollte die Probelösung (5.1) auf einen ähnlichen Gehalt verdünnt werden, wie er sich bei einer 2 % Hydrochinon enthaltenden Probe ergeben würde, und die Bestimmung ist zu wiederholen.

(Bei hohen Hydrochinongehalten kann die Absorption außerhalb des linearen Bereiches des Detektors liegen.)

9.2. Störeinflüsse

Die beschriebene Methode ermöglicht die Bestimmung von Hydrochinon und seinen Ethern in einem einzigen isokratischen Lauf. Die Verwendung einer Phenylsäule gewährleistet eine hinreichende Retention für Hydrochinon, was bei Benutzung einer C 18-Säule mit der beschriebenen mobilen Phase nicht garantiert werden kann.

Diese Methode unterliegt jedoch möglicherweise den Störeinflüssen durch eine Reihe von p-Hydroxybenzoesäureestern (Parabene). In diesen Fällen ist die Bestimmung unter Verwendung eines anderen Trennsystems (stationäre und mobile Phase) zu wiederholen. Geeignete Methoden sind (siehe die in den Fußnoten 1 und 2 angegebene Literatur):

Analytische Trennsäule [1]: 4,6 mm × 25 cm

Aktiver Festkörper: Mit Octadecylgruppen modifiziertes Kieselgel (Zorbax ODS oder gleichwertiges Erzeugnis)

Temperatur: 36 °C

Volumenstrom der mobilen Phase: 1,5 ml/min

Mobile Phase: für Hydrochinon: Methanol/Wasser 5+95 (V+V)
für Hydrochinonmonomethylether: Methanol/Wasser 30+70 (V+V)
für Hydrochinonmonobenzylether: Methanol/Wasser 80+20 (V+V)

Analytische Trennsäule [2]:

Aktiver Festkörper: Mit Octadecylgruppen modifiziertes Kieselgel (Spherisorb S5-ODS oder gleichwertiges Erzeugnis)

Volumenstrom der mobilen Phase: 1,5 ml/min

Mobile Phase: Wasser/Methanol 90+10 (V+V)

Diese Bedingungen eignen sich für Hydrochinon.

---

[1] M. Herpol-Borremans und 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 und I. Rix, Determination of Hydroquinone in skin toning creams, Analyst (1986), 111, S. 129.