

CHROM. 8101

QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON EOSIN IN KOSMETIKA

HELLMUT JORK, GÜNTER LEHMANN und UTA RECKTENWALD

Fachrichtung 15.4 im Fachbereich Analytische und Biologische Chemie der Universität des Saarlandes, 66 Saarbrücken 11 (B.R.D.)

(Eingegangen am 21. November 1974)

SUMMARY

Determination of eosin in cosmetics

A method is described for the enrichment, isolation and quantitative determination of eosin (2',4',5',7'-tetrabromofluorescein) in cosmetics. After separation of the dye from the substrate and enrichment by adsorption on polyamide powder, it was eluted and the eluate was subjected to thin-layer chromatography. Quantitative determination was carried out by fluorometric measurements *in situ*. In the nanogram range (1-5 ng) a reproducibility with a standard deviation of $\pm 2.5\%$ was attained. The detection limit was found to be nearly 10 pg.

EINLEITUNG

Solange Farbstoffe zum Färben von Lebensmitteln und Kosmetika gesetzlich zugelassen sind, wird nicht nur routinemässig die Identität der zugesetzten Färbemittel festgestellt, sondern auch die angewandte Menge bestimmt¹. Darüber hinaus fordert die Farbstoffverordnung, dass sogenannte "Nebenfarbstoffe", die dem Originalfärbemittel aus fabrikationstechnischen Gründen anhaften, nur bis zu einer bestimmten Höchstmenge anwesend sein dürfen². Dies gilt insbesondere für die nur schwierig einheitlich herstellbaren Fluoreszeinderivate, zu denen auch das Eosin gehört. Zu ihrer Erfassung waren bisher zeitraubende und verlustreiche Arbeitsgänge notwendig³⁻⁵. Es wurden darum Verfahren entwickelt, die schneller zum Ziel führen, mit weniger Fehlern behaftet sind und darüber hinaus sehr empfindlich arbeiten⁶⁻¹⁰. Eines dieser Verfahren wird nachfolgend für das Eosin beschrieben.

PRINZIP DER METHODE

Um Lebensmittel oder Bedarfsgegenstände zu färben, sind häufig nur geringe Konzentrationen eines Farbstoffes erforderlich. Zu seiner quantitativen Bestimmung muss also eine gezielte Anreicherung vorangehen. Die Aufbereitung der Probe richtet sich nach der Zusammensetzung des Untersuchungsgutes und der Art des Farbstoffes. Phenolische Substanzen lassen sich z.B. gut über Polyamidpulver oder Cellulose-Ionenaustauscher isolieren¹¹. Nach der Desorption von der stationären Phase und

der dünnschichtchromatographischen (DC) Abtrennung der noch vorhandenen Begleitstoffe erfolgt die direkte quantitative Auswertung der Chromatogramme auf fluorimetrischem Wege. Diese Bestimmungsmöglichkeit bietet u.a. folgende Vorteile:

Fluoreszenzmessungen sind 100–1000mal empfindlicher als Absorptionsmessungen. Es reichen also Nanogramm-Mengen zur Bestimmung aus, so dass es bei der Chromatographie zu keiner Überladung der stationären Phase kommt.

Der gesetzmässige Zusammenhang zwischen der Emissionsintensität und der chromatographierten Substanzmenge ist leicht überschaubar. Bei kleinen Konzentrationen resultieren Eichgeraden, die durch den Koordinatenursprung verlaufen.

Fluoreszenzmessungen sind häufig selektiver anwendbar als Absorptionsmessungen.

Die Form der Chromatogrammzonen und ihre Grösse haben im Gegensatz zu direkten Absorptionsmessungen praktisch keinen Einfluss auf das Messergebnis.

Durch diese Vorzüge stellt die fluorimetrische *in-situ*-Messung speziell bei komplexen Untersuchungsaufgaben die Methode der Wahl dar. Die nachfolgende Vorschrift wurde an verschiedenen Lippenstiftsortimenten (z.B. Arden, Avon, Höppner) geprüft und kann auf andere Kosmetika sinngemäss übertragen werden.

VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

1. Herstellung einer Polyamidfiltersäule

Zur Abtrennung des Eosins von einem Überschuss an Begleitsubstanzen wird die Abtropfkapillare eines 15 bis 20 cm langen Perkulationsrohres (innerer Durchmesser = 17 mm) mit Glaswatte abgedichtet und mit 200 mg Polyamidpulver zur Säulenchromatographie gleichmässig überschichtet. Nach vorsichtigem Aufgeben von 10 g eines Polyamid-Seesandgemisches (1:5) wird zur Entfernung des "Feinstkorns" aus dem Polyamidpulver unter vermindertem Druck mit 20 ml Aqua dest. und anschliessend mit 20 ml Methanol p.a. gewaschen, bevor die Untersuchungslösung portionsweise aufgegeben wird.

2. Herstellung der Untersuchungslösung

In einem 50 ml Becherglas werden je nach Gehalt des Farbstoffes 100–400 mg Lippenstift unter leichtem Erwärmen in 10 ml Dimethylformamid gelöst. Nach quantitativem Überführen in einen Scheidetrichter wird diese Lösung zur Entfernung der Fettsubstanzen zweimal mit je 15 ml Petroläther (Siedebereich 40–60°) ausgeschüttelt. Die rotgefärbte Dimethylformamidphase wird mit 10 ml Aqua dest. versetzt und vorsichtig auf die vorbereitete Polyamidsäule gegeben. Zur Elution des Eosins dienen 25 ml ammoniakalischen Methanols (5 ml 25% NH₃-Lösung/100 ml Methanol)¹¹. Das Eluat wird in einem 100.0 ml Messkolben aufgefangen und mit Methanol p.a. bis zur Eichmarke aufgefüllt. Auf die zuvor markierten Startzonen der DC-Platte werden mit Mikrocaps* 1.0 µl Untersuchungslösung aufgetragen.

3. Herstellung der Vergleichslösung

25.0 mg aufgereinigtes Eosin (vgl. Abschnitt 4) werden in 500.0 ml Methanol

* Fa. Drummond Scientifics, Auslieferung B.R.D. durch Fa. Shandon, Karl von Drais-Str. 18, 6 Frankfurt/M 50, B.R.D.

p.a. gelöst. Von dieser gut durchgemischten Stammlösung werden jeweils 1.0, 2.0, 3.0 und 5.0 ml mit Methanol p.a. auf 50.0 ml weiter verdünnt. Von diesen Vergleichslösungen werden je 1 μ l mit Mikrocaps auf die zuvor markierten Startzonen der DC-Platte aufgetragen.

4. Reinigung des handelsüblichen Eosins

100 mg Eosin werden in 2–3 ml Methanol gelöst und vorsichtig auf eine Polyamidsäule gegeben, die folgendermassen hergestellt war: Ein 50 cm langer und 3 cm weiter Kunststoffschlauch für Trockensäulenchromatographie* wird an einem Ende abgebunden und 3 cm hoch mit Seesand gefüllt. In diesem unteren Bereich wird die Folie mit acht bis zehn Nadelstichen durchlöchert, so dass beim Einfüllen einer Suspension von 30 g Polyamidpulver in 100 ml Methanol die flüssige Phase abtropfen kann. Nach dem Absetzen des Polyamids wird die Säule mit einer 1 cm hohen Seesandschicht abgedeckt. Am schnellsten wandert Monobromfluoreszein, gefolgt von Di- und Tribromfluoreszein. Sobald die Abtrennung dieser Fraktionen vom Tetrabromfluoreszein hinreichend gut ist, lässt man das Fliessmittel abtropfen, schneidet die Hauptzone des Eosins aus der Säule heraus und suspendiert sie in der angegebenen ammoniakalischen Methanollösung. Nach kurzer Extraktionszeit wird der Ansatz filtriert und das Filtrat bei vermindertem Druck bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird im Vakuumexsikkator über konz. Schwefelsäure getrocknet und zur Herstellung der Vergleichslösung eingesetzt.

5. Chromatographische Bedingungen

Es wurde eine aufsteigende, eindimensionale Entwicklung bei Kammersättigung durchgeführt. Das Schichtmaterial bestand aus Kieselgel-Fertigplatten*. Als Fliessmittel wurde Essigsäureäthylester–Methanol–Ammoniaklösung, 25% (50:20:10) verwendet. Die Laufstrecke war 12 cm und die Laufzeit etwa 60 min. Der qualitative Nachweis fand statt unter UV₃₆₆-Licht.

6. Spektralfluorimetrische Messung

Zur Auswertung der fließmittelfreien Chromatogramme dient das Zeiss Chromatogramm-Spektralphotometer Messanordnung, M-Pr; Lampe, Wolfram-Glühlampe; Spalteinstellung, 0.8 \times 14 mm; Anregungswellenlänge, $\lambda = 520$ nm; Filter vor SEV, Fl 56, Schreiber, 5 mV.

DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Zur quantitativen Bestimmung des Eosins in Kosmetika wurden bisher zumeist Verfahren eingesetzt, bei denen die Messung des Farbstoffes erst nach seiner chromatographischen Abtrennung aus dem Untersuchungsgut und anschliessender Extraktion aus der stationären Phase in entsprechend eingestellten Lösungen erfolgen konnte. Bei solchen Bestimmungsmethoden sind mehr Arbeitsschritte notwendig als bei der vorliegenden *in-situ*-Messung und insofern mehr Fehlermöglichkeiten gegeben. Darüber hinaus ist die Empfindlichkeit der Lösungsphotometrie geringer als die der Direktauswertung. So konnten bei *in-situ*-Messungen ohne Schwierigkeiten einige

* Fa. ICN Pharmaceuticals, 3340 Eschwege, B.R.D.

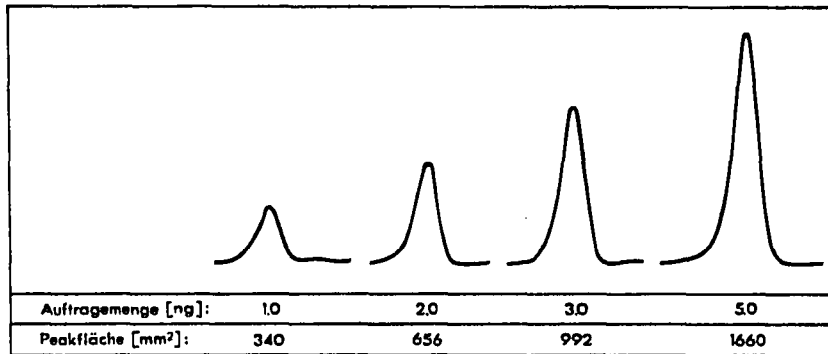


Fig. 1. Registrierung der ortsabhängigen Fluoreszenz beim Eosin und Angabe der Peakgröße in mm^2 . M-Pr; $\lambda_A = 520 \text{ nm}$; Filter, F1 56; Spalt, $0,8 \times 14 \text{ mm}$; Schreiber, 5 mV.

Nanogramm Eosin quantitativ erfasst werden (Fig. 1). Günstig wirkt sich hierbei die gewählte Messanordnung des Chromatogramm-Spektralphotometers aus. Die Strahlenbelastung der Substanz ist bei der angegebenen Geräteanordnung am geringsten. Durch den Einsatz des Flankenfilters F1 56 kann die Emissionsstrahlung oberhalb von $\lambda = 560 \text{ nm}$ vom Photomultiplier aufgenommen werden. Es erfolgt keine spektrale Zerlegung der Messstrahlung, so dass optimale energetische Verhältnisse vorliegen. Durch die Wahl der Anregungswellenlänge von $\lambda = 520 \text{ nm}$ (=Wolfram-Glühlampe) werden die in der stationären Phase vorhandenen blaufluoreszierenden Staub- und/oder Textilflusen nicht zur Emission angeregt und stören somit die Bestimmung nicht. Die Reproduzierbarkeit der Messung entspricht den Angaben der Tabelle I. Dabei wurden die registrierten Peakflächen aus dem Produkt "Höhe \times Halbwertsbreite" errechnet. Beim Ablesen der Strecken an einem Lineal resultieren selbst bei Halbwertsbreiten von 50 mm zufällige Fehler von etwa 1%. Das bedeutet, auf die Werte der Tabelle I bezogen, dass die zufälligen Fehler der Messeinheit (=photometrische Reproduzierbarkeit) besser als 0,3% sind. Auch die jeweils erneute Einstellung der Chromatogrammzone im Messfeld (=Gerätetreproduzierbarkeit) bringt nur eine unbedeutende Veränderung des Variationskoeffizienten.

Die häufig vertretene Meinung, dass der Einsatz von Integratoren exaktere

TABELLE I

FEHLERBETRACHTUNG DER FLUORIMETRISCHEN *in-situ*-MESSUNG VON 3 ng EOSIN

Versuchsdurchführung	Peakfläche (mm^2)	Variationskoeffizient (%)
Zehnmalige Registrierung der gleichen Zone bei gleicher Geräteeinstellung durch die gleiche Person	2118 ± 27	1.27
Zehnmalige Registrierung der gleichen Zone bei jeweils erneuter Fleckeneinstellung durch die gleiche Person	2133 ± 30	1.38
Zehnmalige Auftragung der gleichen Lösungsmenge mit 1 μl Mikrocaps durch die gleiche Person	2382 ± 58	2.44

Werte liefert, konnte nicht bestätigt werden. Der Vorteil eines Integrators liegt nur in der Zeitersparnis der Auswertung. Allerdings muss bei Verwendung der meisten Integratoren die Vorschubgeschwindigkeit des Koordinatentisches auf 30–50 mm/min gesenkt werden, um nicht zu stark streuende Messwerte zu erhalten. Dadurch verlängert sich die Registrierzeit um den Faktor 3 bis 4.

Ausser der Reproduzierbarkeit der Photometrie und des Gerätes interessiert der Fehler bei der Dosierung kleiner Volumina. Wird zehnmals die gleiche Untersuchungslösung mit 1 μ l-Mikrocaps aufgetragen, so tritt ein zufälliger Fehler von etwa 1% auf, der sich den oben angegebenen Werten der Reproduzierbarkeit überlagert¹³. Auf diese Weise resultiert für die gesamte Eosinuntersuchung (Auftragen der Lösung, Chromatographieren, Messen und Registrieren sowie Peakauswertung) ein Variationskoeffizient von $\pm 2.5\%$, wenn alle Arbeitsgänge von einer Person ausgeführt werden.

Um die Reproduzierbarkeit der Gesamtmethode erfassen zu können, wurden je zwei Lippenstiftlösungen vier unabhängig voneinander arbeitenden Arbeitskreisen zur Untersuchung gegeben. Es resultierten die in Tabelle II zusammengestellten Werte. Dabei wurde auf die Berechnung eines Variationskoeffizienten verzichtet, weil sich die Aufrundungsfehler speziell bei der Berechnung der Probe II unvergleichbar stärker bemerkbar machen würden als bei Probe I. Die Angabe von drei Stellen nach dem Komma würde eine Exaktheit vortäuschen, die von der Praxis her nicht erreicht wird.

TABELLE II

BESTIMMUNG DES EOSINGEHALTES IN ZWEI LIPPENSTIFTEN (I UND II) VERSCHIEDENER FIRMEN

Versuchsdurchführung	Eosingehalt (%)	
	I	II
Messung der gleichen Untersuchungslösung durch vier verschiedene Personen	a. 0.39; 0.38	0.10; 0.09
	b. 0.38; 0.40	0.09; 0.09
	c. 0.39; 0.40	0.10; 0.09
	d. 0.38; 0.39	0.10; 0.10
Messung vier unabhängig hergestellter Untersuchungslösungen durch vier verschiedene Personen	a. 0.36; 0.37	0.10; 0.09
	b. 0.39; 0.40	0.08; 0.09
	c. 0.36; 0.38	0.09; 0.10
	d. 0.40; 0.38	0.09; 0.10

Gibt man die im Handel erhältlichen Lippenstifte —und nicht die daraus vorher hergestellten Lösungen— an die einzelnen Arbeitskreise aus, so tritt naturgemäss eine grössere Abweichung vom Mittelwert auf. Sie beinhaltet sowohl die zufälligen als auch die systematischen und persönlichen Fehler der Analyse.

Die durchgeführten Untersuchungen liegen in einem optimalen Messbereich. Aus Fig. 2 geht hervor, dass die Nachweisgrenze nahezu um den Faktor 10^3 tiefer liegt. Nimmt man als Nachweisgrenze die Untergrundstruktur ± 3 S.D. an, dann können bei der Direktauswertung der Chromatogramme noch 10 μ g Eosin erkannt werden.

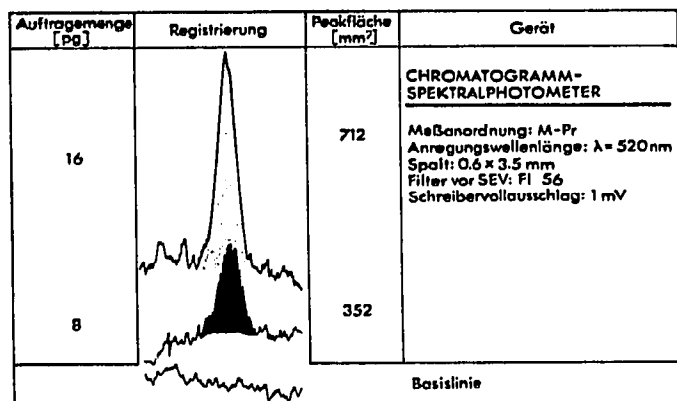


Fig. 2. Originalregistrierung der ortsabhängigen Fluoreszenzemission beim Eosin im Bereich der Nachweisgrenze.

DANK

Dem Verband der Chemischen Industrie e.V., Fond der Chemischen Industrie und der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die gewährte Unterstützung. Herrn Dr. Eich danken wir für die Überlassung der Farbstoffmuster und Fräulein Renate Klein für die gewissenhafte und-zuverlässige Mitarbeit bei diesen Untersuchungen.

ZUSAMMENFASSUNG

Eine Methode zur Anreicherung, Isolation und quantitativen Bestimmung von Eosin (2',4',5',7'-Tetrabromfluorescein = C-Rot 30) in Kosmetika wird beschrieben. Nach Abtrennung des Farbstoffes vom Substrat, Anreicherung durch Adsorption an Polyamidpulver, Elution und dünnschichtchromatographischer Trennung des Untersuchungsgemisches erfolgt die quantitative Bestimmung durch Direktauswertung des Chromatogrammes mithilfe der Fluorimetrie. Im Nanogrammbereich (1–5 ng) kann eine Reproduzierbarkeit mit einem Variationskoeffizienten von $\pm 2,5\%$ erreicht werden. Die Nachweisgrenze liegt bei etwa 10 pg Eosin.

LITERATUR

- 1 G. Lehmann und H.-G. Hahn, *Deut. Lebensm.-Rundsch.*, 63 (1967) 6.
- 2 Deutsche Forschungsgemeinschaft, *Farbstoff-Kommission, Mitteilung 3*, Franz Steiner-Verlag, Wiesbaden, 1962.
- 3 *Specifications for Identity and Purity and Toxicological Evaluation of Food Colours —FAO Nutrition Meetings Report Series*, No. 38 BWHO (Food Add.) 1964.
- 4 G. Lehmann und H. Einschütz, *Deut. Lebensm.-Rundsch.*, 67 (1971) 78.
- 5 H. Jork und Lj. Kraus, in F. Korte (Herausgeber), *Methodicum Chemicum*, Bd. 1, Georg Thieme, Stuttgart, 1973, S. 67 ff.
- 6 H. Jork, *Z. Anal. Chem.*, 221 (1966) 17; 236 (1968) 310.
- 7 H. Jork, *J. Chromatogr.*, 33 (1968) 27.

- 8 H. Jork, in E. Shellard (Herausgeber), *Quantitative Paper and Thin-Layer Chromatography*, Academic Press, London, New York, 1968, Kap. 6.
- 9 U. Hezel, *Angew. Chem.*, 85 (1973) 334.
- 10 W. Tausch, *Messtechnik*, 2 (1972) 38.
- 11 G. Lehmann, H.-G. Hahn, P. Collet, B. Seiffert-Eistert und M. Morán, *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.*, 143 (1970) 256.
- 12 G. Lehmann und U. Recktenwald, *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.*, 146 (1971) 147.
- 13 H. Jork, *Quantitative Auswertung von Dünnschicht-Chromatogrammen*, Fortbildungskurse der Gesellschaft Deutscher Chemiker, Saarbrücken, 1974.