

# Kortlægning af kemiske stoffer i forbrugerprodukter

Kortlægning nr. 9 2002

## Validering af en GC og GC-MS metode til kvantificering af potentielle kontaktallergener i naturkosmetikprodukter indeholdende planteekstrakter og/eller æteriske olier

Lars P. Christensen, Danmarks JordbrugsForskning, Afdeling for Prydplanter og Vegetabilske Fødevarer, Forskningscenter Årsløv



# Indhold

<b>FORORD</b>	<b>5</b>
<b>1 SAMMENFATNING OG KONKLUSIONER</b>	<b>6</b>
1.1 SAMMENFATNING	6
1.2 KONKLUSIONER	6
<b>2 BAGGRUND</b>	<b>7</b>
<b>3 FORMÅL</b>	<b>9</b>
<b>4 VALIDITET, REFERENCE OG ANSVAR</b>	<b>10</b>
4.1 VALIDITET	10
4.2 REFERENCE	10
4.3 ANSVAR	10
<b>5 METODEBESKRIVELSE</b>	<b>12</b>
5.1 AFGRÆNSNING	12
5.2 Udstyr, kemikalier og materialer	12
5.2.1 Gaskromatografi (GC)	12
5.2.2 Gaskromatografi–massespektrometri (GC–MS)	12
5.2.3 Kemikalier og materialer	12
5.2.4 Undersøgte naturkosmetikprodukter	13
5.3 KLARGØRING AF GC–MS Udstyr	13
5.4 KLARGØRING AF GC Udstyr	14
5.5 KLARGØRING AF PRØVER TIL GC OG GC–MS ANALYSE	14
5.5.1 Klargøring af eksterne standardopløsninger	14
5.5.2 Klargøring af standardopløsning indeholdende potentielle kontaktallergener	15
5.5.3 Klargøring af naturkosmetikprodukt prøver indeholdende planteekstrakter og/eller æteriske olier	15
5.6 IDENTIFIKATION AF POTENTIELLE KONTAKTALLERGENER OG/ELLER IRRITATIVE FORBINDELSER I NATURKOSMETIKPRODUKTER	15
<b>6 GODKENDELSE AF ANALYSEN</b>	<b>16</b>
6.1 GODKENDELSE AF DEN ANALYSEREDE PRØVE	16
6.2 GODKENDELSE, REGISTRERING OG INDSKRIVNING AF RESULTATERNE	17
<b>7 VALIDITETEN AF GC OG GC–MS METODEN</b>	<b>18</b>
7.1 ROBUSTHED	18
7.1.1 Kolonne	18
7.1.2 Flow	18
7.1.3 Temperatur	18
7.2 DETEKTIONS- OG KVANTIFICERINGSGRÆNSER	19
7.3 LINEARITET	19

7.4	NØJAGTIGHED	21
7.5	PRÆCISION (REPETERBARHED)	21
<b>8</b>	<b>KONCENTRATION AF KONTAKTALLERGENER I NATURKOSMETIKPRODUKTER</b>	<b>22</b>
<b>9</b>	<b>REFERENCER</b>	<b>24</b>

# Forord

I parfumer og andre naturkosmetikprodukter, der benyttes i aromaterapi, indgår æteriske olier som en vigtig bestanddel af produkterne. De fleste æteriske olier indeholder ofte allergifremkaldende duftstoffer. Allergisk kontakteksem forårsaget af naturkosmetikprodukter skyldes derfor ofte disse lavmolekylære naturstoffer fra de æteriske olier hvilket også afspejler sig ved at i ca. 1/3 af de undersøgte tilfælde af allergi overfor naturkosmetikprodukter kan årsagen henføres til allergifremkaldende duftstoffer.

En sensitiv og simple metode til detektion og kvantificering af potentielle kontaktallergener og/eller irritative forbindelser fra planter i naturkosmetikprodukter synes derfor at være yderst relevant. En sådan metode vil gøre det muligt at give en hurtig og præcis bestemmelse af mængden og udbredelsen af disse naturstoffer i naturkosmetikprodukter samt være en stor hjælp i søgen efter nye potentielle kontaktallergener og/eller irritative forbindelser i disse produkter.

Det er projektets formål at finde en velegnet metode til ekstraktion og til identifikation og kvantificering af potentielle lavmolekylære kontaktallergener i naturkosmetikprodukter, herunder produkter der indgår i aromaterapi, der forårsager kontaktallergi og/eller irritativ kontakteksem. Det er ligeledes projektets formål at lave en validering af metoden i overensstemmelse med EU's gældende regler for metodevalidering (ICH guidelines), således at den også kan anvendes i andre laboratorier.

Projektet er udført af Danmarks JordbrugsForskning, Afdeling for Prydplanter og Vegetabilske Fødevarer, Forskningscenter Årslev.

# 1 Sammenfatning og konklusioner

## 1.1 Sammenfatning

Potentielle kontaktallergener i naturkosmetikprodukter er oftest lavmolekylære naturstoffer med en molekylvægt under 300 amu. En sensitiv, robust og relativt simple metode til detektion og kvantificering af sådanne naturstoffer i naturkosmetikprodukter er blevet udviklet. Metoden er baseret på teknikker som gaskromatografi (GC) og gaskromatografi–massespektrometri (GC–MS) og valideret i overensstemmelse med internationale guidelines (ICH, Volume 3A guidelines fra EU, 1998).

I metodeudviklingen er der fokuseret på identifikation og kvantificering af en lang række udvalgte lavmolekylære forbindelser, der alle er påvist at kunne fremkalde allergisk kontakteksem og/eller irritativ kontakteksem.

Naturkosmetikprodukter indeholdende planteekstrakter og/eller æteriske olier, herunder olier der bruges i aromaterapi, blev undersøgt for almindelige potentielle kontaktallergener. Potentielle kontaktallergener og/eller irritative forbindelser, der bestod af monoterpener (f.eks.  $\alpha$ -pinen,  $\alpha$ -terpinen, linalylacetat og linalool) og phenoler (eugenol og isoeugenol), blev fundet i 6 ud af 10 undersøgte naturkosmetikprodukter.

## 1.2 Konklusioner

Udfra valideringen af GC and GC–MS metoden (DIAS ALLERGENS 1, dato 21.12 2001) til detektion og kvantificering af naturligt forekommende kontaktallergener og/eller irritative forbindelser i naturkosmetikprodukter kan følgende konklusioner drages.

Metoden giver en relativ god separation af de udvalgte potentielle kontaktallergener og/eller irritative forbindelser, hvilket gør det muligt at lave en pålidelig kvantificering af forbindelserne i naturkosmetikprodukter. Den relative høje grad af linearitet, nøjagtighed, præcision (reproducerbarhed) og robusthed af metoden sikrer en pålidelig kvantificering af forbindelserne. Kvantificeringsgrænserne ligger på omkring 0,0002  $\mu\text{g/ml}$  for hovedparten af de undersøgte stoffer. Potentielle kontaktallergener og/eller irritative forbindelser i naturkosmetikprodukter nær detektions- og kvantificeringsgrænserne af metoden, menes ikke at have den store indflydelse på udviklingen af allergisk kontakteksem eller irritativ kontakteksem da mængderne er langt under sensibiliseringsgrænsen.

## 2 Baggrund

Produkter, der påføres huden, af ikke medicinske årsager, og som indeholder planteekstrakter, æteriske olier eller på anden måde er produceret ud fra råvarer fra naturen, går generelt under betegnelsen naturkosmetikprodukter. Æteriske olier indeholder ofte mange forskellige velduftende stoffer (duftstoffer) og bruges derfor i stor skala i parfumer, cremer og i produkter, der bruges i aromaterapi. Med hensyn til planteekstrakter, der ofte er vandekstrakter, er der ikke nogen rationel forklaring på hvorfor disse skal inkluderes i naturkosmetikprodukter. Planteekstrakter tilsættes ofte naturkosmetikprodukterne hovedsageligt for at kunne hævde at produktet er med ”planteekstrakter”, ”gavnige ekstrakter fra medicinalplanter” eller indeholder ”naturlige ingredienser fra planter”, med det formål at sælge mere. Typisk indeholder naturkosmetikprodukter omkring 0,1% vandekstrakt. Nogle naturkosmetikprodukter indeholder dog relativt store mængder planteekstrakter, men dette er mere undtagelsen end reglen. En nærmere beskrivelse over de hyppigst anvendte planteekstrakter i naturkosmetikprodukter er blevet beskrevet af Nater & de Groot (1985).

Planteekstrakter og/eller æteriske olier indeholder mange forskellige typer af naturstoffer, hvoraf nogle kan forårsage allergisk kontakteksem (kontakt-allergi) og/eller irritativt kontakteksem. Planteekstrakter fra forskellige *Compo-sitae* arter (kurvblomstret) benyttes ofte i naturkosmetikprodukter, og disse planteekstrakter kan have et relativt højt indhold af stærkt sensibiliserende sesquiterpenlaktoner. Af velkendte kontaktallergener fra *Compositae* arter kan nævnes sesquiterpenlaktonerne costunolid og parthenolid (Evans & Schmidt, 1980; Hausen, 1988; Lovell, 1993). Også mindre sensibiliserende naturstoffer indgår i naturkosmetikprodukter, herunder duftstoffer som f.eks. eugenol, iso-eugenol, geraniol, carvon og limonen. Disse stoffer er oftest tilstede i plante-ekstrakter og/eller æteriske olier tilhørende andre plantefamilier end *Compo-sitae*. Velkendte eksempler er æteriske olier udvundet fra citrusfrugter (berga-motolie), jasmin (*Jasminum* arter), mynte (*Mentha* arter) og lavendel (*Laven-dula* arter) (Evans & Schmidt, 1980; Hausen, 1988; Lovell, 1993; Nater & de Groot, 1985).

På trods af de store mængder planteekstrakter der benyttes i kosmetik-industrien, er eksemmer blandt forbrugerne forårsaget af naturkosmetik-produkter indeholdende planteekstrakter relativt sjældne, hvilket sandsynligvis kan henføres til de lave koncentrationer af planteekstrakter, der er i produkterne som før omtalt. Alvorlige eksemmer forårsages derimod noget hyppigere af naturkosmetikprodukter, som f.eks. parfumer og produkter, der benyttes i aromaterapi, hvori relativt store mængder æteriske olier indgår. Allergisk kontakteksem forårsaget af naturkosmetikprodukter skyldes ofte duftstoffer fra de æteriske olier hvilket også afspejler sig ved at i ca. 1/3 af de undersøgte tilfælde af allergi overfor naturkosmetikprodukter kan årsagen henføres til allergifremkaldende duftstoffer (Lovell, 1993). For at detektere allergi overfor duftstoffer benyttes ofte lappeprøver med det såkaldte fragrancemix, kolofonium og perubalsam, der alle kan betragtes som markører for detektion af parfumeallergi. Ved brugen af disse markører er man i stand til at detektere parfumeallergi i ca. 70–80% af tilfældene. Fragrancemix består bl.a. af nogle hyppigt forekommende lavmolekylære allergener som f.eks. eugenol, isoeugenol, cinnamylalkohol og geraniol (Lovell, 1993).

En sensitiv og simpel metode til detektion og kvantificering af potentielle lavmolekylære allergener og/eller irriterende forbindelser fra planter i naturkosmetikprodukter synes derfor at være yderst relevant. En sådan metode vil gøre det muligt at give en hurtig og præcis bestemmelse af mængden og udbredelsen af disse naturstoffer i naturkosmetikprodukter samt være en stor hjælp i søgen efter nye potentielle allergener og/eller irriterende forbindelser i disse produkter.



### 3 Formål

Formålet med denne instruktion er at beskrive en kvalitativ og kvantitativ GC (= gaskromatografi) og GC-MS (= gaskromatografi-massespektrometri) metode til analyse for potentielle lavmolekylære kontaktallergener og/eller irriterende forbindelser i naturkosmetikprodukter indeholdende planteekstrakter og/eller æteriske olier samt at bestemme validiteten af metoden, med navnet DIAS ALLERGENS 1, dato 21.12 2001.

# 4 Validitet, reference og ansvar

## 4.1 Validitet

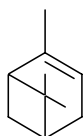
Denne instruktion er gyldig for den kvalitative og kvantitative GC and GC-MS metode til analyse for naturligt forekommende kontaktallergener og/eller irritative forbindelser (se Figur 1) i naturkosmetikprodukter indeholdende (i) plante-ekstrakter og/eller æteriske olier og (ii) olier der benyttes i f.eks. aromaterapi (se afsnit 5) ved Danmarks JordbrugsForskning, Afdeling for Prydplanter og Vegetabilske Fødevarer, Forskergruppe for Fødevarekvalitet og Naturstofkemi, Forskningscenter Årslev. Den beskrevne GC og GC-MS metode er tænkt benyttet til rutinemæssig identifikation og kvantificering af forbindelserne **1-18** (Figur 1) og andre nærtbeslægtet naturligt forekommende allergener og/eller irritative forbindelser. Information om de allergifremkaldende og/eller irritative egenskaber af **1-18** og beslægtede forbindelser er angivet i Evans & Schmidt (1980), Hausen (1988), Hausen et al. (1999), Lovell (1993) og Mitchell & Rook (1979).

## 4.2 Rerence

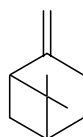
Angående DIAS GC No. 3, DIAS GC-MS No. 1 og DIAS GC kapillarkolonner (DIAS No. 23 og 26) refereres til de respektive kvalitetssikringshåndbøger.

## 4.3 Ansvar

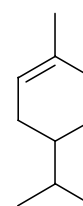
Brugeren af denne instruktion er ansvarlig for at analysen udføres som angivet med den nødvendige nøjagtighed og repeterbarhed samt giver den ansvarlige for analysen besked om eventuelle uregelmæssigheder med apparaturet eller selve analysen.



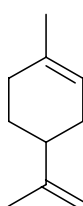
$\alpha$ -Pinen (1)



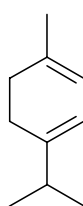
$\beta$ -Pinen (2)



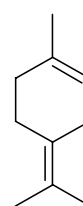
$\alpha$ -Phellandren (3)



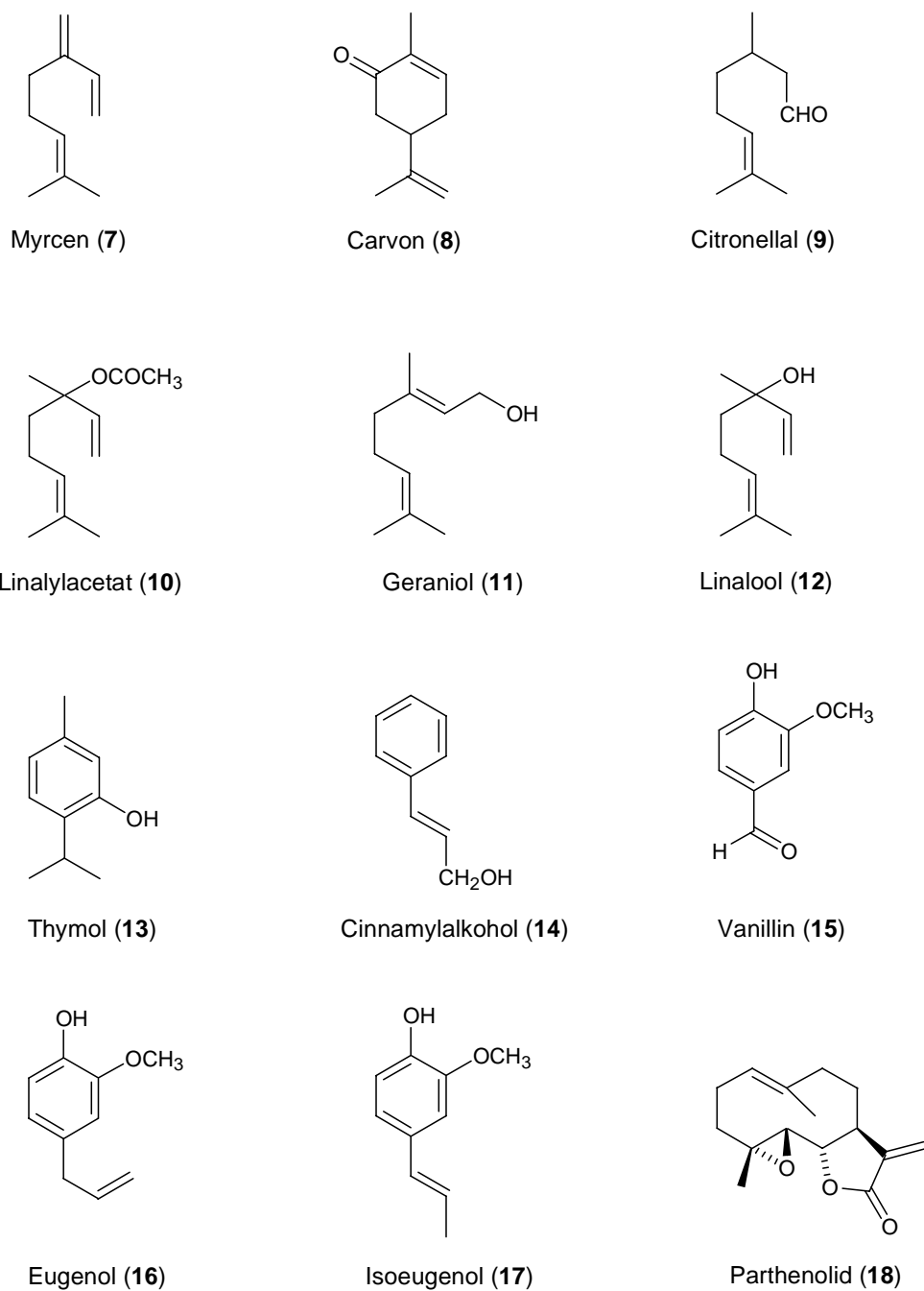
Limonen (4)



$\alpha$ -Terpinen (5)



Terpinolen (6)



**Figur 1.** Kemiske strukturer af de potentielle kontaktallergener og/eller irritative forbindelser (1–18) undersøgt ved metoden DIAS ALLERGENS 1, dato 21.12 2001.

# 5 Metodebeskrivelse

## 5.1 Afgrænsning

Denne metode er en GC og GC-MS metode til kvalitativ og kvantitativ bestemmelse af potentielle kontaktallergener og/eller irritative forbindelser, med en molekylvægt under 300 amu, i planteekstrakter og æteriske olier, og i naturkosmetikprodukter indeholdende planteekstrakter og/eller æteriske olier ved brug af eksterne standarder.

## 5.2 Udstyr, kemikalier og materialer

### 5.2.1 Gaskromatografi (GC)

GC bruges primært til kvantificering af allergener/irritative forbindelser. GC analyserne bliver udført på en Hewlett-Packard 5890 Series II Plus chromatograph (Hewlett-Packard, Wilmington, USA) udstyret med:

- Hewlett-Packard autosampler (GC System Injector).
- Flameioniseringsdetektor (FID).
- En WCOT (Wall Coated Open Tubular) kapillarkolonne (50 m × 0,25 mm i.d., filmtykkelse DF = 0,2 µm: CP-Wax 52 CB, Cat. No. 7723 (DIAS No. 18), Middleburg, Holland).

Instrumenterne styres fra en PC udstyret med en Hewlett-Packard (HP) ChemStation.

### 5.2.2 Gaskromatografi-massespektrometri (GC-MS)

GC-MS benyttes primært til identifikation af nye eller kendte forbindelser og til endelig verifikation af tilstedeværelsen af de respektive allergener/irritative forbindelser i de undersøgte produkter. GC-MS bliver udført på en Varian Saturn 2000 ion trap massespektrometer tilkoblet en Varian Star 3400 CX gaskromatograf (Varian Chromatography Systems, Californien, USA) udstyret med en Rtx-20 kapillarkolonne (30 m × 0,25 mm i.d., filmtykkelse DF = 0,25 µm: katalog no. 10323 (DIAS No. 23), Restek Corporation, Bellefonte, PA, USA). Masse-spekterne genereres ved et ioniseringspotentiale på 70 eV.

Instrumenterne kontrolleres via en PC udstyret med en Saturn GC-MS arbejdsstation, version 5.2.1.

### 5.2.3 Kemikalier og materialer

- Dobbelt destilleret dichloromethan (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) (Super Purity Solvent, Romel Ltd, Chr. Gerner-Jensen, Danmark).
- Forbindelserne **1–17** blev leveret fra Aldrich (Steinheim, Tyskland) eller Fluka Chemie AG (Buchs, Schweiz). Parthenolid (**18**) blev isoleret fra matrem

(*Tanacetum parthenium* (L.) Sch.-Bip.) ved søjlekromatografi og præparativ TLC som beskrevet tidligere (Christensen et al., 1999; Hausen, 1991) og identificeret ved massespektrometri og NMR spektroskopi.

- Nitrogen (evt. urenheder fjernet via aktivt kul filter).
- Helium (evt. urenheder fjernet via aktivt kul filter).
- Hydrogen.
- Målekolber (5 ml).
- GC prøveglas (Sample vials 1,5 ml, clearglass, art. no. 18081 Merck (Darmstadt, Tyskland) og Vial, glass 12/BX (300 µl), part no. 5080-8779 Hewlett-Packard (Amsterdam, Holland)).

#### 5.2.4 Undersøgte naturkosmetikprodukter

Tabel 5.1 er en liste over de 10 produkter, der blev undersøgt. Miljøstyrelsen er bekendt med alle produktnavne og firmaer som prøverne stammer fra.

**Tabel 5.1**

*De analyserede produkter*

<i>MST Reg. Nr.</i>	<i>Produktbeskrivelse</i>
A1	Håndcreme
A2	Ansigtscreme - nat
A3	Massageolie
A4	Ansigtscreme - dag
B1	Bergamotolie
B2	Jasminolie
B3	Mynteolie
B4	Afslappende olie
C1	Hånd- og kropscreme
C2	Hudrensecreme

#### 5.3 Klargøring af GC-MS udstyr

- Installer en Rtx-20 kapillarkolonne (30 m × 0,25 mm i.d., filmtykkelse DF = 0,25 µm) i GC-MS instrumentet.
- Tilslut GC-MS instrumentet som beskrevet i instruktionerne for DIAS (GC-MS No. 1) og varm kolonnen op til en høj temperatur (300 °C) og hold den temperatur i ca. 3 timer.
- **Flow** (bæregas, helium): 1,0 ml/min (10 psi);  
**Injektionsvolumen:** 1 µl;  
**Split vent:** 50 ml/min;  
**Septum purge:** 3,5 ml/min;  
**Injektionstemperatur:** 250 °C; Analysetid: 86 min;  
**Temperaturprogram** (se nedenfor).
- Tydelig navn på prøven indskrives i prøveskemaet i Saturn GC-MS arbejdsstation sammen med metoden "**Allergens 1**" der benyttes ved analysen. Temperaturprogram og andre betingelser er givet i metoden "**Allergens 1**".
- Efter at kolonnen er blevet kalibreret og GC-MS'en programmeret, injiceres en blindprøve (100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) før man starter på analysen af de egentlige prøver. Blindprøven analyseres efter det programmerede temperaturprogram. Følgende temperaturprogram er benyttet til GC-MS analysen på en Rtx-20 kapillarkolonne (DIAS No. 23):

Temperaturprogram:

Starttemperatur: 35 °C. "Initial time": 2,50 min		
hastighed (°C/min)	temperatur (°C)	"holding time" (min)
2,00	120	1,00
8,00	280	20,00

#### 5.4 Klargøring af GC udstyr

- Installer en WCOT kapillarkolonne (50 m × 0,25 mm i.d., filmtykkelse DF = 0,2 µm: CP-Wax 52 CB) i GC instrumentet.
- Forsyn autosampleren med CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> til rengøring af injektionssprøjten.
- Tilslut GC instrumentet som beskrevet i instruktionerne for DIAS (GC No. 3) og varm kolonnen op til en høj temperatur (250 °C) og hold den temperatur i ca. 3 timer.
- **Flow** (bæregas, helium): 1,30 ml/min (21 psi);  
**Injektionsvolumen:** 2 µl;  
**Split vent:** 54,1 ml/min;  
**Septum purge:** 3,4 ml/min;  
**Injektionstemperatur:** 200 °C.;  
**Detektortemperatur:** 230 °C;  
**Analysetid:** 117 min;  
**Temperaturpro-gram** (se nedenfor); Prøverne (glasnumre) der skal analyseres programmeres i HP ChemStation.
- Glasnummer for den enkelte prøve og et tydelig navn for prøven indskrives i prøveskemaet i HP ChemStation sammen med metoden "**Allergens 2**" der benyttes ved analysen. Temperaturprogram og andre betingelser er givet i metoden "**Allergens 2**".
- Efter at kolonnen er blevet kalibreret og GC instrumentet programmeret, injiceres en blindprøve (100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) før man starter på analysen af de egentlige prøver. Blindprøven analyseres efter det programmerede temperaturprogram. Følgende temperaturprogram er benyttet til GC analysen på en CP-Wax 52 CB kapillarkolonne (DIAS No. 26).

Temperaturprogram:

Starttemperatur: 32 °C; "Initial time": 0,00 min		
hastighed (°C/min)	temperatur (°C)	"holding time" (min)
1,50	80	0,00
2,00	220	15,00

#### 5.5 Klargøring af prøver til GC og GC-MS analyse

##### 5.5.1 Klargøring af eksterne standardopløsninger

Lav minimum 10 ml af en opløsning af  $\beta$ -pinen (**2**), linalylacetat (**10**), eugenol (**16**) og parthenolid (**18**) med en koncentration på 1,0 µl/ml i dobbelt destilleret CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Disse standardopløsninger opbevares i en fryser (-24 °C) indtil de skal bruges, og vil fra nu af blive omtalt som henholdsvis ekstern standardopløsning 1, 2, 3 og 4 (ESD-opløsning 1 osv). Fra disse ESD-opløsninger, laves standardkurver, der benyttes i kvantificeringen af forbindelserne **1-18** i de undersøgte prøver. De udvalgte forbindelser repræsenterer de forskellige typer af forbindelser:  $\beta$ -pinen: ikke-oxiderede monoterpener **1-7**; linalylacetat: oxiderede monoterpener **8-13**; eugenol: fenolske forbindelser **14-17**.

Desuden benyttes ESD-opløsningerne til at bestemme detektions- og kvantificeringsgrænser (se afsnit 7.2), linearitet (se afsnit 7.3), nøjagtighed (se afsnit 7.4) og præcision (repetérbarhed) (se afsnit 7.5) for metoden DIAS ALLERGENS 1, dato 21.12 2001.

### 5.5.2 Klargøring af standardopløsning indeholdende potentielle kontaktallergener

En standardopløsning indeholdende forbindelserne **1–18** laves til brug for kontrol af kolonnen og andre faktorer der kan have indflydelse på selve analysen. Overfør 10 µl af standardopløsninger af **1–18** med en koncentration på 1,0 µl/ml i dobbelt destilleret CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> til et 1,5 ml GC prøveglas.

### 5.5.3 Klargøring af naturkosmetikprodukt prøver indeholdende planteekstrakter og/eller æteriske olier

**Cremer:** Ca. 500 mg af en creme afvejes præcist i en 5 ml målekolbe og 4 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> tilsættes. Målekolben forsegles med en glasprop og opløsningen omrystes grundigt i ca. 5 min og placeres i mørke ved 5 °C. Efter 16 timer filtreres opløsningen og koncentrerer under en svag strøm af nitrogen til 300 µl, som derefter overføres til et GC prøveglas, der er markeret tydeligt med prøvens nummer og navn.

**Olier:** 10 µl af en olie overføres til et 1,5 ml GC prøveglas og der tilsættes 1,0 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Glasset forsegles med en glasprop og opløsningen omrystes grundigt i ca. 1 min og 200 µl af denne opløsning overføres til et GC prøveglas (300 µl), der er markeret tydeligt med prøvens nummer og navn.

## 5.5 Identifikation af potentielle kontaktallergener og/eller irritative forbindelser i naturkosmetikprodukter

Nogle af forbindelserne **1–18** (Figur 1) blev identificeret i **A3, B1, B2, B3, B4** og **C1** ved at sammenligne deres massespektre og GC retentionstider med dem fra autentiske standarder (Tabel 5). I de resterende undersøgte naturkosmetikprodukter **A1, A2, A4** og **C2** blev ingen af forbindelserne **1–18** detekteret ej heller nærtbeslægtet forbindelser (se Tabel 5).

## 6 Godkendelse af analysen

Analysen kan generelt godkendes hvis den er gennemført som beskrevet i denne instruktion og hvis der ikke er forekommet nogle uregelmæssigheder/ fejlmeddelelser under analysen.

### 6.1 Godkendelse af den analyserede prøve

Analysen af den analyserede prøve kan godkendes hvis:

- Forbindelserne **1–18** (Figur 1) er separeret og kan kvantificeres.
- Profilen af GC og GC–MS kromatogrammerne er ikke signifikant forskellige fra dem vist i henholdsvis Figur 2 og 3.
- Potentielle allergener og/eller irriterende forbindelser i en prøve er separeret fra andre forbindelser og kan kvantificeres. Dette kan variere da de analyserede prøver indeholder forskellige typer af forbindelser og det kan derfor i enkelte tilfælde være nødvendigt at optimere det originale temperaturprogram.

Retentionstid (min)

**Figur 2.** GC kromatogram af en standardopløsning indeholdende forbindelserne **1–18**. Forbindelserne er separeret på en CP–Wax 52 CB kapillarkolonne. Parthenolid (**18**) elueres ikke ud på denne type kolonne.



Retentionstid (min)

**Figur 3.** GC–MS kromatogram af en standardopløsning indeholdende forbindelserne **1–18**. Forbindelserne separeret på en Rtx-20 kapillarkolonne.

## 6.2 Godkendelse, registrering og indskrivning af resultaterne

Rapporten indeholdende resultaterne fra GC og GC–MS analysen, inklusiv kromatogrammer, gives videre til den ansvarshavende VIP, der godkender/afviser analysen af den pågældende prøve. VIP'en fastslå resultatet i den relevante journal og gemmer de relevante dokumenter og rapporten indeholdende resultaterne. TAP'en der har udført analysen bekræfter resultatet af analysen i laboratoriejournalen.

# 7 Validiteten af GC og GC-MS metoden

GC and GC-MS metoden DIAS ALLERGENS 1, dato 21.12 2001 er blevet valideret med hensyn til følgende parametre: **1.** robusthed (kolonne, flow og temperatur), **2.** detektions- og kvantificeringsgrænser, **3.** linearitet, **4.** nøjagtighed og **5.** præcision (reperbarhed).

## 7.1 Robusthed

### 7.1.1 Kolonne

Separation af forbindelserne i Figur 1 kunne opnås på meget forskellige typer kapillarkolonner: ikke-polær Rtx-20 kolonne og polær CP-Wax 52 CB kolonne. Se **GC kromatogram 11** (~ Figur 2) og **GC-MS kromatogram 12** (~ Figur 3). Retentionstiderne for de enkelte forbindelser er dog forskellige på de to typer kolonner pga. kolonnernes forskellige polaritet. Sesquiterpenlaktoner, som f.eks. parthenolid, elueres kun ud på den ikke-polære Rtx-20 kapillarkolonne.

### 7.1.2 Flow

Et henholdsvis lavere flow (1,20 ml/min)) og højere flow (1,40 ml/min), sammenlignet med det normale flow på 1,30 ml/min, førte ikke til nogen signifikante ændringer i separationen af forbindelserne **1-18** (Figur 1). Disse undersøgelser blev udført på en WCOT kapillarkolonne (CP-Wax 52 CB).

### 7.1.3 Temperatur

Små ændringer i temperaturprogrammet førte ikke til signifikante ændringer i separationen af forbindelserne **1-18** (Figur 1).

Flow = 1,30 ml/min. Kolonne: CP-Wax 52 CB.

Temperaturprogram.

Starttemperatur: 32 °C; "Initial time": 0,00 min

hastighed (°C/min)	temperatur (°C)	"holding time" (min)
2,00	80	0,00
2,00	220	15,00

Flow = 1,0 ml/min. Kolonne: Rtx-20.

Temperaturprogram.

Starttemperatur: 35 °C; "Initial time": 2,50 min

hastighed (°C/min)	temperatur (°C)	"holding time" (min)
1,50	120	1,00
8,50	280	20,00

## 7.2 Detektions- og kvantificeringsgrænser

Detektions- og kvantificeringsgrænser blev bestemt ved visuel evaluering. For at bestemme detektions- og kvantificeringsgrænserne for forbindelserne **1–18** (Figur 1), blev ESD-opløsningerne fortyndet helt op til en faktor 6000. Baseret på disse undersøgelser blev følgende detektions- og kvantificeringsgrænser bestemt (se Tabel 1).

**Tabel 1.** Detektions- og kvantificeringsgrænser for forbindelserne **1–18**.

Forbindelser	Detektionsgrænser ( $\mu\text{g/ml}$ )	Kvantificeringsgrænser ( $\mu\text{g/ml}$ )
<b>1–7</b>	~ 0,00010	~ 0,0002
<b>8–13</b>	~ 0,00010	~ 0,0002
<b>14–17</b>	~ 0,00010	~ 0,0002
<b>18</b>	~ 0,00100	~ 0,0050

## 7.3 Linearitet

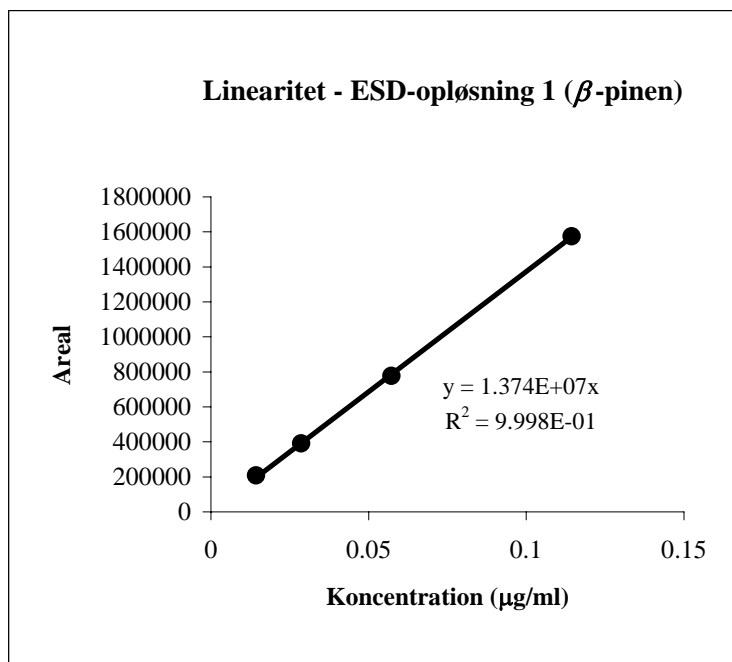
Prøverne til bestemmelse af linearitet blev lavet ud fra de enkelte ESD-opløsninger ved at fortynde en bestemt volumen af ESD-opløsningerne med  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (laveste fortynding ~ fortyndingsfaktor 0, se Tabel 2 og 3). Linearitet blev fundet for alle ESD-opløsninger. For overskuelighedens skyld er lineariteten kun vist for henholdsvis ESD-1 ( $\beta$ -pinen) og ESD-3 (eugenol) (Figur 4 og Figur 5).

**Tabel 2.** Eksperimentelle parametre til bestemmelse af lineariteten for  $\beta$ -pinen (ESD-opløsning 1).

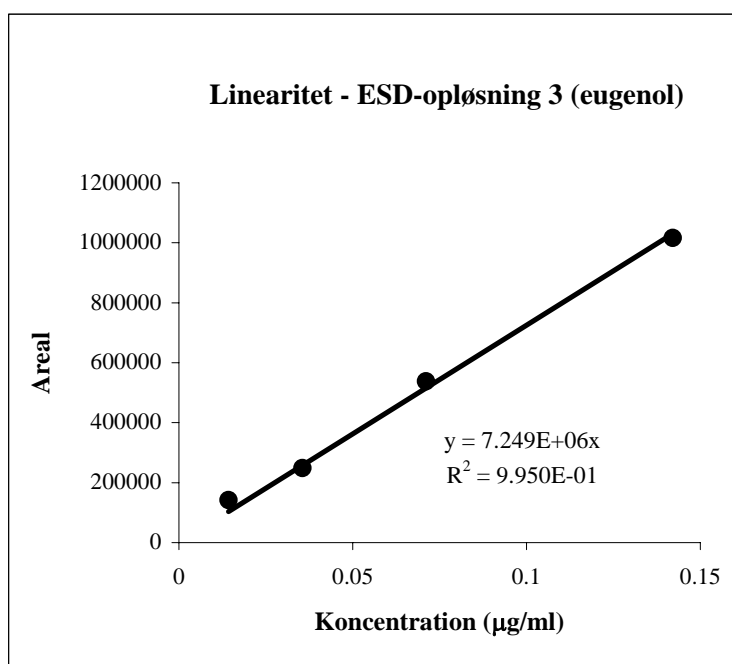
Koncentration af $\beta$ -pinen ( $\mu\text{g/ml}$ )	Fortyndingsfaktor
0,1144	0
0,0572	2
0,0286	4
0,0143	8

**Tabel 3.** Eksperimentelle parametre til bestemmelse af lineariteten for eugenol (ESD-opløsning 3).

Koncentration af eugenol ( $\mu\text{g/ml}$ )	Fortyndingsfaktor
0,1421	0
0,0711	2
0,0355	4
0,0178	8



**Figur 4.** Bestemmelse af linearitet for  $\beta$ -pinen (ESD-opløsning 1).



**Figur 5.** Bestemmelse af linearitet for eugenol (ESD-opløsning 3).

## 7.4 Nøjagtighed

Prøver til bestemmelse af nøjagtighed blev lavet ud fra en fortyndet ESD-opløsning 2 ved at tilsætte en kendt mængde af linalylacetat til den fortyndede ESD-opløsning 2 (se Tabel 4).

**Tabel 4.** Eksperimentelle parametre til bestemmelse af nøjagtighed ved at til-sætte en kendt mængde linalylacetat (LA) til en fortyndet ESD-opløsning 2.

Tilsat mængde af LA ( $\mu\text{g}$ )	Mængde LA ( $\mu\text{g}$ ) i prøven	Bestemmelse af LA ( $\mu\text{g}$ ) i prøven	Genfinding i procent
0,000	0,015	0,013	86,7
0,015	0,030	0,027	90,0
0,105	0,120	0,116	96,7

## 7.5 Præcision (reperterbarhed)

Reperterbarheden blev bestemt ved to koncentrationsniveauer (med hver 4 replikationer) for B4. De to koncentrationsniveauer er angivet ved den totale mængde potentielle allergener, som er:

**koncentrationsniveau 1** = 0,144  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ;

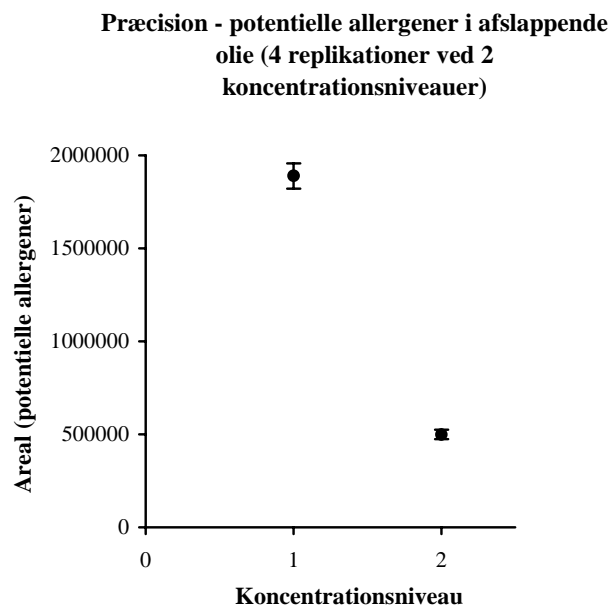
**koncentrationsniveau 2** = 0,036  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

Prøverne ved de to koncentrationsniveauer blev lavet ved at fortynde stamopløsningen (se afsnit 5.4.3) på 144,0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  med  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  med henholdsvis en faktor 1000 og 4000.

**Figur 6.** Bestemmelse af reperterbarheden af metoden ved to koncentrationsniveauer af B4. Middelværdien af 4 replikationer  $\pm$  standardafv.

**Koncentrationsniveau 1:** RSD = 3,5%.

**Koncentrationsniveau 2:** RSD = 5,0%.



## 8 Koncentration af kontaktallergener i naturkosmetikprodukter

Koncentrationen af forbindelserne **1–18** blev bestemt i forskellige naturkosmetikprodukter indeholdende planteekstrakter og/eller æteriske olier ved at benytte standardkurver for ESD-opløsningerne 1–4. Koncentrationerne angivet i Tabel 5 er middelværdien af to bestemmelser med en variation på mindre end 3% .



## 9 Referencer

- Christensen, L. P., Jakobsen, H. B., Paulsen, E., Hodal, L. and Andersen, K. E. (1999). Airborne Compositae dermatitis: monoterpenes and no parthenolide are released from flowering *Tanacetum parthenium* (feverfew) plants. *Archives of Dermatological Research* **291**: 425–431.
- Evans, F. J. and Schmidt, R. J. (1980). Plants and plant products that induce contact dermatitis. *Planta Medica* **38**: 289–316.
- Hausen, B. M. (1988). *Allergiepflanzen – Pflanzenallergene: Handbuch und Atlas der allergie-induzierenden Wild- und Kulturpflanzen. Kontaktallergene*. Ecomed Verlags-gesellschaft mbH, Landsberg.
- Hausen, B. M. (1991). A simple method of isolating parthenolide from *Tanacetum* and other sensitizing plants. *Contact Dermatitis* **24**, 153–154.
- Hausen, B. M., Reichling, J. and Harkenthal, M. (1999). Degradation products of monoterpenes are the sensitizing agents in tea tree oil. *American Journal of Contact Dermatitis* **10**, 68–77.
- Lovell, C. R. (1993). *Plants and the Skin*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Mitchell, J. and Rook, A. (1979). *Botanical Dermatology. Plants and Plant Products Injurious to the Skin*. Greengrass, Vancouver, BC.
- Nater, J. P. and de Groot, A. C. (1985). *Unwanted Effects of Cosmetics and Drugs Used in Dermatology*. Elsevier, Amsterdam.