

ILNAS

Institut luxembourgeois de la normalisation
de l'accréditation, de la sécurité et qualité
des produits et services

ILNAS-EN 16274:2021

Analyseverfahren für Allergene - Quantifizierung einer erweiterten Liste von 57 zu vermutenden Allergenen in einspritzfertigen Duftstoffen mittels

Méthode d'analyse des allergènes -
Quantification de la liste étendue des 57
allergènes suspectés dans les matières
premières de parfumerie et les

Method for analysis of allergens -
Quantification of an extended list of 57
suspected allergens in ready to inject
fragrance materials by gas

05/2021

Nationales Vorwort

Diese Europäische Norm EN 16274:2021 wurde als luxemburgische Norm ILNAS-EN 16274:2021 übernommen.

Alle interessierten Personen, welche Mitglied einer luxemburgischen Organisation sind, können sich kostenlos an der Entwicklung von luxemburgischen (ILNAS), europäischen (CEN, CENELEC) und internationalen (ISO, IEC) Normen beteiligen:

- Inhalt der Normen beeinflussen und mitgestalten
- Künftige Entwicklungen vorhersehen
- An Sitzungen der technischen Komitees teilnehmen

<https://portail-qualite.public.lu/fr/normes-normalisation/participer-normalisation.html>

DIESES WERK IST URHEBERRECHTLICH GESCHÜTZT

Kein Teil dieser Veröffentlichung darf ohne schriftliche Einwilligung weder vervielfältigt noch in sonstiger Weise genutzt werden - sei es elektronisch, mechanisch, durch Fotokopien oder auf andere Art!

Deutsche Fassung

Analyseverfahren für Allergene - Quantifizierung einer erweiterten Liste von 57 zu vermutenden Allergenen in einspritzfertigen Duftstoffen mittels Gaschromatographie/Massenspektrometrie

Method for analysis of allergens - Quantification of an extended list of 57 suspected allergens in ready to inject fragrance materials by gas chromatography mass spectrometry

Méthode d'analyse des allergènes - Quantification de la liste étendue des 57 allergènes suspectés dans les matières premières de parfumerie et les compositions parfumantes prêtes à être injectées, par chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 8. Februar 2021 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, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, der Republik Nordmazedonien, 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: Rue de la Science 23, B-1040 Brüssel

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich.....	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	6
4 Kurzbeschreibung	6
5 Reagenzien.....	7
5.1 Lösemittel.....	7
5.1.1 Methylpivalat.....	7
5.1.2 tert-Butylmethylether (MTBE)	7
5.2 Referenzproben (zu vermutende Allergene)	7
5.2.1 Allgemeines	7
5.3 Interne Standards (ISTD).....	11
5.3.1 1,4-Dibrombenzen (IS _A), CAS-Nr. [106-37-6], Reinheit \geq 98 %.....	11
5.3.2 4,4'-Dibrombiphenyl (IS _B), CAS-Nr. [92-86-4], Reinheit \geq 98 %.....	11
6 Geräte.....	11
6.1 Gaschromatograph mit Flammenionisationsdetektor (GC-FID).....	11
6.2 Gaschromatograph mit gekoppeltem Massenspektrometer (GC-MS)	11
6.2.1 Allgemeines	11
6.2.2 GC-MS-System.....	11
6.3 Kapillarsäulen für GC	12
6.4 Analysenwaage.....	12
7 Stamm- und Probenlösungen - Herstellung und Lagerung	13
7.1 Allgemeine Informationen	13
7.1.1 Wahl des Lösemittels	13
7.1.2 Sonstiges	13
7.2 Herstellung von Stammlösungen aus Referenzproben	13
7.3 Herstellung von Lösungen des internen Standards und Kalibrierlösungen	13
7.3.1 Allgemeines	13
7.3.2 Stammlösungen von internen Standards (entspricht 1 g/kg)	14
7.3.3 Konzentrationen von Kalibrierlösungen.....	14
7.3.4 Herstellung von Kalibrierlösungen	15
8 Bedingungen für die Erfassung mit Massenspektrometern	17
8.1 Festlegung von Retentionszeiten und SIM-Chromatograph-Fenstern.....	17
8.2 SIM-Fenster — Einstellung und Kriterien	17
8.3 GC-MS-Scanmodus Überprüfung.....	18
9 Probenanalyse	18
9.1 Allgemeines	18
9.2 Herstellung der Probe für die Analyse	18
9.3 Ablauf.....	18
9.3.1 Blindwertprobe.....	18
9.3.2 Kalibrierlösungen	19
9.3.3 Kontrolllösung.....	19

9.3.4	Proben	19
10	Datenvalidierung und -bearbeitung.....	20
10.1	Allgemeines	20
10.2	Untersuchung von Q-Werten.....	20
10.3	Relative Intensität charakteristischer Ionen in SIM.....	21
10.4	Relative Ionenintensität bei Anwendung von Scandaten.....	21
10.5	Schema zur Überprüfung der Daten und Angabe der Endkonzentration.....	21
10.6	GC-MS-Scanmodus Überprüfung.....	21
10.7	Auswertung des Massenspektrums im SCAN-Modus	22
11	Prüfbericht.....	22
Anhang A (informativ) Bestimmung der Reinheit von Kalibriermitteln und Referenzproben		23
A.1	Allgemeine Informationen.....	23
A.2	Vollständige Charakterisierung der flüchtigen Bestandteile	25
A.2.1	Identifizierung der einzelnen Bestandteile der Referenzproben mittels GC-MS	25
A.2.2	Berechnung des vorhergesagten RRF (RRFpred).....	25
A.2.3	Berechnung der Menge an flüchtigen Bestandteilen in den einzelnen Referenzproben.....	26
A.3	Bestimmung der Reinheit (%) aus RRF oder FID-Fläche in %	27
Anhang B (informativ) GC-Kapillarsäulenparameter		30
Anhang C (informativ) SIM-Ionen für SIM- oder SIM-SCAN-Anwendungen		31
Anhang D (informativ) Beispiel für SIM-Fenster		37
Anhang E (informativ) Beispiel für Chromatogramme		45
Anhang F (normativ) Entscheidungsbaum zur Quantifizierung von zu vermutenden Allergenen.....		47
Anhang G (informativ) Herstellung von Stammlösungen aus Referenzproben.....		48
G.1	Allgemeine Informationen.....	48
G.2	Reinheit der Referenzprobe.....	48
G.3	Stammlösungen.....	49
G.3.1	Getrennte Stammlösungen von Allergenen (10 g/kg).....	49
Anhang H (informativ) Kalibrierverfahren und Ansatz.....		53
H.1	Auftragen der Kalibrierkurve.....	53
H.1.1	Allgemeines	53
H.1.2	Asymmetrie des Peaks und Auswirkung auf die Kalibrierung.....	53
H.1.3	Auswahl des internen Standards.....	54
H.1.4	Auswahl des internen Standards.....	54
Anhang I (informativ) Quantifizierung der Allergene		55
I.1	Allgemeine Informationen.....	55
I.2	Bestimmung von C ₀	56
I.3	Beurteilung der analytischen Messung.....	57
I.4	Untersuchung von Q-Werten.....	57
Anhang J (informativ) Als Zielanalyten ausgewählte zu vermutende Allergene — Begründung.....		58
Anhang K (informativ) Andere allgemeine Informationen		65
Literaturhinweise.....		66

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN 16274:2021) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 347 „Analyseverfahren für Allergene“ erarbeitet, dessen Sekretariat von SNV gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis November 2021, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis November 2021 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.

Dieses Dokument ersetzt EN 16274:2012.

Die wesentlichen technischen Änderungen im Vergleich zur Vorgängerausgabe sind folgende:

- Die Anzahl der Allergene wurde von 26 auf 57 chemisch definierte Moleküle erhöht.
- Lösemittel: geht von Methylpivalat und ortho-Fluorotoluol und Aceton zu Methylpivalat und MTBE und anderen Lösemitteln über, sofern diese vor ihrer Verwendung getestet werden.
- Probenvorbereitung: ermöglicht die Verwendung des Masse/Volumen-Ansatzes anstelle des reinen Masse/Masse-Ansatzes.
- Datenverarbeitung: bietet Erklärungen für eine Kalibrierkurve unter Verwendung eines erzwungenen Durch-Null-Ansatzes.

Dieses Dokument wurde im Rahmen eines Mandats erarbeitet, das die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelsassoziation CEN erteilt haben, und unterstützt grundlegende Anforderungen der EU-Richtlinien.

Entsprechend der CEN-CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, die Republik Nordmazedonien, 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

Richtlinie 2003/15/EG zur Änderung der Richtlinie 76/768/EWG des Rates zur Angleichung der Rechtsvorschriften der Mitgliedstaaten über kosmetische Mittel regelt die Verpflichtung, Verbraucher über das Vorhandensein von 24 chemisch definierten Duftstoffen zu informieren, die als potenzielle Allergene in kosmetischen Mitteln identifiziert wurden. Nach der Veröffentlichung des Dokuments des Wissenschaftlichen Ausschusses „Verbrauchersicherheit“ (en: Scientific Committee on Consumer Safety, SCCS/1459/11) wurde vorgeschlagen, dieses Dokument auf 57 Duftstoffe auszudehnen, von denen einige in mehreren isomeren Formen oder als Gemische vorliegen. Dies erforderte die Entwicklung eines neuen Quantifizierungsverfahrens als Reaktion auf die Entwicklung von behördlichen Anforderungen.

Das neue Untersuchungsverfahren wurde unter Anwendung der Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC-MS) entwickelt, um die 57 Duftstoffe und ihre relevanten Isomere in einspritzfertigen Verbindungen von Duftstoffen und Rohstoffen von Duftstoffen nachzuweisen und zu quantifizieren.

Das Verfahren, das in diesem Dokument beschrieben wird, enthält keine Anforderungen an die Probenvorbereitung in Matrices, bei denen ein direktes Einspritzen in den GC nicht durchführbar ist.

Das vorliegende Dokument beschreibt ein funktionierendes Untersuchungsverfahren, das auf den Entwicklungen der IFRA Analytical Working Group basiert. Das Untersuchungsverfahren wurde auf der Grundlage eines Ringversuchs validiert, der von der CEN-Arbeitsgruppe unter Anwendung des Genauigkeitsprofilansatzes durchgeführt wurde.

1 Anwendungsbereich

Das vorliegende Verfahren ermöglicht die Identifizierung und Quantifizierung der als Allergene vermuteten flüchtigen Verbindungen, die in den in kosmetischen Mitteln verwendeten Verbindungen von Duftstoffen und Rohstoffen von Duftstoffen enthalten sind. Die Analyse wird mithilfe der Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC-MS) an Matrixproben durchgeführt, die „einspritzfertig“ und mit der Gaschromatographie kompatibel sind.

Die von diesem Verfahren erfassten Analyten basieren auf den Inhalten der in der Stellungnahme des SCCS 1459/11 (1) enthaltenen Tabelle 13.1 und Tabelle 13.2 und den von der Europäischen Kommission vorgeschlagenen aufgeführten Rechtsvorschriften. Die Begründung für die endgültige Auswahl der während des Verfahrens angewendeten Analyten ist in der in Anhang J enthaltenen Tabelle aufgeführt.

Das Verfahren wurde auf IFRA- und CEN-Ebene validiert.

2 Normative Verweisungen

Es gibt keine normativen Verweisungen in diesem Dokument.

3 Begriffe

In diesem Dokument werden keine Begriffe aufgeführt.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

- IEC Electropedia: verfügbar unter <http://www.electropedia.org/>
- ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <https://www.iso.org/obp>

4 Kurzbeschreibung

Dieses Verfahren umfasst einen Kalibrierbereich von 2 ppm bis 240 ppm; dies erlaubt die Quantifizierung von zu vermutenden Allergenen in verdünnten Matrices im Bereich von 20 ppm bis 2 400 ppm je Analyt. Über die obere Konzentrationsstufe hinaus besteht die Empfehlung, dass die Probe weiter verdünnt werden sollte oder dass GC-FID (GC mit Flammenionisationsdetektion) vorzugsweise in Kombination mit internem Standard und Responsefaktoren angewendet wird.

Die Matrixproben werden in insgesamt 4 Durchläufen mithilfe von GC-MS auf zu vermutende Allergene analysiert, wobei 2 Analytensätze verwendet werden, die beide auf zwei getrennte Säulen unterschiedlicher Polarität injiziert werden. Wenn erforderlich, sollten die Matrixproben zuerst in einem geeigneten Lösemittel verdünnt werden.

Ihre Identifizierung und Quantifizierung wird durch die Betriebsart Einzelionenregistrierung (SIM, en: selected ion monitoring; SIM-SCAN) über die relative Häufigkeit von 3 charakteristischen Fragment-Ionen erreicht. Die Berechnung und Verwendung des entsprechenden Q-Werts oder eines ähnlichen Datenauswertungsfaktors können angewendet werden und es wird ein „Entscheidungsbaum“ (siehe Anhang F, Bild F.1) für die Endprüfung und Validierung der Daten durch einen geschulten und erfahrenen Analytiker beschrieben. Es wird eine zusätzliche vollständige SCAN-Analyse empfohlen, um das Vorhandensein des Allergens in Matrixproben zu bestätigen, wenn nur das SIM-Verfahren angewendet wurde.

Ihre Quantifizierung erfolgt in allen Modi durch Kalibrierung unter Anwendung von Standardlösungen und der internen Standards 1,4-Dibrombenzol und 4,4'-Dibrombiphenyl. Der „Entscheidungsbaum“ wird zur

Bestimmung der Endkonzentration unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Konzentrationswerte angewendet, die bei der Analyse in beiden Säulen erhalten wurden.

5 Reagenzien

5.1 Lösemittel

5.1.1 Methylpivalat

CAS [598-98-1]

Reinheit $\geq 99\%$

Eine Destillation zur Erzielung einer Reinheit von $> 99,9\%$ ist empfehlenswert, um Verunreinigungen zu beseitigen, die wahrscheinlich das Signal von Analyten, z. B. Terpenen, beeinträchtigen. Wird eine handelsübliche Qualität verwendet, muss untersucht und bestätigt werden, dass diese keine Störsignale hervorruft.

5.1.2 tert-Butylmethylether (MTBE)

CAS [1634-04-4]

Reinheit $\geq 99\%$

Eine Destillation zur Erzielung einer Reinheit von $> 99,9\%$ ist empfehlenswert, um Verunreinigungen zu beseitigen, die wahrscheinlich das Signal von Analyten, z. B. Terpenen, beeinträchtigen. Wird eine handelsübliche Qualität verwendet, muss analysiert und bestätigt werden, dass diese keine Störsignale hervorruft.

Alternative Lösemittel sind verfügbar. Wenn diese für dieses Verfahren verwendet werden, dann muss der Bearbeiter eine ausreichende Bewertung vornehmen, um nachzuweisen, dass das Lösemittel keine Bestandteile enthält, die die Analyten bei diesem Verfahren beeinträchtigen würden.

5.2 Referenzproben (zu vermutende Allergene)

5.2.1 Allgemeines

Zu Beginn sollte die Reinheit aller Standards durch GC-FID (Anhang A) bestimmt werden, wenn dies nicht vom Lieferanten zertifiziert wurde. Die genaue CAS-Nummer des Zielanalyten und die Begründung dafür sind in Anhang J angegeben.

5.2.1.1 α -Acetylcedren (Hauptisomer in Vertofix®, angegeben in CAS-Nummer), CAS-Nr. [32388-55-9]

Hochvariable Zusammensetzung mit mindestens zwölf Bestandteilen mit einer Molekülmasse von 246 atomaren Masseneinheiten (nachfolgend als u bezeichnet).

5.2.1.2 Acetylisoeugenol/Isoeugenolacetat, CAS-Nr. [93-29-8]

5.2.1.3 Amylsalicylat, Pentylsalicylat CAS-Nr. [2050-08-0]

Dieses kann Isoamylsalicylat (CAS-Nr. [87-20-7]) enthalten, das nicht in dieser Untersuchung enthalten sein sollte.