

II

(Retsakter hvis offentliggørelse ikke er obligatorisk)

KOMMISSION

KOMMISSIONENS ANDET DIREKTIV

af 14. maj 1982

om indbyrdes tilnærmelse af medlemsstaternes lovgivning om analysemetoderne for kontrol af kosmetiske midlers sammensætning

(82/434/EØF)

KOMMISSIONEN FOR DE EUROPÆISKE
FÆLLESSKABER HAR —

under henvisning til traktaten om oprettelse af Det europæiske økonomiske Fællesskab,

under henvisning til Rådets direktiv 76/768/EØF af 27. juli 1976 om indbyrdes tilnærmelse af medlemsstaternes lovgivning om kosmetiske midler ⁽¹⁾, ændret ved direktiv 79/661/EØF ⁽²⁾, særlig artikel 8, stk. 1, og

ud fra følgende betragtninger:

i direktiv 76/768/EØF foreskrives officiel kontrol af kosmetiske midler til konstatering af, om de i fællesskabsbestemmelserne fastsatte betingelser vedrørende sammensætningen af kosmetiske midler overholdes;

de nødvendige analysemetoder bør fastlægges hurtigst muligt, og eftersom første etape i bestræbelserne for at nå dette mål er gennemført ved fastlæggelsen af en række metoder i Kommissionens direktiv 80/1335/EØF ⁽³⁾, består anden etape i fastlæggelse af

metoder til identifikation af oxiderende stoffer og bestemmelse af hydrogenperoxid i hårplejemidler, identifikation og semikvantitativ bestemmelse af visse oxidationsfarvestoffer i hårplejemidler, identifikation og bestemmelse af nitrit, identifikation og bestemmelse af frit formaldehyd, bestemmelse af resorcinol i shampoo og hårlotion samt bestemmelse af methanol i forhold til ethanol eller propanol-2;

de i dette direktiv fastsatte foranstaltninger er i overensstemmelse med udtalelse fra Udvalget for tilpasning af direktiv 76/768/EØF til de tekniske Fremskridt —

UDSTEDT FØLGENDE DIREKTIV:

Artikel 1

I forbindelse med den officielle kontrol af kosmetiske midler træffer medlemsstaterne de fornødne foranstaltninger til at sikre, at

- identifikation af oxiderende stoffer og bestemmelse af hydrogenperoxid i hårplejemidler,
- identifikation og semikvantitativ bestemmelse af visse oxidationsfarvestoffer i hårplejemidler,
- identifikation og bestemmelse af nitrit,
- identifikation og bestemmelse af frit formaldehyd,

⁽¹⁾ EFT nr. L 262 af 27. 9. 1976, s. 169.

⁽²⁾ EFT nr. L 192 af 31. 7. 1979, s. 35.

⁽³⁾ EFT nr. L 383 af 31. 12. 1980, s. 27.

- bestemmelse af resorcinol i shampoo og hårlotion,
 - bestemmelse af methanol i forhold til ethanol eller propanol-2,
- foretages efter de metoder, der er beskrevet i bilaget.

Artikel 2

Medlemsstaterne sætter de fornødne love eller administrative bestemmelser i kraft for senest den 31. december 1983 at efterkomme dette direktiv. De underretter straks Kommissionen herom.

Artikel 3

Dette direktiv er rettet til medlemsstaterne.

Udfærdiget i Bruxelles, den 14. maj 1982.

På Kommissionens vegne

Karl-Heinz NARJES

Medlem af Kommissionen

BILAG

I. IDENTIFIKATION AF OXIDERENDE STOFFER OG BESTEMMELSE AF HYDROGENPEROXID I HÅRPLEJEMIDLER

FORMÅL OG ANVENDELSESOMRÅDE

Iodometrisk bestemmelse af hydrogenperoxid i kosmetiske produkter er mulig, når der ikke er andre oxiderende stoffer, som danner iod med iodid, til stede. Forud for den iodometriske bestemmelse af hydrogenperoxid er det derfor nødvendigt at spore og identificere eventuelle andre tilstedeværende oxiderende stoffer. En sådan identifikation består af to dele omfattende dels persulfater, bromater og hydrogenperoxid og dels bariumperoxid.

A. IDENTIFIKATION AF PERSULFATER, BROMATER SAMT HYDROGENPEROXID

1. PRINCIP

Natrium-, kalium- og ammoniumpersulfat, kalium- og natriumbromat samt hydrogenperoxid, eventuelt dannet ud fra bariumperoxid, identificeres ved hjælp af descenderende papirchromatografi, hvorunder der anvendes to udviklingsvæsker.

2. REAGENSER

Der anvendes analysekvalitet.

2.1. Referenceopløsninger, 0,5 % m/v, vandige, af følgende forbindelser:

2.1.1. Natriumpersulfat

2.1.2. Kaliumpersulfat

2.1.3. Ammoniumpersulfat

2.1.4. Kaliumbromat

2.1.5. Natriumbromat

2.1.6. Hydrogenperoxid

2.2. Udviklingsvæske A: ethanol, 80 % v/v

2.3. Udviklingsvæske B: benzen — methanol — 3-methylbutanol-1 — vand (34+38+18+10, volumen)

2.4. Fremkaldervæske A: kaliumiodidopløsning, 10 % m/v, vandig

2.5. Fremkaldervæske B: stivelsesopløsning, 1 % m/v, vandig

2.6. Fremkaldervæske C: saltsyre 10 % m/m

2.7. 4N saltsyre

3. APPARATUR

3.1. Papir til chromatografi (Whatman papir nr. 3 og 4 eller tilsvarende)

3.2. Mikropipette, 1 µl

3.3. Målekolber, 100 ml

3.4. Foldefiltre

3.5. Sædvanligt apparatur til descenderende papirchromatografi

4. PRØVEFORBEREDELSE

4.1. Vandopløselige produkter

Der fremstilles to opløsninger af hver prøve ved at opløse henholdsvis 1 og 5 g af prøven i 100 ml vand. Der bruges af hver af disse opløsninger 1 µl til at udføre den under 5 beskrevne papirchromatografering.

4.2. Produkter, som ikke kan opløses fuldstændigt i vand

4.2.1. Der afvejes henholdsvis 1 og 5 g af prøven, som dispergeres i 50 ml vand. Til begge dispersioner tilsættes vand indtil 100 ml, og der blandes. Begge dispersioner filtreres gennem et foldefilter (3.4), og af hver af filtraterne anvendes 1 µl til at udføre den under 5 beskrevne papirchromatografering.

4.2.2. Der fremstilles igen to dispersioner af prøven ved at tilsætte henholdsvis 1 og 5 g til 50 ml vand. Disse gøres sure ved hjælp af fortyndet saltsyre (2.7), hvorefter der tilsættes vand til 100 ml og blandes. Dispersionerne filtreres gennem et foldefilter (3.4), og der anvendes 1 µl af begge filtraterne til at udføre den under 5 beskrevne papirchromatografering.

4.3. Cremer

Henholdsvis 5 og 20 g af hver prøve dispergeres i 100 ml vand. Disse dispersioner anvendes til at udføre den under 5 beskrevne papirchromatografering.

5. FREMGANGSMÅDE

5.1. I to kar til descenderende papirchromatografi (3.5) hældes en passende mængde udviklingsvæske A (2.2) henholdsvis B (2.3). Chromatografikarrene mættes med væskernes dampe i mindst 24 timer.

5.2. På en strimmel papir til chromatografi (Whatman nr. 3 eller tilsvarende) (3.1), 40 cm langt og 20 cm bredt eller et andet passende format, anbringes i startpunkterne 1 µl af de under 4 og 2.1 tilberedte prøve- og referenceopløsninger. Opløsningsmidlet afdampes i luften.

5.3. Chromatografipapiret (5.2) anbringes i det chromatografikar, som indeholder væske A (5.1), og der chromatograferes indtil en udviklingslængde på 35 cm (ca. 15 timer).

5.4. Procedurene under 5.2 og 5.3 gentages med chromatografipapir (Whatman nr. 4 eller tilsvarende) (3.1) i det kar, der indeholder væske B. Der chromatograferes, indtil udviklingslængden andrager 35 cm (ca. 5 timer).

5.5. Efter udviklingen tages papirstrimlerne op af chromatografikarrene og tørres i luften.

5.6. Pletterne på chromatogrammet fremkaldes ved at sprøjte papirstrimlerne successivt med:

5.6.1. Fremkaldervæske A (2.4) og kort tid herefter fremkaldervæske B (2.5). Først kommer pletterne af persulfater til syne i chromatogrammet og derefter pletterne af hydrogenperoxid. Pletterne markeres med blyant.

5.6.2. Fremkaldervæske C (2.6) på de i 5.6.1 opnåede chromatogrammer. Tilstedeværende bromat bliver synligt i chromatogrammet som gråblå pletter.

5.7. Rf-værdierne for referencestofferne (2.1) vil under de ovenfor beskrevne omstændigheder i henholdsvis udviklingsvæske A (2.2) og B (2.3) være:

	Udviklingsvæske A (2.2)	Udviklingsvæske B (2.3)
Natriumpersulfat	0,40	0,10
Kaliumpersulfat	0,40	0,02 + 0,05
Ammoniumpersulfat	0,50	0,10 + 0,20
Natriumbromat	0,40	0,20
Kaliumbromat	0,40	0,10 + 0,20
Hydrogenperoxid	0,80	0,80

B. IDENTIFIKATION AF BARIUMPEROXID

1. PRINCIP

Bariumperoxid påvises dels ved dannelse af hydrogenperoxid efter syring af prøven (A.4.2) og dels ved tilstedeværelse af bariumion:

- såfremt der ikke er persulfater til stede (a) ved at tilsætte fortyndet svovlsyre til en del af den sure prøveopløsning (B.4.1), hvorved der dannes et hvidt bundfald af bariumsulfat og bekræfte tilstedeværelsen af bariumioner i prøveopløsningen (4.1) ved papirchromatografi (5);
- såfremt der samtidig er bariumperoxid og persulfater (B.4.2) ved med alkali at spalte remanensen fra opløsningen (4.2.1) og ved i remanensen fra den smeltede masse (4.2.2 og 4.2.3) — efter opløsning i saltsyre (4.2.4) — at påvise tilstedeværelsen af bariumioner både ved papirchromatografi og ved fældning som bariumsulfat.

2. REAGENSER

- 2.1. Methanol
- 2.2. Koncentreret saltsyre, 36 % m/v
- 2.3. 6N saltsyre
- 2.4. 4N svovlsyre
- 2.5. Dinatriumrhodizonat
- 2.6. Bariumchlorid dihydrat ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- 2.7. Natriumcarbonat, vandfrit
- 2.8. Bariumchloridopløsning, 1 % m/v, vandig
- 2.9. Udviklingsvæske: methanol — koncentreret saltsyre — vand (80+10+10, volumen)
- 2.10. Fremkaldervæske: dinatriumrhodizonatopløsning, 0,1 % m/v, vandig; fremstilles umiddelbart før brug.

3. APPARATUR

- 3.1. Mikropipette, 5 μl
- 3.2. Platinskåle
- 3.3. Målekolber, 100 ml
- 3.4. Chromatografipapir (Schleicher og Schüll 2043 b eller tilsvarende). Papiret renses ved gennemløb af udviklingsvæske (2.9) natten over i et chromatografikar for descenderende chromatografi (A.3.5) med efterfølgende tørring.
- 3.5. Foldefiltre
- 3.6. Sædvanligt apparatur til ascenderende papirchromatografi.

4. PRØVEFORBEREDELSE

- 4.1. Produkter uden persulfater
- 4.1.1. 2 g af prøven bringes i dispersion (opløsning) i 50 ml vand, og pH indstilles til at være omkring 1 ved hjælp af 6N saltsyre (2.3).

- 4.1.2. Dispersionen (opløsningen) overføres med vand til en 100 ml målekolbe. Der fyldes op med vand og blandes. Denne dispersion (opløsning) anvendes til den under 5 beskrevne papirchromatografiske undersøgelse og fældning af bariumsulfat.
- 4.2. **Produkter med persulfater**
- 4.2.1. 2 g af prøven bringes i dispersion (opløsning) i 100 ml vand, og der filtreres.
- 4.2.2. Den tørrede remanens tilsættes 7 til 10 gange dennes vægt af natriumcarbonat (2.7), og der blandes. Blandingen smeltes i en platinskål (3.2) i 30 minutter.
- 4.2.3. Der afkøles til stuetemperatur, og smeltemassen bringes i suspension i 50 ml vand, hvorefter der filtreres (3.5).
- 4.2.4. Remanensen opløses i 6N saltsyre (2.3), og der tilsættes vand til 100 ml. Denne opløsning anvendes til den under 5 beskrevne papirchromatografiske undersøgelse og fældning af bariumsulfat.

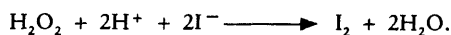
5. FREMGANGSMÅDE

- 5.1. I et kar til ascenderende papirchromatografi hældes en passende mængde udviklingsvæske (2.9), og karret mættes med væskens dampe i mindst 15 timer.
- 5.2. På et stykke chromatografipapir, behandlet som beskrevet under 3.4, anbringes i startpunkterne 5 µl af hver af de under 4.1.2 eller 4.2.4 tilberedte opløsninger samt 5 µl referenceopløsning (2.8).
- 5.3. Opløsningsmidlet afdampes i luften, og der chromatograferes lodret indtil udviklingslængden er 30 cm.
- 5.4. Chromatografipapiret tages op og tørres i luften.
- 5.5. Pletterne på chromatogrammet fremkaldes ved at sprøjte chromatografipapiret med fremkaldervæske (2.10). Pletterne markeres med blyant.
- 5.6. Ved tilstedeværelse af barium opstår der røde pletter i chromatogrammet med en Rf-værdi på ca. 0,10.

C. BESTEMMELSE AF HYDROGENPEROXID

1. PRINCIP

Den iodometriske bestemmelse af hydrogenperoxid beror på følgende reaktion:



Denne reaktion har et langsomt forløb, men kan fremskyndes ved tilsætning af ammoniummolybdat. Det dannede iod, der bestemmes titrimetrisk ved hjælp af natriumthiosulfat, er mål for hydrogenperoxidindholdet.

2. DEFINITION

Hydrogenperoxidindholdet bestemt efter denne metode udtrykkes som masseprocent (% m/m) hydrogenperoxid i prøven.

3. REAGENSER

Der anvendes analysekvalitet.

- 3.1. 2N svovlsyre
- 3.2. Kaliumiodid
- 3.3. Ammoniummolybdat
- 3.4. 0,1N natriumthiosulfat

- 3.5. Kaliumiodidopløsning, 10 % m/v. Fremstillet umiddelbart før brug.
- 3.6. Ammoniummolybdatopløsning, 20 % m/v
- 3.7. Stivelsesopløsning, 1 % m/v

4. APPARATUR

- 4.1. Bægerglas, 100 ml
- 4.2. Burette, 50 ml
- 4.3. Målekolber, 250 ml
- 4.4. Målecylinder, 25 og 100 ml
- 4.5. Pipetter, 10 ml
- 4.6. Erlenmeyerkolber, 250 ml

5. FREMGANGSMÅDE

- 5.1. Der afvejes af prøven en mængde i g (m) svarende til ca. 0,6 g hydrogenperoxid i et 100 ml bægerglas. Den afvejede mængde overføres kvantitativt med vand til en målekolbe på 250 ml, og der fyldes op med vand og blandes.
- 5.2. 10,00 ml af prøveopløsningen (5.1) afpipetteres til en erlenmeyerkolbe på 250 ml (4.6), og der tilsættes successivt 100 ml 2N svovlsyre (3.1), 20 ml kaliumiodidopløsning (3.5) samt 3 dråber ammoniummolybdatopløsning (3.6).
- 5.3. Den dannede iod titreres straks med 0,1N natriumthiosulfat (3.4); lige inden ækvivalenspunktet nås, tilsættes nogle ml stivelsesopløsning som indikator. Det forbrugte antal ml 0,1N natriumthiosulfat (V) noteres.
- 5.4. En blindbestemmelse udføres som beskrevet under 5.2 og 5.3, idet de 10 ml prøveopløsning erstattes med 10 ml vand. Det forbrugte antal ml 0,1N natriumthiosulfat til blindbestemmelsen (V_0) noteres.

6. BEREGNING

Hydrogenperoxidindholdet i prøven beregnet i masseprocent (% m/m) ved hjælp af formlen:

$$\begin{aligned} \% \text{ hydrogenperoxid} &= \frac{(V - V_0) \times 1,7008 \times 250 \times 100}{m \times 10 \times 1\,000} \text{ eller} \\ &= \frac{(V - V_0) \times 4,252}{m} \end{aligned}$$

hvor:

m = prøvemængden i g (5.1),

V = forbrugte antal ml 0,1N natriumthiosulfat ved titrering af prøveopløsningen (5.3),

V_0 = forbrugte antal ml 0,1N natriumthiosulfat ved blindbestemmelsen (5.4).

7. GENTAGELIGHED ⁽¹⁾

Ved et hydrogenperoxidindhold på omkring 6 % må forskellen mellem resultaterne på to parallelt udførte bestemmelser på den samme prøve ikke overstige en absolut værdi på 0,2 %.

⁽¹⁾ Jf. ISO-norm 5725.

II. IDENTIFIKATION OG SEMIKVANTITATIV BESTEMMELSE AF VISSE OXIDATIONS-FARVESTOFFER I HÅRFARVNINGSMIDLER

1. FORMÅL OG ANVENDELSESOMRÅDE

Denne metode beskriver identifikation og semikvantitativ bestemmelse af følgende stoffer i hårfarvningsmidler på creme- og væskeform:

Stoffets betegnelse	Symbol
1,2-diaminobenzen (<i>o</i> -phenylendiamin)	OPD
1,3-diaminobenzen (<i>m</i> -phenylendiamin)	MPD
1,4-diaminobenzen (<i>p</i> -phenylendiamin)	PPD
3,4-diaminotoluen (<i>o</i> -toluylendiamin)	OTD
2,4-diaminotoluen (<i>m</i> -toluylendiamin)	MTD
2,5-diaminotoluen (<i>p</i> -toluylendiamin)	PTD
2,4-diaminophenol	DAP
1,3-dihydroxybenzen (resorcinol)	R
1,4-dihydroxybenzen	H
1-naphthol α -naftol	α -N
1,2,3-trihydroxybenzen (pyrogallol)	P

2. PRINCIP

Oxidationsfarvestofferne ekstraheres ved pH 10 med 96 % ethanol fra hårfarvningsmidler på creme- og væskeform og identificeres ved endimensionalt eller todimensionalt tyndt-lagschromatografi (6).

Den semikvantitative bestemmelse af stofferne foretages ved sammenligning af chromatogrammer af prøven og af referenceopløsninger, idet chromatograferingen af opløsningerne udføres samtidigt og i fire udviklingssystemer.

3. REAGENSER

Der anvendes analysekvalitet, når det er praktisk muligt.

- 3.1. Absolut ethanol
- 3.2. Acetone
- 3.3. Ethanol, 96 % v/v
- 3.4. Ammoniak, 25 % m/m ($d_4^{20} = 0,91$)

- 3.5. L-Ascorbinsyre
- 3.6. Chloroform
- 3.7. Cyklohexan
- 3.8. Nitrogen
- 3.9. Toluen
- 3.10. Benzen
- 3.11. Butanol-1
- 3.12. Butanol-2
- 3.13. Hypophosphorsyrling, 50 %
- 3.14. Diazoreagens; der kan anvendes .4-nitro-1-benzendiazoniumsolt, stabiliseret med f.eks. chlorbensensulfonat-ion (Rød 2 JN Francolor), eller 2-chlor-4-nitro-1-benzendiazoniumsolt, stabiliseret med f.eks. naphthalenbenzoat-ion (NNCD-reagens, ref. nr. 74150, Fluka), eller tilsvarende.
- 3.15. Sølvnitrat
- 3.16. *p*-Dimethylaminobenzaldehyd
- 3.17. 2,5-Dimethylphenol
- 3.18. Ferrichlorid hexahydrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
- 3.19. Saltsyre 10 % m/v
- 3.20. **Referencestoffer**
Referencestofferne er de under 1 (formål og anvendelsesområde) anførte stoffer.
Ved aminoforbindinger vil referencestoffet findes som mono- eller di-hydrogenchloridet eller som basen. Brug af sulfater bør undgås.
- 3.21. **Referenceopløsninger (0,5 % m/v)**
Der fremstilles en 0,5 % m/v opløsning af hvert referencestof (3.20):
50 mg \pm 1 mg referencestof afvejes i en 10 ml målekolbe.
Der tilsættes 5 ml ethanol (3.3).
Der tilsættes 250 mg ascorbinsyre (3.5).
Indholdet i målekolben gøres basisk ved tilsætning af ammoniak (3.4) indtil pH 10.
Der fyldes op med ethanol (3.3) til 10 ml, og der blandes. Opløsningerne kan opbevares i en uge på et køligt sted beskyttet mod lys.
I visse tilfælde kan der fremkomme et bundfald under tilsætningen af ascorbinsyre og ammoniak. Det er da hensigtsmæssigt at fradekantere bundfaldet, før der fortsættes.
- 3.22. **Udviklingsvæsker**
- 3.22.1. Acetone-chloroform-toluen (35-25-40, volumen).
- 3.22.2. Chloroform-cyklohexan-absolut ethanol-ammoniak 25 % (80-10-10-1, volumen).
- 3.22.3. Benzen-butanol-2-vand (50-25-25, volumen). Der blandes omhyggeligt, og efter adskillelse opsamles den øverste fase ved dekantering ved stuetemperatur (20 til 25 °C).
- 3.22.4. Butanol-1-chloroform-reagens M (7-70-23, volumen). Der dekanteres omhyggeligt ved 20 til 25 °C, og den nederste fase anvendes.

Fremstilling af reagens M:

Ammoniak, 25 % (3.4)	24
Hypophosphorsyrling, 50 % (3.13)	1
Vand	75

Bemærk: Udviklingsvæsker, der indeholder ammoniak, skal omrystes grundigt lige før brugen.

3.23. Fremkaldervæsker

3.23.1. *Diazoreagens*

Der fremstilles en vandig opløsning på 5 % m/v af det valgte stof (3.14). Denne opløsning skal fremstilles umiddelbart før anvendelsen.

3.23.2. *Ehrlichs reagens*

Der opløses 2 g p-dimethylaminobenzaldehyd (3.16) i 100 ml saltsyre (3.19).

3.23.3. *Dimethylphenol/ferrichloridreagens*

Opløsning 1: 1 g 2,5-dimethylphenol (3.17) opløses i 100 ml ethanol (3.3).

Opløsning 2: 1 g ferrichlorid hexahydrat (3.18) opløses i 100 ml ethanol (3.3).

Disse opløsninger anvendes uden sammenblanding. De påsprøjtes hver for sig, først opløsning 1 og derefter opløsning 2.

3.23.4. *Ammoniakalsk sølvnitrat*

Til en vandig opløsning på 5 % m/v sølvnitrat sættes ammoniak (3.4), indtil det fremkomne bundfald netop er opløst.

Dette reagens skal fremstilles umiddelbart før anvendelsen og må ikke opbevares.

4. APPARATUR

4.1. Sædvanligt udstyr til tyndtlagschromatografi.

4.1.1. Plast — eller glasboks af en sådan udformning, at chromatografipladen heri kan være omgivet af nitrogen under påsætnings- og tørringsproceduren.

4.1.2. Sprøjte, 10 µl med 0,2 µls inddeling, kanyle med lige afskæring eller — hellere — sprøjte med »repeating dispenser«, 50 µl, monteret på stativ på en sådan måde, at chromatografipladen kan holdes under nitrogen.

4.1.3. Færdigfremstillede kiselgelplader til tyndtlagschromatografi; størrelse 20 × 20 cm, lagtykkelse 0,25 mm (Macherey & Nagel Silica G-HR eller tilsvarende).

4.2. Centrifuge 4 000 omd./min.

4.3. Centrifugeglas, 10 ml, med membran og skruelåg.

5. FREMGANGSMÅDE

5.1. **Behandling af prøver**

Ved udtagning fra tube kasseres de første 2 til 3 cm af cremen. I et centrifugeglas (4.3), som forinden er gennemblæst med nitrogen (3.8) kommes: 300 mg ascorbinsyre (3.5), samt 3 g creme eller 3 g homogeniseret væske.

Der tilsættes nogle dråber ammoniak (3.4), hvis pH er under 10, og der fyldes op til 10 ml med ethanol (3.3).

Der homogeniseres under nitrogen (3.8); glasset lukkes, og der centrifugeres (4.2) derefter ved 4 000 omd./min i 10 minutter. Den ovenstående væske benyttes.

5.2. Chromatografi

5.2.1. Påsætning på plade

Under nitrogen påsættes på en kiselgelplade (4.1.3) 1 l af hver af de beskrevne referenceopløsninger (3.21) på følgende måde:

1	2	3	4	5	6	7	8	9
R	P	H	PPD	DAP	PTD	OPD	OTD	MPD
MTD	α -N							

Desuden påsættes i hvert af punkterne 10 og 11 2 μ l af den under 5.1 fremkomne prøveopløsning. Pladen opbevares under nitrogen, indtil chromatograferingen påbegyndes.

5.2.2. Udvikling

Pladen indføres i et chromatografikar, der i forvejen er gennemblæst med nitrogen (3.8) og mættet med en af de nævnte udviklingsvæsker (3.22). Udviklingen skal forløbe ved stuetemperatur (20 til 25 °C) og i mørke, og indtil væskefronten er nået ca. 15 cm fra startlinien.

Pladen tages ud og tørres under nitrogen ved stuetemperatur.

5.2.3. Fremkaldelse

Pladen sprøjtes straks med en af de nævnte 4 fremkaldervæsker (3.23).

5.2.4. Identifikation

Rf-værdier og farver, der er opnået for prøverne, sammenlignes med de Rf-værdier og farver, der er opnået for referencestofferne.

Som eksempler gives i tabel I Rf-værdier og farver for hvert stof ved de forskellige udviklings- og fremkaldervæsker. Bekræftelse af en tvivlsom identifikation kan undertiden foretages ved til prøveopløsningen at sætte den pågældende referencopløsning (tilsætningsforsøg).

5.2.5. Semikvantitativ bestemmelse

Intensiteten af pletterne af de under 5.2.4 identificerede stoffer sammenlignes med en standarddrække af det pågældende referencestof, der er påsat i passende, kendte koncentrationer. Hvis koncentrationen af det i prøven indeholdte stof viser sig højere end koncentrationerne af referencestoffet i standardrækken, fortyndes prøveopløsningen, og målingen gentages.

TABEL I

Eksempler på opnåede Rf-værdier og farver fremkommet umiddelbart efter fremkaldelse

Reference- stof (3.20)	Udviklingsvæske				Fremkaldervæske			
	Rf-værdier				Farver			
	3.22.1	3.22.2	3.22.3	3.22.4	Diazoreagens (3.23.1)	Ehrlichs reagens (3.23.2)	Dimethylphenol/ ferrichloridreagens (3.23.3)	Ammoniakalsk sølvnitrat (3.23.4)
OPD	0,62	0,60	0,30	0,57	svagt brun	—	—	svagt brun
MPD	0,40	0,60	0,47	0,48	brunviolet (*)	gul	svagt brun	svagt brun
PPD	0,20	0,50	0,30	0,48	brun	stærkt rød (*)	violet	grå
OTD	0,60	0,60	0,53	0,60	brun (*)	svagt orange	svagt brun	gråbrun
MTD	0,40	0,67	0,45	0,60	rødbrun (*)	gul	brun	sort
PTD	0,33	0,65	0,37	0,70	brun	orange	violet (*)	grå
DAP	0,07	—	0	0,05	brun (*)	orange	violet	brun
R	0,50	0,37	0,80	0,17	orange	svagt violet	meget svagt brun	svagt brun
H	0,50	0,35	0,80	0,20	—	orange	violet	sort (*)
α-N	0,90	0,80	0,90	0,75	orangebrun	—	violet (*)	sort
P	0,37	—	0,67	0,05	brun	meget svagt violet	meget svagt brun	brun (*)

Bemærkninger: 1. OPD farves svagt, udviklingsvæske 3.22.3 bør anvendes for at adskille det klart fra OTD.
2. (*) angiver den bedst egnede farvereaktion.

6. UNDERSØGELSE VED TODIMENSIONALT TYNDTLAGSCHROMATOGRAFI

6.1. Supplerende referencestoffer og -opløsninger

	Stoffets betegnelse		Symbol
6.1.1.	2-naphthol	(β-naphthol)	β-N
6.1.2.	2-aminophenol	(o-aminophenol)	OAP
6.1.3.	3-aminophenol	(m-aminophenol)	MAP
6.1.4.	4-aminophenol	(p-aminophenol)	PAP
6.1.5.	1,4-diamino-2-nitrobenzen	(2-nitro-p-phenylendiamin)	2-NPPD
6.1.6.	1,2-diamino-4-nitrobenzen	(4-nitro-o-phenylendiamin)	4-NOPD

Der fremstilles en 0,5 % m/v opløsning af hvert supplerende referencestof som beskrevet under 3.21.

6.2. Supplerende udviklingsvæske

6.2.1. Ethylacetat-cyklohexan-ammoniak 25 % (65 – 35 – 0,5, volumen).

6.3. Supplerende fremkalder

I en glasskål anbragt i et tyndtlagschromatografikar indføres ca. 2 g iodkrystaller, hvorefter karret lukkes med det tilhørende låg.

6.4. Chromatografi

- 6.4.1. Som på figur 1 afmærkes to linier på tyndtlagschromatografipladen (4.1.3).
- 6.4.2. Under nitrogen påsættes 1 til 4 μ l prøveopløsning (5.1) i startpunkt 1 (figur 1), som ligger 2 cm fra begge kanter. Mængden af prøveopløsning afhænger af intensiteten af de pletter, der blev opnået på chromatogrammerne (5.2).
- 6.4.3. Ligeledes under nitrogen påsættes fordelt mellem punkterne 2 og 3 (figur 1) de referencestoffer, som blev identificeret eller formodet identificeret ifølge 5.2. Afstanden mellem punkterne skal være 1,5 cm. Der påsættes 2 μ l af hver referenceopløsning — af DAP-opløsningen dog 6 μ l.
- 6.4.4. Proceduren beskrevet under 6.4.3 gentages med startpunkterne 4 og 5 (figur 1), hvorefter pladen opbevares under nitrogen indtil chromatograferingen.
- 6.4.5. Chromatografikarret gennemblæses med nitrogen (3.8), og der indføres en passende mængde udviklingsvæske (3.22.2). Pladen (6.4.4) anbringes i karret, og den udvikles i den første retning (figur 1) i mørke. Der udvikles, indtil fronten når den afmærkede linie på pladen.
- 6.4.6. Pladen fjernes fra karret og anbringes i mindst 60 minutter i et andet i forvejen med nitrogen (3.8) gennemblæst chromatografikar for at fjerne udviklingsvæsken ved fordampning.
- 6.4.7. Med et måleglas indføres en passende mængde af udviklingsvæske 6.2.1 i et nitrogengennemblæst kar. Pladen (6.4.6) anbringes drejet 90° i karret, og der chromatograferes i den anden retning, indtil udviklingsvæskens front har nået den afmærkede linie. Pladen tages op af karret, og udviklingsvæsken fjernes ved fordampning i luften.
- 6.4.8. Pladen anbringes i 10 minutter i chromatografikarret med ioddampe (6.3), og det todimensionale chromatogram tolkes på grundlag af Rf-værdier og farver opnået ved samtidig chromatografering af referencestofferne (tabel 2).

Bemærk :

Til opnåelse af maksimal farvning af pletterne, skal chromatogrammet henstå i luften i en halv time efter fremkaldelsen.

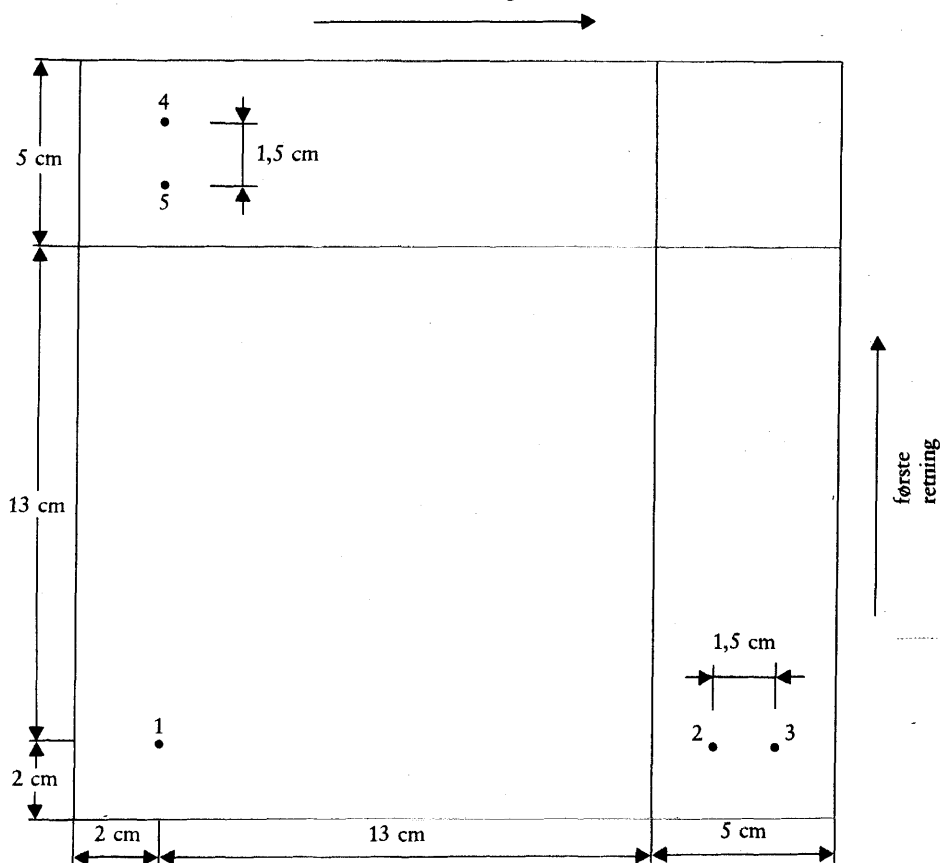
- 6.4.9. Tilstedeværelse af oxidationsfarvestoffer fundet ifølge 6.4.8 kan definitivt bekræftes ved at gentage procedurerne fra 6.4.1 til 6.4.8 idet der i startpunktet ud over den foreskrevne (6.4.2) mængde prøveopløsning påsættes 1 μ l af det under 6.4.8 identificerede referencestof. Hvis der ikke fremkommer andre pletter end dem, der fandtes på chromatogrammet opnået ifølge 6.4.8, er tolkningen af chromatogrammet 6.4.8 korrekt.

TABEL II

Referencestoffernes farve efter chromatografering og fremkaldelse i iodampe

Referencestof	Farve efter fremkaldelse i iodampe
R	beige
P	brun
α -N	violet
β -N	lysebrun
H	brunviolet
MPD	brungul
PPD	brunviolet
MTD	mørkebrun
PTD	brungul
DAP	mørkebrun
AOP	orange
MAP	brungul
PAP	brunviolet
2-NPPD	brun
4-NOPD	orange

Figur 1
anden retning



III. IDENTIFIKATION OG BESTEMMELSE AF NITRIT

A. IDENTIFIKATION

1. FORMÅL OG ANVENDELSESOMRÅDE

Denne beskrevne metode beskriver identifikation af nitrit i kosmetiske produkter. Nitrit forekommer især i cremer, pastaer og tandpastaer.

2. PRINCIP

Tilstedeværelse af nitrit påvises ved dannelse af farvede derivater med 2-aminobenzaldehyd-phenylhydrazon (Nitrin).

3. REAGENSER

Der anvendes analysekvalitet.

3.1. Fortyndet svovlsyre

2 ml koncentreret svovlsyre ($d_{4}^{20} = 1,84$) fortyndes med 11 ml destilleret vand.

3.2. Fortyndet saltsyre

1 ml koncentreret saltsyre ($d_{4}^{20} = 1,19$) fortyndes med 11 ml destilleret vand.

3.3. Methanol

3.4. Opløsning af 2-aminobenzaldehyd-phenylhydrazon (Nitrin) i methanol 2,0 g. Nitrin afvejes og overføres kvantitativt til en 100 ml målekolbe. Der tilsættes dråbevis 4 ml fortyndet saltsyre (3.2), og der blandes. Der fyldes op til mærket med methanol (3.3) og blandes, indtil opløsningen er blevet fuldstændig klar. Opløsningen opbevares i en brun glasflaske (4.3).

4. APPARATUR

4.1. Bægerglas, 50 ml

4.2. Målekolbe, 100 ml

4.3. Brun glasflaske, 125 ml

4.4. Glasplade, 10 x 10 cm

4.5. Plasticspatel

4.6. Filtrerpapir, 10 x 10 cm

5. FREMGANGSMÅDE

5.1. En del af den prøve, som skal undersøges, stryges jævnt ud på glaspladen (4.4) i en lagtykkelse på højst 1 cm.

5.2. Et stykke filtrerpapir (4.6) dyppes i destilleret vand og anbringes på prøven. Ved hjælp af spatelen (4.5) presses filtrerpapiret mod prøven.

5.3. Der ventes ca. 1 minut, hvorefter der midt på filtrerpapiret dryppes:

2 dråber fortyndet svovlsyre (3.1) og derpå

2 dråber nitrinopløsning (3.4).

5.4. Efter 5 til 10 sekunders forløb fjernes filtrerpapiret og undersøges i dagslys. Tilstedeværelse af nitrit viser sig ved en rødviolet farvning. Når nitritindholdet er lavt, forandrer den rødvio-

lette farve sig til gul efter 5 til 15 sekunder. Denne farveændring finder først sted efter 1 til 2 minutter, når der er større mængder nitrit til stede.

6. *Bemærkning*

Den rødviolette farves intensitet samt den tid, der forløber indtil omslaget til gult, giver en indikation af nitritindholdets størrelsesorden.

B. BESTEMMELSE

1. FORMÅL OG ANVENDELSESOMRÅDE

Denne metode beskriver bestemmelse af nitrit i kosmetiske produkter.

2. DEFINITION

Prøvens nitritindhold bestemt efter denne metode, udtrykkes som masseprocent (% m/m) natriumnitrit.

3. PRINCIP

Efter fortynding med vand og klaring bringes prøvens indhold af nitrit til at reagere med sulfanilamid og N-1-naphthylethyldiamin, hvorefter intensiteten af den fremkomne farvning måles spektrofotometrisk ved 538 nm.

4. REAGENSER

Der anvendes analysekvalitet.

4.1. Klaringsreagenser: må ikke anvendes ud over en uge efter fremstillingen.

4.1.1. Carrez I-reagens:

106 g kaliumferrocyanid, $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$, opløses i destilleret vand og fortyndes med vand til 1 000 ml.

4.1.2. Carrez II-reagens:

219,5 g zinkacetat, $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$, og 30 ml iseddikesyre opløses i destilleret vand og fortyndes med vand til 1 000 ml.

4.2. Natriumnitritopløsning:

0,500 g natriumnitrit opløses i destilleret vand i en 1 000 ml målekolbe, hvorefter der fyldes op til mærket med vand. 100 ml af denne stamopløsning fortyndes til 500 ml; 1 ml af denne sidste opløsning $\sim 10 \mu g$ natriumnitrit.

4.3. 1 N natriumhydroxidopløsning:

4,0 g NaOH opløses i destilleret vand og fortyndes med vand til 1 000 ml.

4.4. Sulfanilamidopløsning, saltsur:

2,0 g sulfanilamid opløses i 800 ml vand under opvarmning. Efter afkøling tilsættes 100 ml koncentreret saltsyre under omrøring. Der fortyndes med vand til 1 000 ml.

4.5. 5 N saltsyre:

445 ml koncentreret saltsyre ($d_4^{20} = 1,18$) fortyndes med vand til 1 000 ml.

4.6. N-1-naphthyl-reagens

Dette reagens skal fremstilles samme dag, som det skal anvendes. 0,1 g N-1-naphthyl-ethyldiamin-dihydrochlorid opløses i vand og fortyndes med vand til 100 ml.

5. APPARATUR

5.1. Analysevægt

5.2. Målekolber, 100, 250, 500 og 1 000 ml

5.3. Fuldpipetter

- 5.4. Måleglas, 100 ml
- 5.5. Foldet filtrerpapir; nitritfrit, diameter 15 cm
- 5.6. Vandbad
- 5.7. Spektrofotometer med kuvetter med 1 cm lysvej
- 5.8. pH-meter
- 5.9. Mikroburette, 10 ml
- 5.10. Bægerglas, 250 ml

6. FREMGANGSMÅDE

- 6.1. Med en nøjagtighed på 0,1 mg afvejes omkring 0,5 g (m) af den homogeniserede prøve, som overføres til et 250 ml bægerglas. Der fortyndes med varmt destilleret vand til ca. 150 ml. Bægerglasset anbringes i vandbad på 80 °C i en halv time, idet indholdet rystes af og til.
- 6.2. Efter afkøling til stuetemperatur og under omrystning tilsættes 2 ml af henholdsvis Carrez I- (4.1.1) og Carrez II-reagens (4.1.2).
- 6.3. Ved tilsætning af 1 N natriumhydroxid (4.3) bringes pH-værdien til 8,3, idet der anvendes pH-meter. Indholdet overføres kvantitativt til en 250 ml målekolbe, som fyldes op til mærket med destilleret vand.
- 6.4. Indholdet blandes og filtreres gennem foldet filtrerpapir (5.5).
- 6.5. En passende kvotadel (V), dog ikke over 25 ml, af det klare filtrat overføres med pipette til en 100 ml målekolbe og fortyndes med destilleret vand til 60 ml.
- 6.6. Efter blanding tilsættes 10,0 ml sulfanilamidopløsning (4.4) og derpå 6,0 ml 5 N saltsyre (4.5). Indholdet blandes og hensættes i 5 minutter. Så tilsættes 2,0 ml N-1-naphthyl-reagens (4.6), og indholdet blandes og hensættes i 3 minutter. Derefter fortyndes med vand til 100 ml og blandes.
- 6.7. Der fremstilles en blindprøve ved at gentage operationerne 6.5 og 6.6 uden tilsætning af N-1-naphthyl-reagens (4.6).
- 6.8. Den under 6.6 opnåede opløsnings ekstinktion ved 538 nm måles (5.7) over for blindprøven (6.7).
- 6.9. På kalibreringskurven (6.10) aflæses det natriumnitritindhold i µg pr. 100 ml opløsning (m_1), som svarer til den i 6.8 målte ekstinktion.
- 6.10. Ved anvendelse af natriumnitritopløsningen (4.2) fremstilles en kalibreringskurve ud fra koncentrationerne 0, 20, 40, 60, 80 og 100 µg natriumnitrit pr. 100 ml.

7. BEREGNING

Prøvens nitritindhold beregnes som masseprocent natriumnitrit ved hjælp af formlen:

$$\% \text{ natriumnitrit} = \frac{250}{V} \times m_1 \times 10^{-6} \times \frac{100}{m} = \frac{m_1}{V \times m \times 40}$$

hvor:

m = massen i g af den undersøgte prøvemængde (6.1),

m_1 = det under 6.9 fundne natriumnitritindhold i μg ,

V = det til målingen anvendte rumfang filtrat i ml (6.5).

GENTAGELIGHED ⁽¹⁾

Ved et natriumnitritindhold på omkring 0,2 % må forskellen mellem resultaterne på to parallelt udførte bestemmelser på den samme prøve ikke overstige en absolut værdi på 0,005 %.

IV. IDENTIFIKATION OG BESTEMMELSE AF FRIT FORMALDEHYD

1. FORMÅL OG ANVENDELSESOMRÅDE

Denne metode beskriver identifikation og kvantitativ bestemmelse af frit formaldehyd. Metoden kan anvendes til alle kosmetiske produkter og omfatter tre dele:

1.1. Identifikation

1.2. Bestemmelse ved acetylacetone-colorimetri

Denne fremgangsmåde kan ikke anvendes, når det drejer sig om formaldehyddonorer, hvor formaldehyd er kemisk bundet eller polymeriseret.

Hvis resultatet overskrider den fastsatte højeste koncentration, skal efterfølgende fremgangsmåde anvendes:

1.3. Bestemmelse med bisulfit.

Ved denne fremgangsmåde medbestemmes ikke formaldehyd fra formaldehyddonorer, hvor formaldehyd er kemisk bundet eller polymeriseret. Imidlertid medbestemmes visse ustabile forbindelser (f. eks. hexamethylentetramin). Endvidere er alkalinitetsmålingen vanskelig i opløsning med stødpude.

2. DEFINITION

Prøvens indhold af frit formaldehyd bestemt efter denne metode udtrykkes som masseprocent (% m/m) formaldehyd.

3. PRINCIP

3.1. Identifikation

Formaldehyd giver i svovlsurt miljø lyserød eller lysviolet farvning i nærværelse af Schiffs reagens.

3.2. Bestemmelse med acetylacetone-colorimetri

Formaldehyd reagerer med acetylacetone i nærværelse af ammoniumacetat under dannelse af 3,5-diacetyl-1,4-dihydrolutidin. Dette ekstraheres med butanol-1, og ekstraktens ekstinktion måles ved 410 nm.

⁽¹⁾ Jf. ISO-norm 5725.

- 3.3. **Bestemmelse med bisulfit**
Formaldehyd reagerer med sulfit i surt miljø ved 0 °C under dannelse af en additionsforbindelse. Ved reaktionen forbruges protoner, og de overskydende protoner bestemmes ved titrering med natriumhydroxid. Protonforbruget danner beregningsgrundlag for bestemmelsen af formaldehydindholdet. En reference uden sulfit anvendes til at bestemme miljøets alkalinitet eller aciditet.
4. **REAGENSER**
Der anvendes analysekvalitet.
- 4.1. Iseddikesyre
- 4.2. Ammoniumacetat, vandfrit
- 4.3. Butanol-1
- 4.4. Svovlsyre, ca. 2N
- 4.5. 0,1 M natriumsulfit, frisk fremstillet
- 4.6. Schiffs reagens
100 mg fuchsin afvejes i et bægerglas og opløses i 75 ml vand ved 80 °C. Efter afkøling tilsættes 2,5 g natriumsulfit heptahydrat ($\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) og 1,5 ml koncentreret saltsyre ($d_4^{20} = 1,19$). Der fyldes op til 100 ml. (Reagenset må ikke anvendes efter to uger).
- 4.7. Acetylacetonereagens
I en 1 000 ml målekolbe opløses:
150 g ammoniumacetat (4.2),
2 ml acetylaceton (frisk destilleret under reduceret tryk, det må ikke udvise nogen absorption ved 410 nm),
3 ml iseddikesyre (4.1).
Der flydes op til 1 000 ml med vand (opløsningens pH: ca. 6,4). Dette reagens skal være frisk fremstillet.
- 4.8. 0,1 N svovlsyre
- 4.9. 0,1 N natriumhydroxid
- 4.10. 0,1 N iodopløsning
- 4.11. 0,1 N natriumthiosulfatopløsning
- 4.12. Formaldehydstamopløsning
5 g 37 til 40 % formaldehydopløsning anbringes i en 1 000 ml målekolbe, som fyldes op. Styrken af opløsningen bestemmes således: 10,00 ml udtages, der tilsættes 25,00 ml 0,1 N iod og 10 ml 1 N natriumhydroxid. Efter henstand i 5 minutter tilsættes 11 ml 1 N saltsyre, og den overskydende 0,1 N iod titreres med 0,1 N thiosulfat med anvendelse af stivelsesopløsning som indikator.
1 ml 0,1 N iod svarer til 1,5 mg formaldehyd
- 4.13. Formaldehydstandardopløsning. Der foretages med demineraliseret vand en fortynding 1/20 af stamopløsningen (4.12) og dernæst en fortynding 1/100. 1 ml af denne opløsning indeholder ca. 1 µg formaldehyd. Det nøjagtige indhold beregnes.
- 4.14. Thymolphthaleinopløsning, 0,1 g i 100 ml 50 % v/v ethanol
- 4.15. Referencereagens, fremstilles som 4.7, men uden acetylaceton.
5. **APPARATUR**
- 5.1. Sædvanligt laboratoriestyr
- 5.2. Faseseparationsfilter, Whatman 1 PS (eller tilsvarende)
- 5.3. Centrifuge

- 5.4. Spektrofotometer
- 5.5. Glaskuvetter med en optisk vej på 1 cm
- 5.6. Potentiometer med skriver
- 5.7. Glas/calomelektroder (det anbefales at benytte specielle lavtemperaturelektroder)
6. FREMGANGSMÅDE
- 6.1. Identifikation
- 6.1.1. Ca. 2 g af prøven afvejes i et 10 ml bægerglas.
- 6.1.2. Der tilsættes 2 dråber 2 N svovlsyre (4.4) og 2 ml Schiffsreagens (4.6) (dette reagens skal ved brugen være absolut farveløst).
Bægerglasset rystes og henstår i 5 minutter.
- 6.1.3. Hvis der iagttages en lyserød eller lysviolet farvetone i løbet af 5 minutter, er det tilstedeværende formaldehydindhold over 0,01 %, og det må bestemmes som beskrevet i afsnit 6.2 og om nødvendigt i afsnit 6.3.
- 6.2. Bestemmelse ved acetylaceton-colorimetri
- 6.2.1. *Prøve*
- 6.2.1.1. I en 100 ml målekolbe afvejes af prøven med en nøjagtighed på 0,001 g en mængde, *m*, i g svarende til en formodet formaldehydmængde på ca. 150 µg.
- 6.2.1.2. Der fyldes op til 100 ml med demineraliseret vand og blandes.
- 6.2.1.3. Til en 50 ml erlenmeyerkolbe sættes derpå:
10,00 ml af opløsningen fra 6.2.1.2,
5,00 ml acetylacetonereagens (4.7);
demineraliseret vand til et samlet rumfang på 30 ml.
- 6.2.2. *Reference*
- For at eliminere en eventuel indvirkning af baggrundsfarve i prøven fremstilles denne reference. Til en 50 ml erlenmeyerkolbe sættes:
10,0 ml af opløsningen fra 6.2.1.2,
5,0 ml referencereagens (4.15);
demineraliseret vand til et samlet rumfang på 30 ml.
- 6.2.3. *Blindprøve*
- Til en 50 ml erlenmeyerkolbe sættes:
5,0 ml acetylacetonereagens (4.7);
demineraliseret vand til et samlet rumfang på 30 ml.
- 6.2.4. *Bestemmelse*
- 6.2.4.1. Kolberne fra 6.2.1.3, 6.2.2 og 6.2.3 rystes og nedsænkes i vandbad på 60 °C i nøjagtigt 10 minutter. Derefter afkøles de i 2 minutter i et isbad.

- 6.2.4.2. Kolbernes indhold overføres til hver sin 50 ml skilletragt, der indeholder 10,0 ml butanol-1 (4.3). Kolberne skylles med 3 til 5 ml vand, som derefter overføres til skilletragtene. Blandingerne rystes kraftigt i nøjagtigt 30 sekunder, hvorefter faserne skiller.
- 6.2.4.3. Der filtreres ned i en målekuvette (5.5) gennem et fase-separationsfilter (5.2). Centrifugering (5.3) (5 000 omdr/min i 5 minutter) er mindre praktisk og tager længere tid.
- 6.2.4.4. Med spektrofotometret (5.4) måles ved 410 nm ekstinktionen, A_1 , af ekstrakten af prøven hidrørende fra 6.2.1.3 over for ekstrakten af referencen hidrørende fra 6.2.2.
- 6.2.4.5. Tilsvarende måles ekstinktionen, A_2 , af ekstraktet af blindprøven hidrørende fra 6.2.3 over for butanol-1 (4.3).

Bemærk:

Alle operationer fra anbringelse af erlenmeyerkolber i vandbad ved 60 °C til måling skal gennemføres inden for 25 minutter.

6.2.5. *Kalibreringskurve*

- 6.2.5.1. Til en 50 ml erlenmeyerkolbe sættes:
5,00 ml af standardopløsningen (4.13),
5,00 ml acetylaceton-reagens (4.7),
demineraliseret vand til et samlet rumfang på 30 ml.
- 6.2.5.2. Der fortsættes som beskrevet i 6.2.4.5, idet ekstinktionen, A , måles over for butanol-1 (4.3).
- 6.2.5.3. Proceduren gentages med 10,00, 15,00, 20,00 og 25,00 ml af standardopløsningen (4.13).
- 6.2.5.4. En 0-værdi opnås ved at gå frem som beskrevet i 6.2.4.5.
- 6.2.5.5. Kalibreringskurven konstrueres efter subtraktion af 0-værdien (6.2.5.4) fra hver af de i 6.2.5.2 og 6.2.5.3 opnåede ekstinktionsværdier. Beers lov gælder op til 30 µg formaldehyd.

6.3. **Bestemmelse med bisulfit**

6.3.1. *Prøveforberedelse*

- 6.3.1.1. I et forudvejet bægerglas afvejes med en nøjagtighed på 0,001 g en mængde, m , i g af prøven svarende til en formodet formaldehydmængde på mellem 3 og 20 mg.
- 6.3.1.2. Til reference afvejes på samme måde en tilsvarende mængde, m' , i g af prøven.

6.3.2. *Bestemmelse*

- 6.3.2.1. 50,00 ml 0,1 M natriumsulfit (4.5) kommer i et 100 ml bægerglas, og der tilsættes 10,00 ml 0,1 N svovlsyre (4.8). Der omrystes.
- 6.3.2.2. Bægerglasset nedsænkes i en blanding af is og salt for at holde opløsningens temperatur på + 2 °C. Prøvemængden (6.3.1.1) overføres kvantitativt.
- 6.3.2.3. Der titreres hurtigt ved potentiometri med 0,1 N natriumhydroxid (4.9) under kontinuerlig omrystning, idet temperaturen holdes mellem + 2 °C og + 4 °C (neutraliseringspunktet ligger mellem pH 9 og 11).
 V_1 er det forbrugte rumfang i ml af 0,1 N natriumhydroxid (4.9).

6.3.3. *Blindprøve*

Yderligere en som beskrevet i 6.3.2.1 fremstillet opløsning titreres under betingelser som beskrevet i 6.3.2. V_2 er det forbrugte rumfang i ml af 0,1 N natriumhydroxid (4.9).

6.3.4. *Reference*

Prøvens aciditet eller alkalitet bestemmes ved potentiometrisk titrering med 0,1 N natriumhydroxid (4.9) eller 0,1 N svovlsyre (4.8) af den prøvemængde, m' , der blev taget i arbejde under 6.3.1.2.

v' er det forbrugte rumfang i ml af titrervæske (4.8 eller 4.9).

Bemærkning

Det er vigtigt, at man nøje overholder forsøgsbetingelserne. Det er muligt at udføre bestemmelsen med thymolphthalein (4.14) som indikator.

7. BEREKNING AF RESULTATER

7.1. Bestemmelse ved acetylaceton-colorimetri

7.1.1. A_2 subtraheres fra A_1 , og ud fra kalibreringskurven (6.2.5.5) aflæses mængden, c , i μg af formaldehyd i prøveopløsningen fra 6.2.1.3.

7.1.2. Prøvens formaldehydindhold i masseprocent (% m/m) beregnes efter formlen:

$$\% \text{ formaldehyd} = \frac{C}{1000 \cdot m}$$

idet:

m = prøvemængden i g (6.2.1.1).

7.2. Bestemmelse med bisulfit

Det i 6.3.4 forbrugte rumfang, v' , i ml af 0,1 N natriumhydroxid eller 0,1 N svovlsyre til titrering af referenceprøvemængden, m' , omregnes i forhold til den prøvemængde, m , der anvendes til bestemmelsen med bisulfit (6.3.2):

$$v = \frac{v' \cdot m}{m'}$$

For et neutralt produkt er v naturligvis 0.

7.2.1. Prøvens formaldehydindhold i masseprocent (% m/m) beregnes, dersom prøven ved 6.3.4 har vist sig sur, ud fra formlen:

$$\% \text{ formaldehyd} = \frac{0,30 (V_2 - V_1 + v)}{m}$$

7.2.2. Dersom prøven ved 6.3.4 har vist sig alkalisk, beregnes formaldehydindholdet ud fra formlen:

$$\% \text{ formaldehyd} = \frac{0,30 (V_2 - V_1 - v)}{m}$$

7.3. Hvis resultaterne, der er opnået efter de to metoder, afviger fra hinanden, skal kun det laveste resultat benyttes.

8. GENTAGELIGHED ⁽¹⁾

Ved et formaldehydindhold på omkring 0,2 % må forskellen mellem resultaterne på to parallelt udførte bestemmelser ikke overstige en absolut værdi på 0,005 % ved colorimetri-metoden og på 0,05 % ved bisulfitmetoden.

(1) Jf. ISO-norm 5725.

V. BESTEMMELSE AF RESORCINOL I SHAMPOO OG HÅRLOTION

1. FORMÅL OG ANVENDELSESOMRÅDE

Denne metode beskriver bestemmelse af resorcinol ved gaschromatografi i shampoo og hårlotion. Metoden er anvendelig for koncentrationer fra 0,1 op til 2,0 % resorcinol i produktet.

2. DEFINITION

Prøvens indhold af resorcinol bestemt efter denne metode udtrykkes i masseprocent (% m/m) resorcinol.

3. PRINCIP

Resorcinol og 3,5-dihydroxytoluen, der er tilsat som intern standard, separeres fra prøven ved tyndtlagschromatografi, idet de isoleres fra den udviklede tyndtlagsplade ved afskrabning og efterfølgende ekstraktion med methanol. Sluttelig tørres de ekstraherede komponenter, silyleres og bestemmes ved gaschromatografi.

4. REAGENSER

Der anvendes analysekvalitet.

4.1. Saltsyre, 25 % m/m

4.2. Methanol

4.3. Ethanol, 96 % v/v

4.4. Kieselgelplader, færdigfremstillede (plast- eller aluminiumfolie), med fluorescensindikator. Pladerne deaktiveres ved oversprøjtning med vand, indtil kieselgellaget virker gennemsigtigt; derpå tørres de ved stuetemperatur i 1 til 3 timer.

Bemærk: Hvis pladerne ikke deaktiveres, kan der forekomme tab af resorcinol ved irreversibel adsorption på kieselgelen.

4.5. Udviklingsvæske acetone — chloroform — eddikesyre (20-75-5, volumen)

4.6. Resorcinolstandardopløsning: 400 mg resorcinol opløses i 100 ml ethanol (4.3) (1 ml svarer til 4 000 µg resorcinol)

4.7. Intern standardopløsning: 400 mg 3,5-dihydroxytulen — DHT — opløses i 100 ml ethanol (4.3) (1 ml svarer til 4 000 µg DHT)

4.8. Standardopløsning: 10 ml resorcinolstandardopløsning (4.6) og 10 ml intern standardopløsning (4.7) blandes i en 100 ml målekolbe; der fyldes op til mærket med ethanol (4.3) og blandes. (1 ml svarer til 400 µg resorcinol og 400 µg DHT)

4.9. Silyleringsmidler:

4.9.1. N,0-bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid — BSTFA

4.9.2. Hexamethyldisilazan — HMDS

4.9.2. Trimethylchlorsilan — TMCS

5. APPARATUR

- 5.1. Sædvanligt udstyr til tyndtlagschromatografi samt gaschromatograf med flammeionisations-detektor
- 5.2. Sædvanligt laboratorieudstyr

6. FREMGANGSMÅDE

6.1. Prøveforberedelse

- 6.1.1. I et 150 ml bægerglas afvejes nøjagtigt en prøvemængde, m , i g af produktet indeholdende 20 til 50 mg resorcinol.
- 6.1.2. Der tilsættes saltsyre (4.1), indtil blandingen er sur (2 til 4 ml), og derpå 10 ml intern standardopløsning (4.7) (40 mg DHT), og der blandes. Bægerglassets indhold overføres med ethanol (4.3) til en 100 ml målekolbe, og der fyldes op til mærket med ethanol (4.3) og blandes.
- 6.1.3. 250 μ l af opløsning 6.1.2 påføres en deaktiveret kieselgelplade (4.4) som en kontinuerlig ca. 8 cm lang linie, som bør være så smal som muligt.
- 6.1.4. 250 μ l af standardopløsningen (4.8) påføres samme plade og på samme måde som beskrevet i 6.1.3.
- 6.1.5. For at kunne lokalisere komponenterne efter udviklingen påsættes 5 μ l af hver af opløsningerne 4.6 og 4.7 i to punkter på linie med de under 6.1.3 og 6.1.4 påførte opløsninger.
- 6.1.6. Pladen udvikles i en uforet (umættet) tank med udviklingsvæske (4.5), indtil væskefronten er nået 12 cm fra startlinien; dette tager sædvanligvis ca. 45 minutter. Pladen lufttørres, og resorcinol/DHT-zonen lokaliseres under kortbølget ultraviolet lys. De to forbindelser har tilnærmelsesvis de samme R_f -værdier. Båndene afmærkes med en blyant i en afstand på 2 mm fra ydersiden af båndenes mørke grænselinie. Disse afmærkede zoner fjernes, og for hvert bånd opsamles adsorptionsmidlet i en 10 ml flaske.
- 6.1.7. Den adsorptionsmiddeldel, som vedrører prøven og den, som vedrører standardopløsningen, ekstraheres hver for sig på følgende måde: Der tilsættes 2 ml methanol (4.2), og der ekstraheres i 1 time under stadig omrøring (magnetomrøring er bekvemt). Blandingerne filtreres, og ekstraktionen gentages i yderligere 15 minutter med 2 ml methanol (4.2).
- 6.1.8. Opløsningsmidlet fjernes fra de samlede ekstrakter ved tørring natten over i vacuumekssikator indeholdende et passende tørremiddel. Der må ikke anvendes varme.
- 6.1.9. Resterne (6.1.8) silyleres som angivet under enten 6.1.9.1 eller 6.1.9.2.
- 6.1.9.1. Der tilsættes 200 μ l BSTFA (4.9.1), hvorefter blandingen henstår i et lukket glas i 12 timer ved stuetemperatur.
- 6.1.9.2. Successivt tilsættes 200 μ l HMDS (4.9.2) og 100 μ l TMCS (4.9.3), hvorefter blandingen opvarmes til 60 °C i 30 minutter i et lukket glas. Derefter afkøles blandingen.

6.2. Gaschromatografisk bestemmelse

6.2.1. Betingelser

Den stationære fase skal have en opløsningssevne, R , på mindst 1,5, hvor

$$R = 2 \frac{d' (r_2 - r_1)}{w_1 + w_2}$$

idet:

- r_1 og r_2 = retentionstider i minutter af to toppe,
 w_1 og w_2 = topbredder i, halv højde i mm af disse toppe,
 d' = skriverens papirhastighed i mm/min.

Følgende gaschromatografibetingelser har vist sig passende:

kolonne type:	rustfrit stål
længde:	200 cm
indre diameter:	~ 3 mm
Kolonnemateriale	Chromosorb W AW, 100—120 mesh, med 10 % OV-17
Temperaturer	injektionsenhed: 250 °C
	kolonneovn: 185 °C (isotermisk)
	detektor: 250 °
Gasser bæregas:	nitrogen, flow 45 ml/min
øvrige:	luft og hydrogen indstilles efter fabrikantens instruktioner

- 6.2.2. 1 til 3 µl af de under 6.1.9 opnåede opløsninger indsprøjtes i gaschromatografen. Der udføres 5 indsprøjtninger af hver opløsning (6.1.9), toparealerne måles, og på middeltallene beregnes toparealforholdet, S, hvor:

S = resorcinoltopareal/DHT-topareal.

7. BEREGNING

Prøvens resorcinolindhold udtrykt i masseprocent (% m/m) resorcinol beregnes ved hjælp af formlen:

$$\% \text{ resorcinol} = \frac{4}{M} \times \frac{S_s}{S_{st}}$$

hvor:

M = prøvemængden i g (6.1.1),

S_s = middeltoparealforholdet ifølge 6.2.2 for prøveopløsningen,

S_{st} = middeltoparealforholdet ifølge 6.2.2 for standardopløsningen.

8. GENTAGELIGHED ⁽¹⁾

Ved et resorcinolindhold på omkring 0,5 % må forskellen mellem resultaterne på to parallelt udførte bestemmelser på den samme prøve ikke overstige en absolut værdi på 0,025 %.

VI. BESTEMMELSE AF METHANOL I FORHOLD TIL ETHANOL ELLER PROPANOL-2

1. FORMÅL OG ANVENDELSESOMRÅDE

Denne metode beskriver bestemmelse ved gaschromatografi af methanol, og den kan anvendes på alle typer af kosmetiske produkter (inklusive aerosoler). Relative mængder på 0 til 10 % kan bestemmes.

2. DEFINITION

Methanolindholdet bestemt efter denne metode udtrykkes som masseprocent (% m/m) i forhold til ethanol eller propanol-2.

3. PRINCIP

Bestemmelsen udføres ved gaschromatografi.

⁽¹⁾ Jf. ISO-norm 5725.

4. REAGENSER

Der anvendes analysekvalitet.

- 4.1. Methanol
- 4.2. Ethanol, absolut
- 4.3. Propanol-2
- 4.4. Chloroform, vasket med vand for at fjerne alkoholer.

5. APPARATUR

- 5.1. Gaschromatograf med varmetrådsdetektor (til prøver af produkter på aerosolform) og med flammeionisationsdetektor (til prøver af andre produkter)
- 5.2. Målekolber, 100 ml
- 5.3. Målepipetter, 2 ml, 20 ml og 0 til 1 ml
- 5.4. Mikrosprøjter, 0 til 100 µl og 0 til 5 µl; endvidere — for aerosolprodukter — speciel gastæt sprøjte med glideventil (jf. figur 5 i prøveudtagningsmetoden).

6. FREMGANGSMÅDE

6.1. Prøveforberedelse

- 6.1.1. Produkter på aerosolform behandles som beskrevet i kapitel II i bilaget til Kommissionens direktiv 80/1335/EØF af 22. december 1980 ⁽¹⁾, hvorefter analyseringen foretages ved gaschromatografi ifølge betingelserne i 6.2.1.
- 6.1.2. Andre produkter, der er behandlet som beskrevet i ovennævnte kapitel II, fortyndes med vand til et niveau på 1 til 2 % ethanol eller propanol-2, hvorefter de analyseres ved gaschromatografi ifølge betingelserne i 6.2.2.

6.2. Gaschromatografibetingelser

6.2.1. Produkter på aerosolform

- 6.2.1.1. Der anvendes kolonne med 10 % Hallcomid M 18 på Chromosorb WAW, 100 til 200 mesh, og varmetrådsdetektor
- 6.2.1.2. Den stationære fase skal have en opløsningsevne, R, på mindst 1,5,

hvor :

$$R = \frac{2 d' (r_2 - r_1)}{w_1 + w_2}$$

idet:

r_1 og r_2 = retentionstider i minutter af to toppe,
 w_1 og w_2 = topbredder i halv højde i mm af disse toppe,
 d' = skriverens papirhastighed i mm/min.

- 6.2.1.3. Den ønskede opløsningsevne kan opnås ved følgende betingelser:

Kolonne	type:	rustfrit stål
	længde:	3,5 m
	diameter:	3 mm
varmetrådsdetektor	brostrøm:	150 mA

⁽¹⁾ EFT nr. L 383 af 31. 12. 1980, s. 27.

Bæregas helium:

tryk: 2,5 bar
flow: 45 ml/min

Temperaturer

injektionsenhed: 150 °C
detektor: 150 °C
kolonneovn: 65 °C

6.2.2. Andre produkter

6.2.2.1. Der anvendes kolonne med Chromsorb 105 eller Porapak QS og flammeionisationsdetektor

6.2.2.2. Den stationære fase skal have en opløsningssevne, R, på mindst 1,5,

$$\text{hvor: } R = \frac{2 d' (r_2 - r_1)}{w_1 + w_2}$$

idet:

r_1 og r_2 = retentionstider i minutter af to toppe,
 w_1 og w_2 = topbredder i halv højde i mm af disse toppe,
 d' = skriverens papirhastighed i mm/min.

6.2.2.3. Den ønskede opløsningssevne kan opnås ved følgende betingelser:

kolonne type: rustfrit stål
længde: 2 m
diameter: 3 mm

flammeionisationsdetektor

elektrometer følsomhed: 8×10^{-10} A

gasser bæregas: nitrogen, tryk: 2,1 bar flow: 40 ml/min
andre: hydrogen, tryk: 1,5 bar flow: 20 ml/min

temperaturer injektionsenhed: 150 °C
detektor: 230 °C
kolonneovn: 120 °C eller 130 °C

7. KALIBRERINGSKURVE

7.1. Under gaschromatografibetingelserne beskrevet i 6.2.1 (kolonne med Hallcomid M 18) anvendes følgende standardblandinger, der fremstilles ved afpipettering, men hvis nøjagtige mængdesammensætning findes ved vejning umiddelbart efter hver tilsætning:

Relativ koncentration, % m/m (ca.)	Methanol ml	Ethanol eller propanol-2 ml	Chloroform til samlet vol. på, ml
2,5	0,5	20	100
5,0	1,0	20	100
7,5	1,5	20	100
10,0	2,0	20	100

Der indsprøjtes i gaschromatografen 2 til 3 µl under de i 6.2.1 givne betingelser.

Toparealforholdene for methanol/ethanol eller methanol/propanol-2 beregnes. Kalibreringskurven konstrueres således:

X-aksen: % m/m methanol i forhold til ethanol eller propanol-2;

Y-aksen: toparealforholdene for methanol/ethanol eller methanol/propanol-2.

- 7.2. Under gaschromatografi-betingelserne beskrevet i 6.2.2 (kolonne med Chromosorb 105 eller Poropak QS) anvendes følgende standardblandinger, der fremstilles ved afpipettering, men hvis nøjagtige mængdesammensætning findes ved vejning umiddelbart efter hver tilsætning:

Relativ koncentration, % m/m (ca.)	Methanol μ l	Ethanol eller propanol-2 ml	Vand til samlet volumen på, ml
2,5	50	2	100
5,0	100	2	100
7,5	150	2	100
10,0	200	2	100

Der indsprøjtes i gaschromatografen 2 til 3 μ l under de i 6.2.2 givne betingelser.

Toparealforholdene for methanol/ethanol eller methanol/propanol-2 beregnes. Kalibreringskurven konstrueres således:

X-aksen: % m/m methanol i forhold til ethanol eller propanol-2;

Y-aksen: toparealforholdene for methanol/ethanol eller methanol/propanol-2.

- 7.3. I begge tilfælde skal kurven være en ret linie.

8. GENTAGELIGHED ⁽¹⁾

Ved et methanolindhold på 5 % i forhold til indholdet af ethanol eller propanol-2 må forskellen mellem resultaterne på to parallelt udførte bestemmelser på den samme prøve ikke overstige en absolut værdi på 0,25 %.

⁽¹⁾ Jf. ISO-norm 5725.