

Dieses Dokument ist lediglich eine Dokumentationsquelle, für deren Richtigkeit die Organe der Gemeinschaften keine Gewähr übernehmen

► **B**

**ZWEITE RICHTLINIE DER KOMMISSION
vom 14. Mai 1982**

**zur Angleichung der Rechtsvorschriften der Mitgliedstaaten über Analysemethoden zur Kontrolle
der Zusammensetzung der kosmetischen Mittel**

(82/434/EWG)

(ABl. L 185 vom 30.6.1982, S. 1)

Geändert durch:

| | Nr. | Amtsblatt Seite | Datum |
|---|-------|--------------------|-----------|
| ► <u>M1</u> Richtlinie 90/207/EWG der Kommission vom 4. April 1990 | L 108 | 92 | 28.4.1990 |

Berichtigt durch:

- **C1** Berichtigung, ABl. L 190 vom 14.7.1983, S. 39 (82/434/EWG)
- **C2** Berichtigung, ABl. L 115 vom 8.5.1991, S. 58 (90/207/EWG)



ZWEITE RICHTLINIE DER KOMMISSION

vom 14. Mai 1982

zur Angleichung der Rechtsvorschriften der Mitgliedstaaten über Analysemethoden zur Kontrolle der Zusammensetzung der kosmetischen Mittel

(82/434/EWG)

DIE KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN —

gestützt auf den Vertrag zur Gründung der Europäischen Wirtschaftsgemeinschaft,

gestützt auf die Richtlinie 76/768/EWG des Rates vom 27. Juli 1976 zur Angleichung der Rechtsvorschriften der Mitgliedstaaten über kosmetische Mittel⁽¹⁾, geändert durch die Richtlinie 79/661/EWG⁽²⁾, insbesondere auf Artikel 8 Absatz 1,

in Erwägung nachstehender Gründe:

Die Richtlinie 76/768/EWG sieht amtliche Kontrollen der kosmetischen Mittel vor, um nachzuprüfen, ob die in den Gemeinschaftsbestimmungen über die Zusammensetzung der kosmetischen Mittel vorgeschriebenen Bedingungen erfüllt sind.

Hierzu müssen so rasch wie möglich alle erforderlichen Analysemethoden festgelegt werden; ein erster Schritt zur Erreichung dieses Zieles war die Festlegung bestimmter Methoden in der Richtlinie 80/1335/EWG der Kommission⁽³⁾; die Festlegung der Methoden für den Nachweis von Oxidationsmitteln und die quantitative Bestimmung von Wasserstoffperoxid in Haarpflegemitteln, den Nachweis und die halbquantitative Bestimmung bestimmter Oxidationsfarbstoffe in Haarfärbemitteln, den Nachweis und die quantitative Bestimmung von Nitriten, den Nachweis und die quantitative Bestimmung von freiem Formaldehyd, die quantitative Bestimmung des Resorcins in Shampoos und in Haarwässern sowie die quantitative Bestimmung des Methanols im Verhältnis zu Äthanol oder Propanol-2 stellen einen weiteren Schritt in dieser Richtung dar.

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

HAT FOLGENDE RICHTLINIE ERLASSEN:

Artikel 1

Die Mitgliedstaaten treffen alle zweckdienlichen Maßnahmen, um sicherzustellen, daß für

- den Nachweis von Oxidationsmitteln und die quantitative Bestimmung von Wasserstoffperoxid in Haarpflegemitteln,
- den Nachweis und die halbquantitative Bestimmung von oxidierenden Farbstoffen in Haarfärbemitteln,
- den Nachweis und die quantitative Bestimmung von Nitriten,
- den Nachweis und die quantitative Bestimmung von freiem Formaldehyd,
- die quantitative Bestimmung des Resorcingehalts in Shampoos und Haarlotionen,
- die quantitative Bestimmung von Methanol im Verhältnis zu Äthanol oder Propanol-2

die amtlichen Kontrollen von kosmetischen Mitteln nach den im Anhang zu dieser Richtlinie beschriebenen Methoden durchgeführt werden.

⁽¹⁾ ABl. Nr. L 262 vom 27. 9. 1976, S. 169.

⁽²⁾ ABl. Nr. L 192 vom 31. 7. 1979, S. 35.

⁽³⁾ ABl. Nr. L 383 vom 31. 12. 1980, S. 27.

▼B

Artikel 2

Die Mitgliedstaaten erlassen die erforderlichen Rechts- und Verwaltungsvorschriften, um dieser Richtlinie spätestens am 31. Dezember 1983 nachzukommen. Sie setzen die Kommission unverzüglich davon in Kenntnis.

Artikel 3

Diese Richtlinie ist an die Mitgliedstaaten gerichtet.

▼B

ANHANG

I. NACHWEIS VON OXIDATIONSMITTELN UND QUANTITATIVE
BESTIMMUNG VON WASSERSTOFFPEROXID IN HAARPFLEGE-
MITTELN

ZWECK UND ANWENDUNGSBEREICH

Die jodometrische Bestimmung von Wasserstoffperoxid in Kosmetika ist nur bei Abwesenheit anderer Oxidationsmittel, die mit Jodid Jod bilden, möglich. Vor einer jodometrischen Bestimmung von Wasserstoffperoxid müssen daher etwaige andere anwesende Oxidationsmittel erkannt und nachgewiesen werden. Dieser Nachweis gliedert sich in zwei Teile; der erste Teil erfaßt die Persulfate, Bromate sowie Wasserstoffperoxid und der zweite Teil Bariumperoxid.

A. NACHWEIS VON PERSULFATEN, BROMATEN UND WASSERSTOFF-
PEROXID

1. PRINZIP

Natrium-, Kalium- und Ammoniumpersulfat; Kalium- und Natriumbromat sowie Wasserstoffperoxid — alle Stoffe, die sich nicht vom Bariumperoxid ableiten — werden mit Hilfe der absteigenden Papierchromatographie unter Verwendung von zwei Fließmitteln nachgewiesen.

2. REAGENZIEN

Alle Reagenzien müssen analysenrein sein.

2.1. Referenzlösungen von 0,5 % (m/v) in Wasser:

2.1.1. Natriumpersulfat

2.1.2. Kaliumpersulfat

2.1.3. Ammoniumpersulfat

2.1.4. Kaliumbromat

2.1.5. Natriumbromat

2.1.6. Wasserstoffperoxid

2.2. Fließmittel A: 80 %iges Äthanol (v/v)

2.3. Fließmittel B: Benzol — Methanol — Isoamylalkohol — Wasser
(34 + 38 + 18 + 10) (v/v/v/v)

2.4. Sprühmittel A: 10 %ige Kaliumjodidlösung (m/v) in Wasser

2.5. Sprühmittel B: 1 %ige Stärkelösung (m/v) in Wasser

2.6. Sprühmittel C: 10 %ige Salzsäure (m/m)

2.7. Salzsäure: 4 N

3. GERÄTE UND HILFSMITTEL

3.1. Papier für die Chromatographie (Whatman-Papier Nr. 3 oder Nr. 4 oder gleichwertiges Papier)

3.2. Mikropipette 1 µl

3.3. Meßkolben 100 ml

3.4. Faltenfilter

3.5. Ausrüstung zur Durchführung der absteigenden Papierchromatographie

4. VORBEREITUNG DER PROBEN

4.1. **Wasserlösliche Erzeugnisse**

Von jedem Muster sind zwei Lösungen herzustellen, von denen bei der ersten 1 und bei der zweiten 5 Gramm des Erzeugnisses in 100 ml Wasser aufgelöst werden. Von jeder dieser Lösungen ist 1 Mikroliter

▼ **B**

für die Durchführung der unter Punkt 5 beschriebenen Papierchromatographie zu benutzen.

4.2. **Nicht vollkommen wasserlösliche Erzeugnisse**

4.2.1. 1 bzw. 5 Gramm der Probe werden gewogen und in 50 ml Wasser suspendiert, beide Suspensionen mit Wasser auf 100 ml auffüllen und gut durchschütteln. Beide Suspensionen werden filtriert und von jedem Filtrat ein Mikroliter zur Durchführung der unter 5 beschriebenen Chromatographie verwendet.

4.2.2. Es sind erneut von jeder Probe zwei Suspensionen anzufertigen, indem 1 bzw. 5 Gramm in 50 ml Wasser suspendiert, mit verdünnter Salzsäure (2.7) angesäuert, mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt und durchmischt werden. Die Suspensionen werden filtriert und ein Mikroliter von beiden Filtraten zur Durchführung der unter 5 beschriebenen Papierchromatographie verwendet.

4.3. **Crems**

Von jedem Erzeugnis werden 5 g und 20 g in je 100 ml Wasser suspendiert und die Suspensionen zur Durchführung der unter 5 beschriebenen Papierchromatographie verwendet.

5. **ARBEITSWEISE**

5.1. Zwei Chromatographiegefäße zur Durchführung der absteigenden Papierchromatographie mit einer geeigneten Menge des Fließmittels A (2.2) und B (2.3) füllen. Die Chromatographiegefäße werden wenigstens 24 Stunden lang mit den Dämpfen der Fließmittel gesättigt.

5.2. Auf einen 40 cm langen und 20 cm breiten Papierstreifen Whatman-Papier Nr. 3 (3.1) — dieser kann auch ein anderes geeignetes Format haben — auf je einen Startpunkt 1 µl der gemäß 4 und 2.1 zubereiteten Probe- und Referenzlösung auftragen und das Lösungsmittel an der Luft verdampfen lassen.

5.3. Das Chromatographiepapier (5.2) in das mit dem Fließmittel A (5.1) gefüllte Chromatographiegefäß hängen und chromatographieren, bis sich die Fließmittelfront in einem Abstand von 35 cm von der Startlinie befindet. Die hierzu erforderliche Laufzeit beträgt ungefähr 15 Stunden.

5.4. Die Vorgänge gemäß 5.2 und 5.3 mit Whatman-Papier Nr. 4 (oder gleichwertiges Papier) (3.1) und Fließmittel B wiederholen. Chromatographieren, bis die Fließmittelfront 35 cm von der Startlinie beträgt. Die hierzu erforderliche Zeit beträgt ungefähr 5 Stunden.

5.5. Nach Entwicklung werden die Papierstreifen aus den Chromatographiegefäßen herausgenommen und an der Luft getrocknet.

5.6. Die Verbindungen werden auf dem Chromatogramm durch Besprühen mit Deduktionsmitteln auf dem Papierstreifen sichtbar gemacht. Dabei ist wie folgt vorzugehen:

5.6.1. Zunächst mit Sprühmittel A (2.4) und kurz danach mit Sprühmittel B (2.5) besprühen. Zunächst erscheinen die Flecke der Persulfate und danach die des Wasserstoffperoxids auf dem Chromatogramm. Die Flecke sind mit Bleistift zu markieren.

5.6.2. Mit Sprühmittel C (2.6) werden die nach 5.6.1 erhaltenen Chromatogramme besprüht. Vorhandene Bromate werden auf dem Chromatogramm als grau-blaue Flecke sichtbar.

5.7. R_f -Werte der Vergleichssubstanzen (2.1) unter den oben beschriebenen Bedingungen für die Fließmittel A (2.2) und B (2.3):

| | <i>Fließmittel A (2.2)</i> | <i>Fließmittel B (2.3)</i> |
|--------------------|----------------------------|----------------------------|
| 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 |
| Wasserstoffperoxid | 0,80 | 0,80 |

▼B

B. NACHWEIS VON BARIUMPEROXID

1. PRINZIP

Bariumperoxid wird wie folgt nachgewiesen: Papierchromatographisch als Wasserstoffperoxid nach dem Ansäuern der Probe (A.4.2);

- sofern keine Persulfate vorhanden sind (A), durch Hinzufügen von verdünnter Schwefelsäure in einen Teil der sauren Probelösung (B.4.1). Es entsteht ein weißer Bariumsulfatniederschlag. Barium-Ionen werden in der Probelösung (4.1) papierchromatographisch nach der unten beschriebenen Methode (5) nochmal nachgewiesen;
- falls Bariumperoxid und Persulfate gleichzeitig vorhanden sind (B.4.2), ist der Rückstand der Lösung alkalisch aufzuschließen und in HCl zu lösen. Der Nachweis von Barium-Ionen (B.4.2.3) erfolgt sowohl papierchromatographisch als auch durch Fällung als Bariumsulfat.

2. REAGENZIEN

- 2.1. Methanol
- 2.2. 36 %ige (m/m) konzentrierte Salzsäure
- 2.3. Salzsäure 6 N
- 2.4. Schwefelsäure 4 N
- 2.5. Dinatriumrhodizonat
- 2.6. Bariumchlorid ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- 2.7. Natriumcarbonat, wasserfrei
- 2.8. 1 %ige Bariumchloridlösung in Wasser (m/v)
- 2.9. Fließmittel: Methanol/36 %ige Salzsäure/Wasser (80+10+10) (v/v/v/)
- 2.10. Sprühmittel: 0,1 %ige Dinatriumrhodizonatlösung in Wasser (m/v); die Lösung ist kurz vor Gebrauch frisch herzustellen.

3. GERÄTE UND HILFSMITTEL

- 3.1. Mikropipette 5 µl
- 3.2. Platintiegel
- 3.3. Meßkolben 100 ml
- 3.4. Chromatographiepapier (Schleicher und Schüll 2043 b, oder gleichwertiges). Zur Vorbereitung ist das Papier eine Nacht lang absteigend mit dem Fließmittel (B.2.9) zu chromatographieren (A.3.5) und danach zu trocknen.
- 3.5. Faltenfilter
- 3.6. Ausrüstung für die aufsteigende Papierchromatographie

4. VORBEREITUNG DER PROBEN

4.1. **Erzeugnisse, in denen keine Persulfate enthalten sind**

- 4.1.1. 2 Gramm des Erzeugnisses werden in 50 ml Wasser suspendiert (auflösen). Der pH-Wert der Lösung wird mit Salzsäure auf etwa 1 eingestellt (B.2.3).
- 4.1.2. Die Lösung (Suspension) wird mit Wasser in einen 100-ml-Meßkolben überführt, mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt und gemischt. Die Lösung wird, wie unter 5 beschrieben, papierchromatographisch untersucht.

4.2. **Erzeugnisse, die Persulfate enthalten**

- 4.2.1. 2 Gramm des Erzeugnisses werden in 100 ml Wasser suspendiert (auflösen) und filtriert.
- 4.2.2. In einem Platintiegel (B.3.2) wird dem getrockneten Rückstand das Sieben- bis Zehnfache seines Gewichts an Natriumcarbonat hinzugefügt (B.2.7), durchgemischt und so lange erhitzt, bis eine Schmelze entsteht (30 min.).

▼B

- 4.2.3. Die auf Raumtemperatur abgekühlte Schmelze wird in 50 ml Wasser suspendiert und filtriert (B.3.5).
- 4.2.4. Der Schmelzrückstand wird in 6 N Salzsäure (B.2.3) aufgelöst und mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Diese Lösung wird für die nachstehend beschriebene papierchromatographische Analyse und für die Identifizierung der Bariumionen durch Fällung als Bariumsulfat verwendet.

5. ARBEITSWEISE

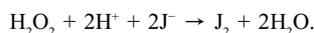
- 5.1. In ein Chromatographiegefäß für aufsteigende Papierchromatographie wird eine geeignete Menge Fließmittel (B.2.9) gegeben und das Gefäß wenigstens 15 Stunden lang mit den Dämpfen des Fließmittels gesättigt.
- 5.2. Auf ein — in der in Punkt (B.3.4) beschriebenen Weise vorbehandeltes — Stück Chromatographiepapier werden auf drei Startpunkte jeweils 5 µl der unter (B.4.1.2) und (B.4.2.4) hergestellten Lösungen und der Referenzlösung (B.2.8) gegeben.
- 5.3. Das Lösungsmittel an der Luft verdampfen lassen. Es wird aufsteigend chromatographiert, bis die Fließmittelfront 30 cm erreicht hat.
- 5.4. Das Chromatographiepapier ist aus der Chromatographierschale zu nehmen und an der Luft zu trocknen.
- 5.5. Die Flecke im Chromatogramm durch Aufsprühen des Sprühmittels (B.2.10) auf das Chromatogramm sichtbar machen.

Ist Barium vorhanden, so entstehen rote Flecke mit einem Rf-Wert von ungefähr 0,10.

C. DIE BESTIMMUNG VON WASSERSTOFFPEROXID

1. PRINZIP

Die jodometrische Bestimmung von Wasserstoffperoxid verläuft nach der folgenden Reaktion:



Diese langsam verlaufende Umsetzung wird durch Ammoniummolybdat beschleunigt. Das gebildete Jod wird mit Natriumthiosulfatlösung titrimetrisch bestimmt und ist ein Maß für den Gehalt an Wasserstoffperoxid.

2. DEFINITION

Der auf nachstehende Weise gemessene Wasserstoffperoxidgehalt wird in Massen-Prozent (% m/m) der Ware ausgedrückt.

3. REAGENZIEN

Alle Reagenzien müssen analysenrein sein.

- 3.1. Schwefelsäure 2 N
- 3.2. Kaliumjodid
- 3.3. Ammoniummolybdat
- 3.4. Natriumthiosulfatlösung 0,1 N
- 3.5. 10 %ige Kaliumjodidlösung (m/v). Die Lösung kurz vor Gebrauch frisch herstellen.
- 3.6. 20 %ige Ammoniummolybdatlösung (m/v)
- 3.7. 1 %ige Stärkelösung (m/v)

4. GERÄTE UND HILFSMITTEL

- 4.1. Bechergläser 100 ml
- 4.2. Bürette 50 ml
- 4.3. Meßkolben 250 ml
- 4.4. Meßzylinder 25 und 100 ml

▼B

- 4.5. geeichte Pipette 10 ml
- 4.6. Erlenmeyerkolben 250 ml
5. ARBEITSWEISE
- 5.1. 10 Gramm (m) des Erzeugnisses, das ungefähr 0,6 Gramm Wasserstoffperoxid enthält, werden in ein 100-ml-Becherglas eingewogen, mit Wasser in einen 250-ml Meßkolben überspült, bis zum Eichstrich mit Wasser aufgefüllt und gemischt.
- 5.2. Von der Probelösung (5.1) werden 10 ml in einen 250-ml-Erlenmeyerkolben (4.6) pipettiert und nacheinander 100 ml Schwefelsäure 2 N (3.1), 20 ml Kaliumjodidlösung (3.5) sowie drei Tropfen Ammoniummolybdatlösung (3.6) hinzugefügt.
- 5.3. Das gebildete Jod wird unmittelbar mit 0,1 N (3.4) Natriumthiosulfatlösung titriert. Kurz vor Erreichen des Äquivalenzpunktes sind einige Milliliter Stärkelösung als Indikator hinzuzufügen. Den in ml (V ml) ausgedrückten Verbrauch an 0,1 N Natriumthiosulfatlösung notieren.
- 5.4. In der Weise wie unter 5.2 und 5.3 angegeben, ist eine Blindbestimmung durchzuführen, bei der anstelle der 10 ml Probelösung 10 ml Wasser verwendet werden. Den Verbrauch an 0,1 N Natriumthiosulfatlösung bei der Blindbestimmung (V₀ ml) notieren.

6. BERECHNUNG

Der Gehalt an Wasserstoffperoxid der Ware in Gewichts-Prozent (% m/m) wird nach folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ Wasserstoffperoxid} = \frac{(V - V_0) \times 1,7008 \times 250 \times 100}{m \times 10 \times 1000}$$

oder

$$\% \text{ Wasserstoffperoxid} = \frac{(V - V_0) \times 4,252}{m}$$

In dieser Formel bedeuten:

- m = die Menge der untersuchten Ware in Gramm (5.1),
- V₀ = den in ml ausgedrückten Verbrauch an Natriumthiosulfatlösung bei der Blindbestimmung (5.4),
- V = den in ml ausgedrückten Verbrauch an 0,1 N Natriumthiosulfatlösung bei der Titration der Probelösung (5.3).

7. WIEDERHOLBARKEIT⁽¹⁾

Unter den oben beschriebenen Umständen beträgt die Standardabweichung der Meßergebnisse bei einer Probe, die ungefähr 6 % (m/m) Wasserstoffperoxid enthält, höchstens 0,2 %.

II. NACHWEIS UND HALBQUANTITATIVE BESTIMMUNG VON OXIDIERENDEN FARBSTOFFEN IN HAARFÄRBEMITTELN

1. ZWECK UND ANWENDUNGSBEREICH

Nach dieser Methode lassen sich nachstehend aufgeführte Substanzen in cremeförmigen und flüssigen Haarfärbemitteln nachweisen und halbquantitativ bestimmen:

| Bezeichnung der Substanzen | Symbol |
|----------------------------|--------|
| <i>Phenylendiamine</i> | |
| 1-2 Phenylendiamin (o) | (OPD) |
| 1-3 Phenylendiamin (m) | (MPD) |

⁽¹⁾ Siehe Norm ISO 5725.

▼B

| Bezeichnung der Substanzen | Symbol |
|-------------------------------------|--------|
| 1-4 Phenylendiamin (p) | (PPD) |
| <i>Toluylendiamine</i> | |
| 3-4 Toluylendiamin (o) | (OTD) |
| 2-4 Toluylendiamin (m) | (MTD) |
| 2-5 Toluylendiamin (p) | (PTD) |
| <i>Diaminophenol</i> | |
| 2-4 Diaminophenol | (DAP) |
| <i>Hydrochinon</i> | |
| 1-4 Dihydroxybenzol | (H) |
| <i>α-Naphthol</i> | |
| | (N) |
| <i>Pyrogallol</i> | |
| 1-2-3 Trihydroxybenzol | (P) |
| <i>Resorcin</i> | |
| 1-3 Dihydroxybenzol | (R) |

2. PRINZIP

Die oxidierenden Farbstoffe werden den cremeförmigen oder flüssigen Färbemitteln bei einem pH-Wert von 10 mit Hilfe von 96 %igem Äthanol entzogen und dünnschichtchromatographisch (eindimensional (5) und/oder zweidimensional (6)) identifiziert.

Zur halbquantitativen Bestimmung der Substanzen vergleicht man das chromatographische Bild der Proben unter Anwendung von vier Entwicklungssystemen mit denjenigen der Lösungen der chromatographisch bestimmten Vergleichserzeugnisse.

3. REAGENZIEN

Es sind ausschließlich analysenreine Reagenzien zu verwenden.

- 3.1. absolutes Äthanol
- 3.2. Aceton
- 3.3. Äthanol 96° (v/v)
- 3.4. 25 %iges Ammoniak
($d_4^{20} = 0,91$)
- 3.5. L(+)-Ascorbinsäure
- 3.6. Chloroform
- 3.7. Cyclohexan
- 3.8. technischer Stickstoff
- 3.9. Toluol
- 3.10. Benzol
- 3.11. primäres Butanol
- 3.12. sekundäres Butanol
- 3.13. 50 %ige unterphosphorige Säure
- 3.14. Diazoreagenzien: hier können verwendet werden
 - 4-Nitro-1-benzoldiazon, versalzen und stabilisiert durch (beispielsweise) Chlorbenzolsulfonat-Ion (rouge 2 JN von Francolor oder ähnliches),
 - 2-Chloro-4nitro-1-benzoldiazon, versalzen und stabilisiert durch (beispielsweise) Naphthalinbenzoat-Ion (NNCD Reagens — Nr. 74150 von Fluka oder ähnliches).

▼B

- 3.15. Silbernitrat
- 3.16. p-Dimethylaminobenzaldehyd
- 3.17. 2-5-Dimethylphenol
- 3.18. Ferrochlorid 6 H₂O
- 3.19. 10 %ige Salzsäure
- 3.20. **Vergleichssubstanzen**
- Als Vergleichssubstanzen dienen die im Abschnitt 1 „Zweck und Anwendungsbereich“ aufgeführten Stoffe.
- Amino-Verbindungen sind ausschließlich als Mono- oder Bi-Chlorhydrate oder in basischer Form zu verwenden.
- 3.21. **Vergleichslösungen (0,5 % m/v)**
- Von jeder der in 3.20 genannten Vergleichssubstanzen wird eine 0,5 %ige (m/v) Lösung hergestellt.
- 50 mg ± 1 mg der Vergleichssubstanz werden in einen 10-ml-Meßkolben eingewogen.
- 5 ml 96 %iges Äthanol hinzugeben (3.3).
- 250 mg Ascorbinsäure hinzugeben (3.5).
- Die Mischung mit Hilfe einer Ammoniaklösung (3.4) auf einen pH-Wert von 10 bringen.
- Mit 96 %igem Äthanol auf 10 ml auffüllen und mischen.
- Die Lösungen können eine Woche lang an einem kühlen, lichtgeschützten Ort aufbewahrt werden.
- Bei der Zugabe der Ascorbinsäure und des Ammoniaks kann sich in bestimmten Fällen ein Niederschlag bilden. In diesem Fall empfiehlt sich vor der Probenahme eine Dekantierung.
- 3.22. **Laufmittel**
- 3.22.1. Aceton - Chloroform - Toluol: 35-25-40 (v/v/v)
- 3.22.2. Chloroform - Cyclohexan - Absolutes Äthanol - 25 %iges Ammoniak: 80-10-10-1 (v/v/v/v)
- 3.22.3. Benzol - Sekundäres Butanol - Wasser: 50-25-25 (v/v/v). Die Mischung gut schütteln und nach Dekantierung bei Raumtemperatur (20—25 °C) die oberste Phase abnehmen.
- 3.22.4. Primäres Butanol - Chloroform und Reagens M: 7-70-23 (v/v/v). Bei 20 bis 25 °C sorgfältig dekantieren und die untere Phase verwenden.
- Vorbereitung des Reagens M*
- | | |
|--|----------|
| 25 %ige NH ₄ OH (v/v) (3.4) | 24 Teile |
| 50 %ige unterphosphorige Säure (3.13) | 1 Teil |
| H ₂ O | 75 Teile |
- Anmerkung* Laufmittel, die Ammoniak enthalten, müssen vor ihrer Verwendung gut geschüttelt werden.
- 3.23. **Nachweismittel**
- 3.23.1. *Diazoreagens*
- Eine 5 %ige wäßrige Lösung (m/v) des Reagens (3.14) herstellen. Diese Lösung muß unmittelbar vor ihrer Verwendung hergestellt werden.
- 3.23.2. *Reagens nach Ehrlich*
- 2 g p-Dimethylaminobenzaldehyd (3.16) in 100 ml 10 %iger wäßriger Salzsäure (m/v) auflösen (3.19).

▼B3.23.3. *2-5-Dimethylphenol-Ferrochlorid 6 H₂O*

Lösung 1: 1 g Dimethylphenol (3.17) in 100 ml 96 %igem Äthanol auflösen (3.3).

Lösung 2: 4 g Ferrochlorid 6 H₂O (3.18) in 100 ml 96 %igem Äthanol auflösen (3.3).

Bei Durchführung des Nachweises die beiden Lösungen einzeln aufsprühen, und zwar zunächst Lösung 1 und dann Lösung 2.

3.23.4. *Ammoniakalisches Silbernitrat*

Einer 5 %igen wäßrigen Lösung (m/v) von Silbernitrat (3.15) 25 %iges Ammoniak (3.4) zusetzen, bis sich der Niederschlag auflöst.

Dieses Reagens ist unmittelbar vor seiner Verwendung herzustellen. Nicht aufbewahren!

4. GERÄTE

4.1. Laboratoriumsausrüstung für Dünnschichtchromatographie

4.1.1. Kunststoff- oder Glasschale, in der die chromatographische Platte während der Absitzung und bis zur Ausentwicklung unter Stickstoff gehalten werden kann. Diese Vorsichtsmaßnahme ist wegen der starken Oxidierbarkeit bestimmter Farbstoffe notwendig.

4.1.2. 10- μ l-Spritze (0,2-l-Einteilung) mit Nadel (gerades Ende) oder vorzugsweise ein automatisches Auftragerät (50 μ l), derart am Stativ befestigt, daß die Platte unter Stickstoff gehalten werden kann.

4.1.3. Kieselgel-Fertigplatten von 0,25 mm Dicke auf Kunststoffilm 20 = 20 cm (Macherey und Nagel Kieselgel G-HR oder ähnliches).

4.2. Zentrifuge 4 000 U/min.

4.3. Zentrifugierröhrchen 10 ml mit Schraubverschluß.

5. ARBEITSWEISE

5.1. **Vorbehandlung der Proben**

Die aus der Tubenöffnung austretenden ersten 2 oder 3 cm Creme werden entfernt.

In ein vorher mit Stickstoff durchspültes Zentrifugierröhrchen (4.3) werden 300 mg Ascorbinsäure, 6 g Creme oder 3 g homogenisierte Flüssigkeit gegeben.

Liegt der pH-Wert unter 10, so werden einige Tropfen des 25 %igen Ammoniaks hinzugefügt und das Zentrifugierröhrchen mit 96 %igem Äthanol (3.3) auf 10 ml aufgefüllt.

Unter Stickstoff homogenisieren, das Röhrchen verschließen und 10 Minuten lang bei 4 000 U/min. zentrifugieren.

Die obenschwimmende Lösung verwenden.

5.2. **Chromatographie**5.2.1. *Auftragen*

Unter Stickstoff auf eine Kieselgelplatte (4.1.3) an neun Punkten 1 μ l von jeder der beschriebenen Vergleichslösungen auftragen. Diese werden wie folgt verteilt:

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

Außerdem werden jeweils am 10. und am 11. Punkt 2 μ l der nach 5.1 vorbehandelten Proben aufgetragen.

Die Platte bis zur chromatographischen Trennung unter Stickstoff aufbewahren.

▼B5.2.2. *Entwicklung*

Die Platte wird in einen vorher mit Stickstoff gereinigten und mit den Dämpfen eines der vier geeigneten Lösungsmittel (3.22) gesättigten Behälter eingehängt und bei Raumtemperatur und Dunkelheit so lange entwickelt, bis sich die Lösungsmittelfront etwa 15 cm vom Startpunkt entfernt hat.

Nunmehr die Platte herausnehmen und unter Stickstoff bei Raumtemperatur trocknen.

5.2.3. *Nachweis*

Die Platte mit einem der in 3.23 genannten vier Nachweismittel besprühen.

5.2.4. *Identitätsprüfung*

Man vergleicht die Rf und die an jeder Probe erhaltenen Färbungen mit denen der Vergleichssubstanzen. In Tabelle I sind die Rf und Färbungen angegeben, wie sie mit den einzelnen Lauf- und Nachweismitteln für jede Probe erzielt wurden.

Läßt die Identitätsprüfung Zweifel aufkommen, so kann zuweilen dadurch Klarheit erzielt werden, daß man der Probe die entsprechende Vergleichssubstanz hinzufügt.

5.2.5. *Halbquantitative Bestimmung*

Man vergleicht visuell die Intensität der Flecken der einzelnen nach 5.2.4 nachgewiesenen Substanzen mit einer geeigneten und bekannten anhand der entsprechenden Vergleichssubstanz gewonnenen Standardkonzentration.

Ist die Konzentration des Bestandteils der Probe zu hoch, so muß die zu chromatographierende Lösung verdünnt und eine neue Bestimmung vorgenommen werden.

TABELLE I
Rf-Werte und unmittelbar nach der Entwicklung erzielte Färbungen

| Vergleichs- zeugnisse 3.20 | Laufmittel | | | | Nachweismittel | | | |
|----------------------------------|------------|--------|--------|--------|--------------------------|----------------------------------|--|----------------------------------|
| | Rf | | | | Färbungen | | | |
| | 3.22.1 | 3.22.2 | 3.22.3 | 3.22.4 | Diazoreagenz (3.23.1) | Reagenz nach Ehrlich (3.23.2) | Dimethylphenol- Reagenz (3.23.3) | Silbernitrat-Reagenz (3.23.4) |
| OPD | 0,62 | 0,60 | 0,30 | 0,57 | schwach braun | — | — | schwach braun |
| MPD | 0,40 | 0,60 | 0,47 | 0,48 | braun-violett*) | gelb | schwach braun | schwach braun |
| PPD | 0,20 | 0,50 | 0,30 | 0,48 | braun | hochrot*) | violett | grau |
| OTD | 0,60 | 0,60 | 0,53 | 0,60 | braun*) | schwach orange | schwach braun | braun-grau |
| MTD | 0,40 | 0,67 | 0,45 | 0,60 | rotbraun*) | gelb | braun | schwarz |
| PTD | 0,33 | 0,65 | 0,37 | 0,70 | braun | orange | violett*) | grau |
| DAP | 0,07 | — | 0 | 0,05 | braun*) | orange | violett | braun |
| H | 0,50 | 0,35 | 0,80 | 0,20 | — | orange | violett | schwarz*) |
| α -N | 0,90 | 0,80 | 0,90 | 0,75 | braun-orange | — | violett*) | schwarz |
| P | 0,37 | — | 0,67 | 0,05 | braun | sehr helles violett | sehr helles braun | braun*) |
| R | 0,50 | 0,37 | 0,80 | 0,17 | orange*) | schwach violett | sehr helles braun | schwach braun |

Anmerkungen: 1. OPD wurde nur schwach sichtbar, für eine deutliche Trennung von OTD muß das Lösungsmittel (3.22.3) verwendet werden.

2. *) zeigt den besten Nachweis an.

▼B**6. ZWEIDIMENSIONALE DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNG**

Zu der hier beschriebenen zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie werden nachstehende Reagenzien gebraucht:

6.1. Vergleichssubstanzen und -lösungen

- 6.1.1. β -Naphthol (β -N)
- 6.1.2. 2-Aminophenol (OAP)
- 6.1.3. 3-Aminophenol (MAP)
- 6.1.4. 4-Aminophenol (PAP)
- 6.1.5. 2-Nitro-p-Phenylendiamin (2 NPPD)
- 6.1.6. 4-Nitro-o-Phenylendiamin (4 NOPD)

Von diesen zusätzlichen Vergleichssubstanzen wird eine 0,5 %ige Lösung (m/v) nach 3.2.1 hergestellt.

6.2. Laufmittel

- 6.2.1. 25 %iges Äthylacetat-Cyclohexan-Ammoniak (65-35-0,50) (v/v/v)

6.3. Nachweismittel

Ein Glasgefäß in einen Entwicklungsbehälter für Dünnschichtchromatographie bringen, etwa 2 g kristallisiertes Jod hineingeben und den Behälter schließen.

6.4. Chromatographie

- 6.4.1. Wie auf Figur 1 angegeben, zwei Linien auf der Adsorptionsschicht einer dünnschichtchromatographischen Platte einzeichnen (4.1.3).
- 6.4.2. Unter Stickstoff (4.1.1) auf den Startpunkt 1 (Figur 1) bis 4 μ l Extrakt (5.1) auftragen. Die Menge hängt von der Intensität der auf dem Chromatogramm (5.2) erhaltenen Flecken ab.
- 6.4.3. Die nachgewiesenen beziehungsweise nach Punkt 5.2 vermeintlich nachgewiesenen oxidierenden Farbstoffe je zur Hälfte auf die Punkte 2 und 3 (Figur 1) auftragen. Der Abstand zwischen diesen Punkten beträgt 1,5 cm. Von sämtlichen Referenzlösungen mit Ausnahme von DAP 2 μ l auftragen, von DAP werden 6 μ l benötigt. Dies muß in Stickstoffatmosphäre geschehen.
- 6.4.4. Den unter 6.4.3 beschriebenen Vorgang bei den Startpunkten 4 und 5 (Figur 1) wiederholen und die Platte bis zur Durchführung der Chromatographie in Stickstoffatmosphäre aufbewahren.
- 6.4.5. Einen Chromatographierbehälter mit Stickstoff durchblasen und eine geeignete Menge Entwicklungslösung (3.22.2) einfüllen. Die Platte (6.4.4) in den Behälter stellen und bei Dunkelheit in der ersten Laufrichtung chromatographieren (Figur 1). Solange chromatographieren bis die Lösungsmittelfront mindestens 13 cm durchlaufen hat.
- 6.4.6. Die Platte aus dem Behälter nehmen und zur Verdampfung der Lösungsmittelreste wenigstens 60 Minuten lang in den mit Stickstoff ausgeblasenen Behälter legen.
- 6.4.7. Mit einem mit Meßskala versehenen Reagenzglas eine geeignete Menge des Laufmittels (6.2.1) in einem mit Stickstoff ausgeblasenen Behälter eingeben, dann die im Verhältnis zur ersten Elutionsrichtung um 90° gedrehte Platte in den Behälter einsetzen und in der zweiten Richtung bei Dunkelheit chromatographieren, bis die Lösungsmittelfront die auf der absorbierenden Schicht markierte Linie erreicht. Die Platte aus dem Behälter nehmen und das Lösungsmittel an der Luft verdampfen lassen.
- 6.4.8. Die Platte 10 Minuten lang in einem Chromatographierbehälter Joddämpfen (6.3) aussetzen und das zweidimensionale Chromatogramm anhand der zur gleichen Zeit chromatographierten Vergleichssubstanzen auswerten (Tabelle II).

Anmerkung

Die intensivste Färbung der Flecken erhält man, wenn man das Chromatogramm eine halbe Stunde lang nach der Entwicklung der Luft aussetzt.

▼B

- 6.4.9. Der Nachweis der nach 6.4.8 gefundenen oxidierenden Farbstoffe läßt sich zweifelsfrei dadurch erbringen, daß man die in 6.4.1 bis 6.4.8 einschließlich beschriebene Behandlung wiederholt, wobei man auf den Startpunkt 1 neben die in 6.4.2 vorgeschriebene Extraktmenge 1 µl der in 6.4.8 nachgewiesenen Vergleichssubstanz aufbringt.

Läßt sich kein anderer Fleck feststellen, so stimmt die Auswertung des ersten Chromatogramms.

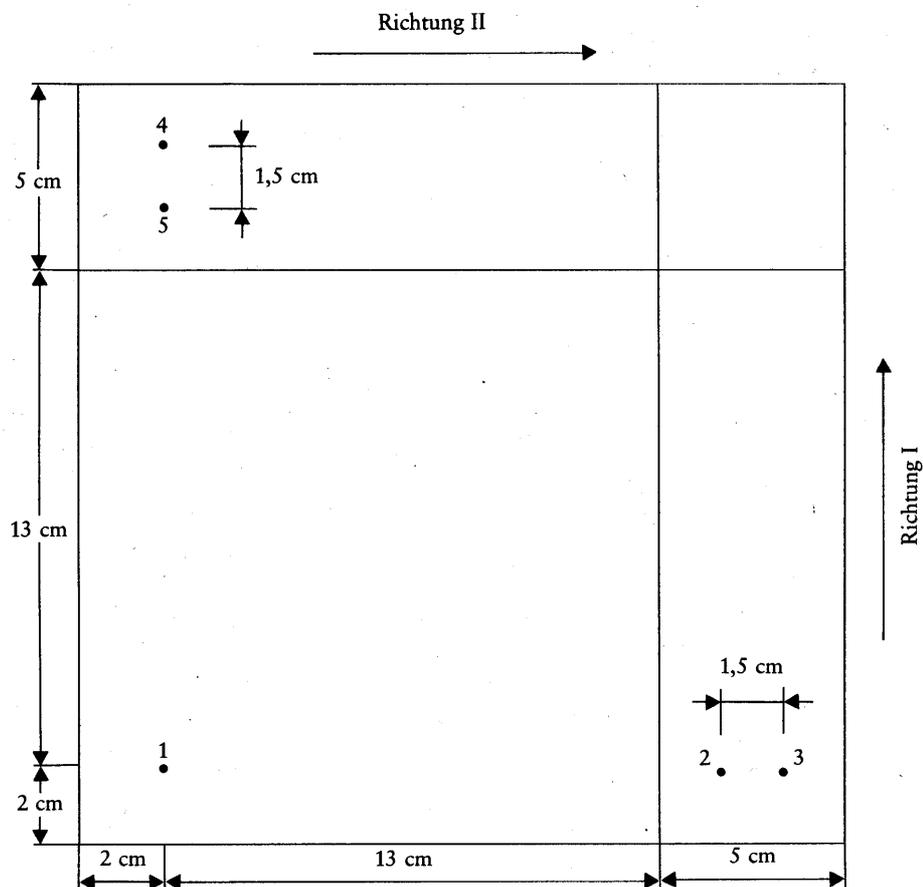
▼B

TABELLE II

Farben der Vergleichssubstanzen nach Chromatographie und Nachweis durch Joddämpfe

| Vergleichssubstanzen | Farbe nach dem Nachweis durch Joddämpfe |
|----------------------|---|
| R | beige |
| P | braun |
| α -N | violett |
| β -N | hellbraun |
| H | braun-violett |
| MPD | gelbbraun |
| PPD | braun-violett |
| MTD | dunkelbraun |
| PTD | gelbbraun |
| DAP | dunkelbraun |
| AOP | orange |
| MAP | gelbbraun |
| PAP | braun-violett |
| 2-NNPD | braun |
| 4-NOPD | orange |

Figur 1



▼B**III. NACHWEIS UND QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON NITRIT****A. NACHWEIS****1. ANWENDUNGSBEREICH**

Die Methode kann zum Nachweis von Nitrit in kosmetischen Erzeugnissen verwendet werden, insbesondere in Cremes, Salben und Zahnpasten.

2. PRINZIP DER METHODE

Nitrit wird durch die Bildung von gefärbten Reaktionsprodukten von 2-Aminobenzaldehyd-phenylhydrazon (Nitrin) nachgewiesen.

3. REAGENZIEN

Es sind analysenreine Reagenzien zu verwenden.

3.1. Verdünnte Schwefelsäure: Verdünne 2 ml konzentrierte Schwefelsäure ($d_4^{20} = 1,84$) mit 11 ml destilliertem Wasser.

3.2. Verdünnte Salzsäure: Verdünne 1 ml konzentrierte Salzsäure ($d_4^{20} = 1,19$) mit 11 ml destilliertem Wasser.

3.3. Methanol

3.4. Lösung von 2-Aminobenzaldehyd phenylhydrazon (Nitrin) in Methanol.
Wiege 2 g Nitrin in einen 100-ml-Meßkolben. Füge tropfenweise 4 ml verdünnte Salzsäure (3.2) hinzu und schüttele. Fülle bis zur Marke mit Methanol auf und mische bis die Lösung völlig klar ist. Die Lösung wird in einer braunen Glasflasche aufbewahrt (4.3).

4. GERÄTE

4.1. Becherglas 50 ml

4.2. 100-ml-Meßkolben

4.3. 125 ml braune Glasflasche

4.4. Glasplatte, 10 × 10 cm

4.5. Kunststoffspatel

4.6. Filtrierpapier, 10 × 10 cm

5. DURCHFÜHRUNG

5.1. Verstreiche einen Teil der zu untersuchenden Probe gleichmäßig auf der Glasplatte, bis zu einer Dicke von nicht mehr als 1 cm.

5.2. Tränke ein Blatt Filterpapier (4.6) in destilliertem Wasser, lege dieses auf die Probe und drücke das Filterpapier mit einem Plastikspatel an (4.5).

5.3. Warte einige Minuten und benetze die Mitte des Filterpapiers:

erst mit 2 Tropfen verdünnter Schwefelsäure (3.1),

dann mit 2 Tropfen von der Nitrinlösung (3.4).

5.4. Nach 5 bis 10 Sekunden entferne das Filtrierpapier und betrachte es gegen Tageslicht. Die Anwesenheit von Nitrit wird durch eine purpurrote Färbung angezeigt.

Bei niedrigen Nitritkonzentrationen verändert sich die purpurrote Farbe nach 5 bis 15 Sekunden in gelb. Wenn hohe Nitritkonzentrationen vorhanden sind, tritt die Farbveränderung erst nach 1 bis 2 Minuten ein.

6. BEMERKUNG

Die Intensität der purpurroten Farbe und die Zeit bis zur Farbveränderung gibt einen Hinweis auf den Nitritgehalt der Probe.

▼B

B. BESTIMMUNG

1. ANWENDUNGSBEREICH

Die Methode beschreibt die Bestimmung von Nitrit in kosmetischen Erzeugnissen.
2. BEGRIFFSBESTIMMUNG

Der Nitritgehalt der Probe, bestimmt nach dieser Methode, wird in % (m/m) Natriumnitrit angegeben.
3. PRINZIP DER METHODE

Die Probe wird mit Wasser verdünnt und geklärt. Das Nitrit wird mit Sulfanilamid und N-1-Naphthyläthylen-Diamin in Reaktion gebracht und die entstehende Färbung bei 538 nm gemessen.
4. REAGENZIEN

Es sind analysenreine Reagenzien zu verwenden.

 - 4.1. Klärlösungen: Diese Lösungen sind wöchentlich frisch herzustellen.
 - 4.1.1. Carrez-I-Reagenz:

106 g Kaliumzyanoferrat (II), $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ in destilliertem Wasser auflösen und auf 1 000 ml verdünnen.
 - 4.1.2. Carrez-II-Reagenz:

219,5 g Zinkacetat, $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ und 30 ml Eisessig in destilliertem Wasser auflösen und auf 1 000 ml verdünnen.
 - 4.2. Natriumnitritlösung:

0,500 g Natriumnitrit in destilliertem Wasser auflösen und auf 1 000 ml verdünnen. Danach 10 ml dieser Stammlösung auf 500 ml verdünnen. 1 ml Lösung = 10 Mikrogramm $NaNO_2$.
 - 4.3. 1 N Natriumhydroxidlösung:

4,0 g NaOH in destilliertem Wasser auflösen und auf 100 ml verdünnen.
 - 4.4. 0,2 %-Sulfanilamid-Hydrochloridlösung:

2,0 g Sulfanilamid in 800 ml Wasser durch Erwärmen auflösen. Abkühlen, 100 ml konzentrierte Salzsäure unter Rühren hinzufügen und auf 1 000 ml verdünnen.
 - 4.5. 5-n-Salzsäure:

445 ml konzentrierte Salzsäure
($d_4^{20} = 1,18$)
mit Wasser auf 1 000 ml verdünnen.
 - 4.6. N-1-Naphthyläthylendiamin-Dihydrochloridreagenz (Naphthylreagenz):

Die Lösung ist täglich frisch herzustellen.
0,1 g N-1-Naphthyläthylendiamin-Dihydrochlorid in Wasser auflösen und auf 100 ml verdünnen.
5. GERÄTE UND HILFSMITTEL
 - 5.1. Analytische Waage
 - 5.2. 100-, 250-, 500- und 1 000-ml-Meßkolben
 - 5.3. Vollpipetten oder Meßpipetten
 - 5.4. 100-ml-Meßzylinder
 - 5.5. Faltenfilter, nitritfrei, Durchmesser 15 cm
 - 5.6. Wasserbad
 - 5.7. Spektrophotometer mit 1-cm-Küvetten

▼B

- 5.8. pH-Meßgerät
 5.9. 10-ml-Mikrobürette
 5.10. 250-ml-Becherglas

6. DURCHFÜHRUNG

- 6.1. Wiege ungefähr 5 g der homogenisierten Probe auf 0,1 mg genau ein. Überführe sie mit heißem destilliertem Wasser quantitativ in einen 250-ml-Kolben und bringe das Volumen auf ungefähr 150 ml mit heißem destilliertem Wasser. Erwärme den Kolben 1/2 Stunde lang in einem Wasserbad von 80 °C. Während dieser Zeit ist gelegentlich umzuschütteln.
- 6.2. Kühle auf Raumtemperatur ab und füge nacheinander unter Umrühren 2 ml Carrez I (4.1.1) und 2 ml Carrez II (4.1.2) zu.
- 6.3. Bringe mit 1-N-Natronlauge (4.3) auf pH 8,3 (pH-Meßgerät benutzen). Überführe den Inhalt quantitativ in einen 250-ml-Meßkolben und fülle zur Marke mit destilliertem Wasser auf.
- 6.4. Vermische den Inhalt und filtriere durch ein Faltenfilter (5.5).
- 6.5. Pipettiere einen angemessenen aliquoten Teil (V ml) des klaren Filtrats, aber nicht mehr als 25 ml, in einen 100-ml-Meßkolben und fülle destilliertes Wasser bis zu einem Volumen von 60 ml hinzu.
- 6.6. Nach dem Durchmischen füge 10 ml Sulfanilamid-Hydrochloridlösung (4.4) und dann 6 ml der 5-n-Salzsäure (4.5) zu. Mische und lasse 5 Minuten stehen. Füge 2 ml des N-1-Naphthyläthylendiaminreagenz (4.6) hinzu, mische und lasse 3 Minuten stehen. Fülle bis zur Marke mit Wasser auf und schüttele durch.
- 6.7. Zur Herstellung einer Blindprobe wiederhole die Operationen nach 6.5 und 6.6 ohne Hinzufügung des N-1-Naphthylreagenz (4.6).
- 6.8. Bestimme (5.7) die Extinktion bei 538 nm, dabei ist der Blindwert nach 6.7 als Vergleich zu verwenden.
- 6.9. Entnehme aus der Eichkurve (6.10) den Natriumnitritgehalt in Mikrogramm pro 100 ml der Lösung (m_1 Mikrogramm), die der nach 6.8 gemessenen Extinktion entspricht.
- 6.10. Unter Verwendung der 10 µg/ml Natriumnitritlösung (4.2) wird eine Eichkurve für die Konzentrationen 0, 20, 40, 60, 80, 100 µg Natriumnitrit pro 100 ml hergestellt.

7. BERECHNUNG

Berechne den Gehalt an Natriumnitrit in % (m/m) nach folgender Formel:

$$\% \text{ NaNO}_2 = \frac{250}{V} \times m_1 \times 10^{-6} \times \frac{100}{m} = \frac{m_1}{V \times m \times 40}$$

Dabei bedeuten

- m = Masse der für die Untersuchung eingesetzten Probemenge in g (6.1),
 m_1 = Natriumnitritgehalt in Mikrogramm, ermittelt nach 6.9,
 V = ml-Filtrat verwendet für die Messung (6.5).

8. WIEDERHOLBARKEIT (1)

Für einen Gehalt von ungefähr 0,2 % m/m Natriumnitrit darf die Differenz zwischen zwei Parallelbestimmungen den absoluten Wert von 0,005 % nicht überschreiten.

(1) Siehe Norm ISO 5725.

▼ M1▼ C2

IV. NACHWEIS UND QUANTITATIVE BESTIMMUNG DES FREIEN FORMALDEHYDS

1. ANWENDUNGSBEREICH

Die Methode umfaßt eine Identifizierung und zwei verschiedene quantitative Methoden, je nachdem ob Formaldehyd abspaltende Stoffe vorhanden sind oder nicht.

Die Methode ist auf alle kosmetischen Mittel anwendbar.

1.1. Nachweis

1.2. Bestimmung der Gesamtmenge durch Kolorimetrie mit Pentan-2,4-Dion (Acetylaceton)

Diese Methode ist anwendbar, wenn Formaldehyd allein oder mit anderen Konservierungsstoffen, die keinen Formaldehyd abspalten, verwendet wird.

Im gegenteiligen Fall und falls das Ergebnis die im Fertigerzeugnis zulässige Höchstkonzentration übersteigt, ist die folgende Methode zur Bestätigung anzuwenden

1.3. Quantitative Bestimmung bei Anwesenheit von Formaldehydabspaltenden Stoffen

Bei der vorstehenden Methode (1.2) werden Formaldehyddonatoren durch die Derivatisierung gespalten und es werden zu hohe Resultate erhalten (freier plus gebundener Formaldehyd).

Der freie Formaldehyd muß durch Flüssigkeitschromatographie getrennt werden.

2. DEFINITION

Der nach dieser Methode bestimmte Gehalt der Probe an freiem Formaldehyd ist in Massenprozent (m/m) anzugeben.

3. NACHWEIS

3.1. Prinzip

Freier und gebundener Formaldehyd ergeben in schwefelsaurem Milieu in Anwesenheit von Schiff's-Reagenz eine rosa oder lila Färbung.

3.2. Reagenzien

Es sind analysenreine Reagenzien zu verwenden, Wasser muß entmineralisiert sein.

3.2.1. Fuchsin.

3.2.2. Natriumsulfithydrat mit 7 H₂O.

3.2.3. Konzentrierte Salzsäure (d = 1,19).

3.2.4. Schwefelsäure, etwa 1 M.

3.2.5. Schiff's-Reagenz

In ein Becherglas 100 mg Fuchsin (3.2.1) einwiegen und in 75 ml auf 80 °C erwärmtem Wasser auflösen. Nach dem Abkühlen 2,5 g Natriumsulfid (3.2.2) und 1,5 ml Salzsäure (3.2.3) hinzugeben, auf 100 ml auffüllen. Die Lösung ist 2 Wochen haltbar.

3.3. Durchführung

3.3.1. In ein 10 ml Becherglas ca. 2 g der Probe einfüllen.

3.3.2. Zwei Tropfen H₂SO₄ (3.2.4) und 2 ml Schiff's-Reagenz (3.2.5) hinzufügen. Das Reagenz muß zum Zeitpunkt der Anwendung absolut farblos sein. Schütteln, 5 Minuten stehenlassen.

3.3.3. Wird nach 5 Minuten eine rosa oder lila Färbung festgestellt, so liegt die enthaltene Formaldehydmenge über 0,01 %.

Der freie und gebundene Formaldehyd ist nach Punkt 4 und, falls nötig, nach Punkt 5 quantitativ zu bestimmen.

▼ **C2**

4. BESTIMMUNG DER GESAMTMENGE DURCH KOLORIMETRIE MIT PENTAN-2,4-DION (ACETYLACETON)

4.1. **Prinzip**

Formaldehyd reagiert mit Pentan-2,4-dion in Anwesenheit von Ammoniumacetat unter Bildung von 3,5-Diacetyl-1,4-Dihydrolutidin. Dieses wird mit 1-Butanol extrahiert und die Absorption bei 410 nm gemessen.

4.2. **Reagenzien**

Es sind analysenreine Reagenzien zu verwenden, Wasser muß entmineralisiert sein.

4.2.1. Ammoniumacetat, wasserfrei.

4.2.2. Konzentrierte Essigsäure,

$$d \frac{20}{4} = 1,05.$$

4.2.3. Frisch unter vermindertem Druck destilliertes Pentan-2,4-dion (Acetylaceton), das bei 410 nm keinerlei Absorption ergeben darf.

4.2.4. 1-Butanol.

4.2.5. Salzsäure, 1 M.

4.2.6. Salzsäure, etwa 0,1 M.

4.2.7. Natriumhydroxidlösung, 1 M.

4.2.8. Stärkelösung, frisch hergestellt nach Ph. Eur. (1 g/50 ml Wasser).

4.2.9. Formaldehyd, 37-40 %ig.

4.2.10. Standard-Jodlösung, 0,05 M.

4.2.11. Standard-Natriumthiosulfatlösung, 0,1 M.

4.2.12. *Acetylaceton-Reagenz*

In einem 1 000-ml-Meßkolben lösen

150 g Ammoniumacetat (4.2.1)

2 ml Acetylaceton (4.2.3)

3 ml Essigsäure (4.2.2)

Mit Wasser auf 1 000 ml auffüllen (pH der Lösung etwa 6,4).

Dieses Reagenz ist stets frisch herzustellen.

4.2.13. Reagenz (4.2.12) ohne Acetylaceton.

4.2.14. *Formaldehyd-Stammlösung*

In einen 1 000-ml-Meßkolben 5 g Formaldehyd (4.2.9) eingeben und mit Wasser auf 1 000 ml auffüllen.

Bestimmung des Gehalts dieser Stammlösung: Hierzu 10,00 ml entnehmen, 25,00 ml Jodlösung (4.2.10) und 10 ml Natriumhydroxidlösung (4.2.7) hinzugeben.

5 Minuten stehenlassen.

Mit 11 ml HCl (4.2.5) ansäuern und das überschüssige Jod mittels Natriumthiosulfatlösung (4.2.11) in Gegenwart von Stärke als Indikator bestimmen.

Der Verbrauch von 1 ml Jodlösung (4.2.10) entspricht 1,5 mg Formaldehyd.

4.2.15. *Formaldehyd-Vergleichslösung*

Aus der Stammlösung (4.2.14) mit Wasser zunächst eine Verdünnung 1:20 und dann hiervon eine Verdünnung 1:100 herstellen.

1 ml dieser Lösung enthält etwa 1 µg Formaldehyd.

Der genaue Gehalt ist zu berechnen.

▼ **C2****4.3. Geräte**

- 4.3.1. Übliches Laborgerät.
- 4.3.2. „Phasentrennungs“-Filter WHATMAN 1 PS (oder gleichwertiges Filter).
- 4.3.3. Zentrifuge.
- 4.3.4. Wasserbad, 60 °C.
- 4.3.5. Spektrophotometer.
- 4.3.6. 1-cm-Glasküvetten.

4.4. Durchführung4.4.1. *Probelösung*

In einen 100-ml-Meßkolben auf 0,001 g genau eine Probemenge (in g), die einer vermuteten Menge von etwa 150 µg Formaldehyd entspricht, einwiegen. Mit Wasser auf 100 ml auffüllen (Lösung S).

(Überprüfen, ob der pH nahe bei 6 liegt, sonst in Salzsäure (4.2.6) verdünnen).

In einen 50-ml-Erlenmeyerkolben mit der Pipette eingeben:

- 10,00 ml der Lösung S,
- 5,00 ml Acetylaceton—Reagenz (4.2.12) und mit Wasser bis zu einem Volumen von 30 ml ergänzen.

4.4.2. *Vergleichslösung*

Die eventuelle Interferenz einer Untergrundfärbung in der Versuchsprobe wird wie folgt eliminiert:

In einen 50-ml-Erlenmeyerkolben eingeben:

- 10,0 ml Lösung S,
- 5,0 ml Reagenz (4.2.13), und mit Wasser auf 30 ml ergänzen.

4.4.3. *Blindlösung*

In einen 50-ml-Erlenmeyerkolben eingeben: 5,00 ml Acetylaceton-Reagenz (4.2.12), und mit Wasser auf 30 ml ergänzen.

4.4.4. *Quantitative Bestimmung*

4.4.4.1. Die nach 4.4.1, 4.4.2 und 4.4.3 hergestellten Mischungen schütteln und genau 10 Minuten lang in ein Wasserbad von 60 °C stellen. Zwei Minuten in einem Kühlbad (Eiswasser) abkühlen lassen.

4.4.4.2. Den Inhalt jeweils in einen 50-ml-Scheidetrichter, der genau 10 ml 1-Butanol (4.2.4) enthält, überführen.

Mit 3-5 ml Wasser nachspülen; die Mischung genau 30 Sekunden kräftig schütteln, dann absetzen lassen.

4.4.4.3. Die Butanol-Phase über „Phasentrennungs“-Filter (4.3.2) in die Meßküvetten filtrieren.

Auch Zentrifugieren (3 000 g, 5 Min. lang) ist möglich.

4.4.4.4. Die Absorption A, des Extrakts der Probelösung nach 4.4.1 gegen den Extrakt der Vergleichslösung nach 4.4.2 bei 410 nm messen.

4.4.4.5. Entsprechend die Absorption A_z des Extrakts der Blindlösung nach 4.4.3 gegen 1-Butanol messen.

Anmerkung: Sämtliche Arbeitsgänge sind innerhalb von 25 Minuten nach dem Einstellen des Erlenmeyerkolbens in das 60 °C-Wasserbad durchzuführen.

4.4.5. *Eichkurve*

4.4.5.1. In einen 50-ml-Erlenmeyerkolben eingeben:

- 5,00 ml der verdünnten Stammlösung (4.2.15),
- 5,00 ml des Acetylaceton-Reagenz (4.2.12), mit Wasser auf 30 ml ergänzen.

▼ **C2**

- 4.4.5.2. Weiter nach (4.4.4) verfahren; die Absorption gegen 1-Butanol (4.2.4) messen.
- 4.4.5.3. Das Verfahren mit 10, 15, 20, 25 ml verdünnter Stammlösung (4.2.15) wiederholen.
- 4.4.5.4. Den Nullwert (entsprechend der Färbung der Reagenzien) wie in 4.4.4.5 bestimmen.
- 4.4.5.5. Die Eichkurve nach Subtraktion des Nullwertes von den Absorptionswerten nach 4.4.5.1 und 4.4.5.3 zeichnen. Das Beersche Gesetz gilt bis 30 µg Formaldehyd.

4.5. **Berechnung**

- 4.5.1. A_2 von A_1 abziehen und aus der Eichkurve (4.4.5.5) die in der Lösung (4.4.1) enthaltene und in µg Formaldehyd ausgedrückte Menge C ablesen.
- 4.5.2. Den Formaldehydgehalt der Probe (Prozent m/m) nach folgender Formel berechnen:

$$\% \text{ HCHO} = \frac{C}{10^3 \cdot m}$$

m = Masse der Probe in g.

4.6. **Wiederholbarkeit** ⁽¹⁾

Bei einem Formaldehydgehalt von 0,2 % darf die Differenz der Ergebnisse von zwei parallel durchgeführten quantitativen Bestimmungen 0,005 % bei der kolorimetrischen Methode mit Acetylaceton nicht überschreiten.

Falls die Ergebnisse der quantitativen Bestimmung des freien Formaldehyds über den in der Richtlinie 76/768/EWG festgelegten Werten liegen, d. h.:

- a) zwischen 0,05 % und 0,2 % bei einem Produkt, bei dem der Formaldehydgehalt nicht auf dem Etikett angegeben ist,
- b) über 0,2 % bei einem Produkt, bei dem der Formaldehydgehalt angegeben bzw. nicht angegeben ist,

muß nach der unter Punkt 5 beschriebenen Methode weiter verfahren werden.

5. QUANTITATIVE BESTIMMUNG BEI ANWESENHEIT VON FORMALDEHYDABSPALTENDEN STOFFEN

5.1. **Prinzip**

Der mittels HPLC getrennte Formaldehyd wird durch on-line-Reaktion in einem Nachsäulenreaktor mit Acetylaceton in das gelbe Lutidinderivat überführt. Das entstandene Derivat wird durch Messung der Absorption bei 420 nm bestimmt.

5.2. **Reagenzien**

Es sind analysenreine Reagenzien zu verwenden, Wasser muß entmineralisiert sein.

- 5.2.1. Wasser, HPLC-Qualität.
- 5.2.2. Ammoniumacetat, wasserfrei.
- 5.2.3. Konzentrierte Essigsäure,

$$d \frac{20}{4} = 1,05.$$

- 5.2.4. Acetylaceton (bei 4 °C aufzubewahren).
- 5.2.5. Dinatriumphosphat, wasserfrei.
- 5.2.6. Orthophosphorsäure, 85 % (d = 1,7).

⁽¹⁾ Siehe ISO-Norm 5725.

▼ **C2**

- 5.2.7. Methanol.
- 5.2.8. Dichlormethan.
- 5.2.9. Formaldehyd, 37 - 40 %ig.
- 5.2.10. Natriumhydroxid, 1 M.
- 5.2.11. Salzsäure, 1 M.
- 5.2.12. Salzsäure, 0,002 M.
- 5.2.13. Stärkelösung, frisch hergestellt nach Ph. Eur.
- 5.2.14. Standard-Jodlösung, 0,05 M.
- 5.2.15. Standard-Natriumthiosulfatlösung, 0,1 M.
- 5.2.16. *Mobile Phase:*
0,006 M Dinatriumphosphat (5.2.5) in wäßriger Lösung, auf pH 2,1 eingestellt mit Orthophosphorsäure (5.2.6).
- 5.2.17. *Nachsäulen-Reagenz*
In einem 1 000-ml-Meßkolben lösen:
— 62,5 g Ammoniumacetat (5.2.2),
— 7,5 ml Essigsäure (5.2.3),
— 5 ml Acetylaceton (5.2.4).
Mit Wasser (5.2.1) auf 1 000 ml auffüllen.
Unter Lichtabschluß aufbewahren.
Haltbarkeit: höchstens 3 Tage bei Zimmertemperatur; die Lösung darf nicht gefärbt sein.
- 5.2.18. *Formaldehyd-Stammlösung*
In einen 1 000-ml-Meßkolben 10 g Formaldehyd (5.2.9) eingeben und mit Wasser auf 1 000 ml auffüllen.
Bestimmung des Gehalts dieser Lösung: hierzu 5,00 ml entnehmen, 25,00 ml Standard-Jodlösung (5.2.14) und 10 ml Natriumhydroxidlösung (5.2.10) hinzugeben.
Fünf Minuten stehenlassen.
Mit 11 ml HCl (5.2.11) ansäuern sowie Stärkelösung (5.2.13) als Indikator hinzugeben und den Überschuß der Jodlösung mittels Standard-Natriumthiosulfatlösung (5.2.15) titrieren.
Der Verbrauch von 1 ml Jodlösung (5.2.14) entspricht 1,5 mg Formaldehyd.
- 5.2.19. *Formaldehyd-Vergleichslösung*
Von der Stammlösung (5.2.18) mit der mobilen Phase (5.2.16) eine Verdünnung $1/100$ herstellen.
1 ml dieser Lösung enthält etwa 37 µg Formaldehyd. Der genaue Gehalt ist zu berechnen.
- 5.3. **Geräte**
- 5.3.1. Übliches Laborgerät.
- 5.3.2. Eine pulsationsfreie HPLC-Pumpe.
- 5.3.3. Eine pulsationsfreie Niederdruckpumpe für das Reagenz (oder eine zweite HPLC-Pumpe, wie unter 5.3.2).
- 5.3.4. Ein Einspritzventil mit 10-µl-Schleife.
- 5.3.5. Nachsäulenreaktor folgender Konstruktion: 1-l-Dreihalskolben
+ 1-l-Kolbenheizgerät,
+ zwei Vigreux-Kolonnen mit mindestens 10 Böden (luftgekühlt),
+ Edelstahlkapillare (für Wärmeaustausch) 1,6 mm - Innendurchmesser 0,23 mm, L = 400 mm,

▼ **C2**

- + Teflonschlauch 1,6 mm - Innendurchmesser 0,30 mm. L = 5 m (siehe „Strickschlauch“, Anlage 1),
- + 1 T-Stück ohne Totvolumen (Valco oder gleichwertiges T-Stück),
- + 3 UNION-Verbindungsstücke ohne Totvolumen.

Es ist auch möglich, ein Nachsäulen-Modul zu benutzen, z. B. Applied Biosystem PCRS 520 mit 1-ml-Reaktor oder gleichwertiges Modul.

- 5.3.6. Membranfilter 0,45 µ.
- 5.3.7. SEP PAK[®]C₁₈-Kartusche (oder gleichwertige Kartusche).
- 5.3.8. *Fertigsäulen:*
- Bischoff hypersil RP 18 (Typ NC Bezugsnummer C 25.46 1805)
(5 µ - L = 250 mm - Innendurchmesser = 4,6 mm),
 - oder Dupont, Zorbax ODS
(5 µ - L = 250 mm - Innendurchmesser = 4,6 mm),
 - oder Phase SEP, sphérisorb ODS 2
(5µ - L = 250 mm - Innendurchmesser = 4,0 mm),
- 5.3.9. *Vorsäule:*
- Bischoff K,hypersil RP 18 (Bezugsnummer K1 G 6301 1805)
5µ - L = 10 mm oder gleichwertige.
- 5.3.10. Säule und Vorsäule sind durch ein ECOTUBE-System (Bezugsnummer A 15020508 Bischoff) oder ein gleichwertiges System zu verbinden.
- 5.3.11. Der Aufbau von 5.3.5 erfolgt nach dem als Anlage 2 beigefügten Schema.
- Die Verbindungsstücke hinter dem Einspritzventil müssen so kurz wie möglich sein.
- In diesem Fall dient die Edelstahlkapillare zwischen Reaktorausgang und Detektoreingang zur Kühlung des Gemisches vor dem Nachweis, und die Temperatur im Detektor ist unbekannt aber konstant.
- 5.3.12. Detektor UV/VIS.
- 5.3.13. Recorder.
- 5.3.14. Zentrifuge.
- 5.3.15. Ultraschall-Bad.
- 5.3.16. Vibrationsmischer (Typ Vortex oder gleichwertiger Vibrationsmischer).

5.4. **Durchführung**5.4.1. *Eichkurve — über Peakhöhenmessung*

Die Standardlösungen werden durch Verdünnung der Formaldehyd-Vergleichslösung (5.2.19) mit der mobilen Phase (5.2.16) hergestellt.

- 1,00 ml der Vergleichslösung (5.2.19) verdünnt auf 20,00 ml (ungefähr 185 µg/100 ml),
- 2,00 ml der Vergleichslösung (5.2.19) verdünnt auf 20,00 ml (ungefähr 370 µg/100 ml),
- 5,00 ml der Vergleichslösung (5.2.19) verdünnt auf 25,00 ml (ungefähr 740 µg/100 ml),
- 5,00 ml der Vergleichslösung (5.2.19) verdünnt auf 20,00 ml (ungefähr 925 µg/100 ml).

Die Standardlösungen sind eine Stunde lang bei Zimmertemperatur aufzubewahren und müssen frisch hergestellt sein.

Die Linearität der Eichkurve gilt für Konzentrationen von 100 bis 1 500 µg/100 ml.

5.4.2. *Herstellung der Proben*

5.4.2.1. Emulsionen (Cremes, Grundierungen, Eyeliner)

In eine 100-ml-Stöpselflasche eine Probemenge m (in g), die einer vermuteten Formaldehydmenge von ungefähr 100 µg entspricht, auf 0,001 g genau einwiegen.

▼ **C2**

20,00 ml Dichlormethan (5.2.8) und 20,00 ml Salzsäure (5.2.12) hinzufügen.

Im Vibrationsmischer (5.3.16) und im Ultraschallbad (5.3.15) vermischen.

Die zwei Phasen durch Zentrifugieren (3 000 g in 2 Min.) trennen.

Eine Kartusche (5.3.7) mit 2 ml Methanol (5.2.7) spülen, dann mit 5 ml Wasser (5.2.1) konditionieren.

4 ml der wäßrigen Phase des Extraktes durch die konditionierte Kartusche geben, die ersten zwei ml verwerfen und die folgende Fraktion auffangen.

5.4.2.2. *Lotionen, Shampoos*

Eine einer vermuteten Formaldehydmenge von ungefähr 500 µg entsprechende Probemenge m (in g) auf 0,001 g genau in eine 100-ml-Stöpselflasche einwiegen.

Mit der mobilen Phase (5.2.16) auf 100 ml auffüllen.

Die Lösung durch ein Membranfilter (5.3.6) filtrieren und durch eine wie in 5.4.2.1 konditionierte Kartusche geben.

Alle Lösungen sind unmittelbar nach der Aufarbeitung einzuspritzen.

5.4.3. *Bedingungen für die Chromatographie*

- Durchsatz der mobilen Phase: 1 ml/min,
- Durchsatz des Reagenz: 0,5 ml/min,
- Gesamtdurchsatz am Detektorausgang: 1,5 ml/min,
- eingeprizte Menge: 10 µl,
- Elutionstemperatur: bei schwierigen Trennvorgängen die Säule in Eiswasser eintauchen:
Temperaturlausgleich abwarten (15-20 Min.),
- Temperatur bei der Nachsäulenreaktion: 100 °C,
- Detektion: 420 nm.

Anmerkung: Das gesamte Chromatographie- und Nachsäulensystem ist nach Gebrauch mit Wasser (5.2.1) zu spülen. Wird das System mehr als zwei Tage nicht benutzt, ist nach dieser Spülung eine Spülung mit Methanol (5.2.7) vorzunehmen. Vor einer erneuten Konditionierung des Systems ist mit Wasser zu spülen, um Rekrystallisierungen zu vermeiden.

5.5. **Berechnung**

Emulsionen: (5.4.2.1)

Formaldehydgehalt in % (m/m)

$$\frac{C \cdot 10^{-6} \cdot 100}{5 \text{ m}} = \frac{C \cdot 10^{-4}}{5 \text{ m}}$$

Lotionen, Shampoos: (5.4.2.2)

Formaldehydgehalt in % (m/m)

$$\frac{C \cdot 10^{-6} \cdot 100}{\text{m}} = \frac{C \cdot 10^{-4}}{\text{m}}$$

m = Masse in g der für die Untersuchung eingesetzten Probemenge,

C = aus der Eichkurve (5.4.1) abgelesener Formaldehydgehalt in µg/100 ml.

5.6. **Wiederholbarkeit**⁽¹⁾

Bei einem Formaldehydgehalt von 0,05 % (m/m) darf der Unterschied zwischen den Ergebnissen von zwei Parallelbestimmungen an der gleichen Probe 0,001 % nicht überschreiten.

⁽¹⁾ Siehe ISO-Norm 5725.

▼ C2

Bei einem Formaldehydgehalt von 0,2 % (m/m) darf der Unterschied zwischen den Endergebnissen von zwei Parallelbestimmungen an der gleichen Probe 0,005 % nicht überschreiten.

▼ B

V. BESTIMMUNG DES RESORCINGEHALTS IN SHAMPOOS UND HAARLOTIONEN

1. ANWENDUNGSBEREICH

Diese Methode beschreibt die gaschromatographische Bestimmung von Resorcin in Shampoos und Haarlotionen. Sie ist für Konzentrationen von 0,1 bis 2,0 Prozent (m/m) im Erzeugnis geeignet.

2. DEFINITION

Der Resorcingehalt in Prozent (m/m) wird durch die Resorcinmenge in der Probelösung definiert, die durch Gaschromatographie unter den festgelegten Bedingungen bestimmt wird.

3. PRINZIP

Resorcin und 3,5-Dihydroxytoluol, das als interner Standard hinzugefügt wurde, werden durch Dünnschichtchromatographie isoliert. Beide Verbindungen werden nach Auskratzen der Dünnschichtplatte mit Methanol extrahiert. Schließlich werden die extrahierten Verbindungen getrocknet, silyliert und durch Gaschromatographie bestimmt.

4. REAGENZIEN

Alle Reagenzien müssen analysenrein sein.

4.1. Salzsäure 25 % (m/m)

4.2. Methanol

4.3. Äthanol 96 % (v/v)

4.4. Kieselgel-Fertigplatten (Kunststoff oder Aluminium) mit fluoreszierendem Indikator und wie folgt entaktiviert: Fertigplatten mit Wasser besprühen, bis sie glänzen. Die besprühten Platten bei Raumtemperatur 1 bis 3 Stunden lang trocknen.

Anmerkung: Wenn die Platten nicht entaktiviert sind, können durch irreversible Adsorption auf Silicium Resorcinverluste auftreten.

4.5. Fließmittel; Azeton-Chloroform-Essigsäure (20-75-5) (v/v/v)

4.6. Resorcin-Standardlösung; 400 mg Resorcin in 100 ml Äthanol 96 % auflösen (1 ml entspricht 4 000 µg Resorcin).

4.7. Interne Standardlösung; 400 mg 3,5-Dihydroxytoluol (DHT) in 100 ml Äthanol 96 % (1 ml entspricht 4 000 µg DHT) lösen.

4.8. Standardmischung; 10 ml der Lösung 4.6 und 10 ml der Lösung 4.7 in einem 100-ml-Meßkolben mischen, bis zur Markierung mit Äthanol 96 % auffüllen und mischen (1 ml entspricht 400 µg Resorcin und 400 µg DHT).

4.9. Silylierungsmittel:

4.9.1. N, 0-bis-(Trimethylsilyl)-Trifluoracetamid (BSTFA)

4.9.2. Hexamethyldisilazan (HMDS)

4.9.3. Trimethylchlorsilan (TMCS)

5. GERÄTE

5.1. Übliche Laborgeräte sowie Dünnschicht- und Gaschromatographieausrüstung

5.2. Laborglas

6. DURCHFÜHRUNG

6.1. Vorbereitung der Probe

6.1.1. Eine Prüfmenge (m Gramm) des Produkts, das etwa 20 bis 50 mg Resorcin enthält, genau in einen 150-ml-Becher einwiegen.

▼ **B**

- 6.1.2. Mit Salzsäure (4.1) ansäuern, bis die Mischung sauer ist (ca. 2 bis 4 ml sind notwendig), 10 ml (40 mg DHT) der internen Standardlösung (4.7) hinzufügen und vermischen. In einen 100-ml-Meßkolben mit Äthanol (4.3) geben, mit Äthanol bis zur Markierung auffüllen und vermischen.
- 6.1.3. 250 µl der Lösung 6.1.2 als kontinuierliche Linie von etwa 8 cm Länge auf eine entaktivierte Silicafolie (4.4) auftragen.
Darauf achten, ein möglichst schmales Band zu erhalten.
- 6.1.4. 250 µl der Standardmischung (4.8) in gleicher Weise (6.1.3) auf die gleiche Platte auftragen.
- 6.1.5. An zwei Punkten der Startlinie 5 µl von jeder der Lösungen 4.6 und 4.7 auftüpfeln, um die Lokalisierung nach der Plattenentwicklung zu erleichtern.
- 6.1.6. Die Platte in einem nicht gesättigten Tank mit der Entwicklungslösung 4.5 entwickeln, bis das Lösungsmittel eine Linie 12 cm von der Startlinie entfernt erreicht hat; dies dauert im allgemeinen ca. 45 Minuten. Die Platte an der Luft trocknen und die Resorcin/DHT-Zone unter Kurzwellen-UV-Licht (254 nm) lokalisieren. Beide Verbindungen haben ungefähr die gleichen R_f -Werte. Die Bänder mit einem Bleistift in einem Abstand von 2 mm von der äußeren dunklen Grenzlinie der Bänder markieren. Diese markierte Zone mit der Schere abschneiden und das Adsorptionsmittel durch sorgfältiges Abschaben isolieren. Das Adsorptionsmittel der Bänder jeweils in eine kleine 10-ml-Flasche aufnehmen.
- 6.1.7. Das die Probe enthaltende Adsorptionsmittel und das die Standardmischung enthaltende Adsorptionsmittel jeweils wie folgt extrahieren: 2 ml Methanol (4.2) hinzufügen und eine Stunde lang unter ständigem Rühren mit einem magnetischen Rührstab extrahieren. Die Mischung filtrieren und die Extraktion weitere 15 Minuten lang mit 2 ml Methanol wiederholen.
- 6.1.8. Das Lösungsmittel der kombinierten Extrakte durch Trocknen über Nacht in einem mit einem geeigneten Trockenmedium gefüllten Vakuum-Exsikkator verdunsten lassen, keine Hitze anwenden.
- 6.1.9. Die Rückstände (6.1.8) entweder nach 6.1.9.1 oder 6.1.9.2 silylieren.
- 6.1.9.1. 200 µl BSTFA (4.9.1) mit einer Mikrospritze hinzufügen und die Mischung in einem geschlossenen Gefäß 12 Stunden bei Raumtemperatur ruhen lassen.
- 6.1.9.2. Nacheinander 200 µl HMDS (4.9.2) und 100 µl TMCS (4.9.3) mit einer Mikrospritze zum Rückstand (6.1.8) hinzufügen und die Mischung 30 Minuten lang bei 60 °C in einem geschlossenen Gefäß erhitzen. Die Mischung kühlen.

6.2. **Gaschromatographie**6.2.1. *Bedingungen für die Gaschromatographie*

Die Säule muß eine Auflösung R besser 1,5 zeigen

$$R = \frac{2 d^1 (r_2 - r_1)}{W_1 + W_2}$$

- r_1 und r_2 = Retentionszeiten von 2 Peaks in Minuten,
 W_1 und W_2 = Breite derselben Peaks bei halber Peakhöhe,
 d^1 = Papiervorschub in mm/Min.

Die nachstehend beschriebene Säule und gaschromatographischen Bedingungen haben sich als geeignet erwiesen:

| | |
|----------------------|--|
| Säule: | rostfreier Stahl |
| Länge: | 200 cm |
| innerer Durchmesser: | 8E443 mm (1/8") |
| Füllung: | 10 % OV 17 auf Chromosorb WAW 100-200 mesh |

Flammenionisationsdetektor

▼B

Temperaturen:

Säule: 185 °C (isotherm)

Detektor: 250 °C

Injektor: 250 °C

Trägergas: Stickstoff

Strömungsgeschwindigkeit: 45 ml/min.

Die Strömungsbedingungen für Wasserstoff und Luft sind entsprechend den Gerätebeschreibungen einzustellen.

- 6.2.2. 3 µl der Lösungen gemäß 6.1.9 in den Gaschromatographen einspritzen. Für jede Lösung (6.1.9) fünf Einspritzungen, die Peakflächen genau messen, den Mittelwert bilden und das Peakflächenverhältnis berechnen: $S = \text{Peakfläche Resorcin} / \text{Peakfläche DHT}$.

7. BERECHNUNG

Die in Massenprozent ausgedrückte (% m/m) Resorcinkonzentration ergibt sich wie folgt:

$$\% \text{ (m/m) Resorcin} = \frac{4}{M} \times \frac{S - \text{Probe}}{S - \text{Standardmischung}}$$

Dabei sind:

M = Prüfmenge in Gramm (6.1.1),

S-Probe = das durchschnittliche Peakflächenverhältnis gemäß 6.2.2 für die Probelösung,

S-Standardmischung = das durchschnittliche Peakflächenverhältnis gemäß 6.2.2 für die Standardmischung.

8. WIEDERHOLBARKEIT (1)

Für einen Resorcingehalt von 0,5 % darf der Unterschied zwischen Doppelbestimmungen 0,025 % nicht überschreiten.

VI. BESTIMMUNG VON METHANOL IM VERHÄLTNIS ZU ÄTHANOL ODER PROPANOL-2

1. ANWENDUNGSBEREICH

Diese Methode beschreibt die gaschromatographische Bestimmung von Methanol in allen kosmetischen Mitteln (einschließlich Aerosolen).

Es können relative Mengen von 0 bis 10 % bestimmt werden.

2. DEFINITION

Der Gehalt an Methanol, der mit dieser Methode bestimmt wird, ist in % (M/M) Methanol, bezogen auf Äthanol oder Propanol-2 anzugeben.

3. PRINZIP

Die Bestimmung wird mit Gaschromatographie durchgeführt.

4. REAGENZIEN

Es sind analysenreine Reagenzien zu verwenden.

4.1. Methanol

4.2. Äthanol absolutum

4.3. Propanol-2

4.4. Chloroform, durch Waschen mit Wasser von Alkoholen befreit

(1) Siehe Norm ISO 5725.

▼B

5. GERÄTE
- 5.1. Gaschromatograph mit Katharometer-Detektor (für Aerosol-Proben)
Gaschromatograph mit Flammen-Ionisationsdetektor (für Nicht-Aerosol-Proben)
- 5.2. Meßkolben 100 ml
- 5.3. Pipetten 2 ml, 20 ml, 0 bis 1,0 ml
- 5.4. Injektionsspritzen 0 bis 100 µl und 0 bis 5 µl (nur für Aerosol-Proben):
gasdichte Spezial-Kolbenspritze

6. DURCHFÜHRUNG

6.1. Vorbereitung der Proben

- 6.1.1. Aerosolprodukte werden gemäß Kapitel II des Anhangs der Richtlinie der Kommission 80/1335/EWG vom 22. Dezember 1980⁽¹⁾ behandelt und anschließend gaschromatographisch nach 6.2.1 bestimmt.
- 6.1.2. Die gemäß vorstehendem Kapitel II behandelten Nicht-Aerosolprodukte werden mit Wasser auf einen Gehalt von 1 bis 2 % Äthanol oder Propanol-2 verdünnt und dann gaschromatographisch gemäß den Bedingungen von 6.2.2 bestimmt.

6.2. Gaschromatographie

- 6.2.1. Für Aerosolproben ist der Katharometer-Detektor zu verwenden.
 - 6.2.1.1. Als Säulenfüllung ist 10 % Hallcomid M 18 auf Chromosorb W AW 100—120 mesh zu verwenden.
 - 6.2.1.2. Die Auflösung R muß gleich oder besser als 1,5 sein.

$$R = 2 \frac{d'r_2 - d'r_1}{W_1 + W_2}$$

- r_1 und r_2 = Retentionszeit von 2 Peaks in Minuten,
 W_1 und W_2 = Breite derselben Peaks bei halber Peakhöhe,
 d' = Papiervorschub in mm/min.

- 6.2.1.3. Die Auflösung kann beispielsweise unter folgenden Bedingungen erzielt werden:

| | |
|--------------------|------------------|
| Säulenmaterial: | rostfreier Stahl |
| Säulenlänge: | 3,5 m |
| Säulendurchmesser: | 3 mm |
| Katharometerstrom: | 150 mA |
| Trägergas: | Helium |
| Druck: | 2,5 bar |
| Strömung: | 45 ml/Min |
| Temperatur | |
| Injektor: | 150 °C |
| Detektor: | 150 °C |
| Säulenraum: | 65 °C |

- 6.2.2. Für andere als Aerosolproben ist der Flammenionisationsdetektor zu verwenden.
 - 6.2.2.1. Als Säulenfüllung ist Chromosorb 105 auf Porapak QS zu verwenden.
 - 6.2.2.2. Die Auflösung R muß gleich oder besser als 1,5 sein.

(¹) ABl. Nr. L 383 vom 31. 12. 1980, S. 27.

▼B

$$R = 2 \frac{d'r_2 - d'r_1}{W_1 - W_2}$$

- r_1 und r_2 = Retentionszeit von 2 Peaks in Minuten,
 W_1 und W_2 = Breite derselben Peaks bei halber Peakhöhe,
 d' = Papiervorschub in mm/min.

6.2.2.3. Die Auflösung kann beispielsweise unter folgenden Bedingungen erzielt werden:

| | |
|------------------------------|-----------------------|
| Säulenmaterial: | rostfreier Stahl |
| Säulenlänge: | 2 m |
| Säulendurchmesser: | 3 mm |
| Elektrometerempfindlichkeit: | 8×10^{-10} A |
| Trägergas: | Stickstoff |
| Druck: | 2,1 bar |
| Strömung: | 40 ml/min |
| Brenngas: | Wasserstoff |
| Druck: | 1,5 bar |
| Strömung: | 20 ml/min |
| Temperatur | |
| Injektor: | 150 °C |
| Detektor: | 230 °C |
| Ofenraum: | 120—130 °C |

7. EICHDIAGRAMM

7.1. Für die gaschromatographischen Bedingungen nach 6.2.1 (Hallcomid-M-18-Säule) sind folgende Standardmischungen zu verwenden. Diese Mischungen sind durch Messungen mit Pipetten herzustellen. Die genaue Menge wird durch sofortiges Wiegen nach jedem Zusatz festgestellt.

| Relative Konzentration % | Methanol ml | Äthanol ml (oder Propanol- 2) | Zusatz von Chloroform bis zu einem Volumen von |
|-----------------------------|----------------|---|--|
| 2,5 % ungefähr | 0,5 | 20 | 100 ml |
| 5,0 % ungefähr | 1,0 | 20 | 100 ml |
| 7,5 % ungefähr | 1,5 | 20 | 100 ml |
| 10,0 % ungefähr | 2,0 | 20 | 100 ml |

2 bis 3 µl n GC injizieren gemäß Bedingungen nach 6.2.1. Berechne das Peakflächenverhältnis (Methanol/Äthanol) oder (Methanol/Propanol-2) jeder Mischung und trage es in das Eichdiagramm ein.

X-Achse: % Methanol im Verhältnis zu Äthanol oder Propanol-2;

Y-Achse: Peakflächenverhältnis (Methanol/Äthanol) oder (Methanol/Propanol-2).

7.2. Für die GC-Bedingungen nach 6.2.2 (Porapak QS oder Chromosorb 105) sind folgende Standardmischungen zu verwenden. Diese Mischungen sind durch Messung mit einer Injektionsspritze und Pipette herzustellen. Die genaue Menge wird durch sofortiges Wiegen nach jedem Zusatz eingestellt.

▼B

| Relative Konzentration % | Methanol µl | Äthanol ml (oder Propanol- 2) | Zusatz von Wasser bis zu einem Volumen von |
|-----------------------------|----------------|---|---|
| 2,5 % ungefähr | 50 | 2 | 100 ml |
| 5,0 % ungefähr | 100 | 2 | 100 ml |
| 7,5 % ungefähr | 150 | 2 | 100 ml |
| 10,0 % ungefähr | 200 | 2 | 100 ml |

2 bis 3 µl gemäß Bedingungen nach 6.2.2 injizieren. Peakflächenverhältnis (Methanol/Äthanol) oder (Methanol/Propanol-2) jeder Mischung berechnen. In Eichdiagramm eintragen:

X-Achse: % Methanol im Verhältnis zu Äthanol oder Propanol-2;

Y-Achse: Peakflächenverhältnis (Methanol/Äthanol) oder (Methanol/Propanol-2).

7.3. Die Eichkurve muß eine Gerade sein.

8. WIEDERHOLBARKEIT ⁽¹⁾

Bei einem Gehalt an Methanol oder Propanol-2 von 5 % bezogen auf Äthanol darf der Unterschied zwischen Doppelbestimmungen 0,25 % nicht überschreiten.

⁽¹⁾ Siehe Norm ISO 5725.

▼ M1
▼ C2

Anlage 1

ANFERTIGUNG DES „STRICKSCHLAUCHES“

(Prinzip: Strick-Liesel)

ZUBEHÖR FÜR DIE HERSTELLUNG DES „STRICKSCHLAUCHES“

- 1 Holzspule:
Außendurchmesser: 5 cm, in der Mitte wird ein 1,5 cm großes Loch gebohrt. Vier Stahlnägel werden in gleichmäßigen Abständen angebracht (siehe Schema der Spule Abbildung 1 und Abbildung 2). Abstand zwischen zwei Spitzen: 1,8 cm; Abstand vom Mittelloch: 0,5 cm,
- 1 feste Nadel (Typ Häkelnadel) zur Herstellung der Schlaufen aus dem Teflon-Schlauch,
- Teflon-Schlauch 1,6 mm — Innendurchmesser 0,3 mm — Länge: 5 Meter.

HERSTELLUNG DES „STRICKSCHLAUCHES“

Zu Beginn wird der Teflon-Schlauch von oben nach unten in das Mittelloch der Spule geführt (dabei ca. 10 cm des Rohres auf der unteren Seite heraushängen lassen, so daß sich die Kordel während der Herstellung leicht nach unten ziehen läßt), dann für die erste Runde den Schlauch um jeden der vier Nägel wickeln (siehe Abbildung 3).

Am Eingang und am Ausgang des Gerätes werden Zwingen und Kompressions-schrauben angebracht, es ist darauf zu achten, daß das Teflon beim Umwickeln nicht beschädigt wird.

Ab der zweiten Reihe wird der Schlauch außen um jeden Nagel gelegt und dann wie folgt eine Schlaufe gebildet:

Mit Hilfe der festen Nadel (siehe Abbildung 4) den Schlauch der unteren Reihe über den Schlauch der oberen Reihe heben.

Dieser Vorgang ist an jedem der Nägel unter Einhaltung der Reihenfolge 1 — 2 — 3 — 4 bis zum Verstricken des 5 m Teflon-Schlauches bzw. bis zur gewünschten Länge zu wiederholen.

Etwa 10 cm des Schlauches werden zum Abschluß der Kordel benötigt. Den Schlauch durch jede der 4 Schlaufen führen und zum Abschluß der Kordel leicht zusammenziehen.

NB: Fertig-„Strickschläuche“ für Nachsäulenreaktionen sind im Handel erhältlich (Supelco).

Schema der Spule

▼C2

Abbildung 1

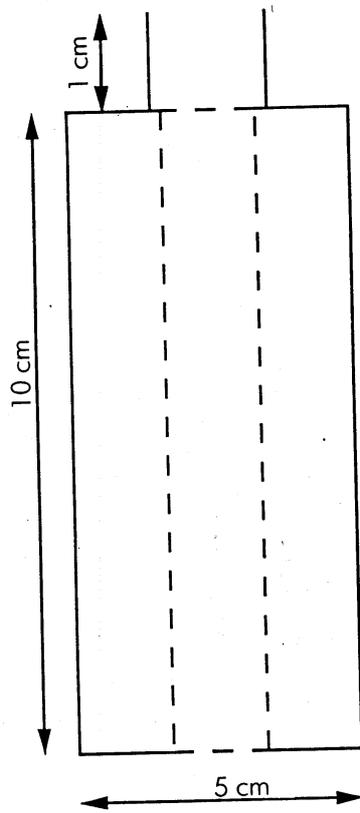
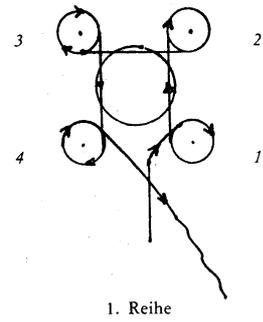
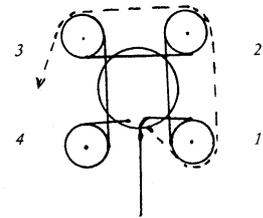


Abbildung 3



1. Reihe

Abbildung 4



2. Reihe

Für die Schlaufe den unteren Schlauch (durchgezogene Linie) über den oberen Schlauch (gestrichelte Linie) heben.

Abbildung 2

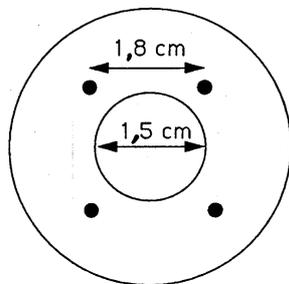
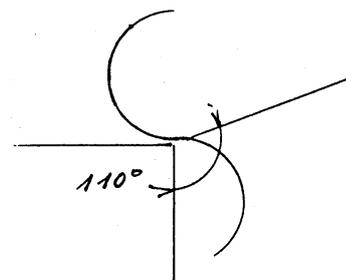


Abbildung 5



▼ C2

Anlage 2

- 1 = HPLC-Pumpe (5.3.2)
- 2 = Einspritzventil (5.3.4)
- 3 = Säule mit Vorsäule
- 4 = Reagenz-Pumpe (5.3.3)
- 5 = T-Stück ohne Totvolumen
- 5' = T-Stück (Vortex)
- 6-6' = Union-Verbindungsstück ohne Totvolumen
- 7 = Strickschlauch
- 7' = Reaktor
- 8 = Dreihalskolben mit siedendem Wasser
- 9 = Kolbenheizgerät
- 10 = Kühler
- 11 = Edelstahlkapillare — Wärmeaustauscher
- 11' = Wärmeaustauscher
- 12 = Detektor UV/VIS
- 13 = Nachsäulen-Modul PCRS 520

