

31982L0434

30.6.1982

ÚŘEDNÍ VĚSTNÍK EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ

L 185/1

DRUHÁ SMĚRNICE KOMISE**ze dne 14. května 1982****o sblížení právních předpisů členských států týkajících se metod analýzy nezbytných pro kontrolu složení kosmetických prostředků**

(82/434/EHS)

KOMISE EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ,

v šamponech a vlasových lotionech a stanovení methanolu vzhledem k ethanolu nebo propan-2-olu;

s ohledem na Smlouvu o založení Evropského hospodářského společenství,

vzhledem k tomu, že opatření této směrnice jsou v souladu se stanoviskem Výboru pro přizpůsobení směrnice 76/768/EHS technickému pokroku,

s ohledem na směrnici Rady 76/768/EHS ze dne 27. července 1976 o sblížení právních předpisů členských států týkajících se kosmetických prostředků⁽¹⁾ ve znění směrnice 79/661/EHS⁽²⁾, a zejména na čl. 8 odst. 1 uvedené směrnice,

PŘIJALA TUTO SMĚRNICI:

Článek 1

vzhledem k tomu, že se ve směrnici 76/768/EHS stanoví úřední zkoušení kosmetických prostředků s cílem zajistit dodržení podmínek předepsaných předpisy Společenství, které se týkají složení kosmetických prostředků;

Členské státy učiní všechny nezbytné kroky k zajištění toho, aby se při úředním zkoušení kosmetických prostředků:

— důkaz oxidačních činidel a stanovení peroxidu vodíku v prostředcích pro péči o vlasy,

vzhledem k tomu, že by všechny nezbytné metody analýzy měly být stanoveny co nejdříve; že první krok k dosažení tohoto cíle již byl učiněn definováním některých metod ve směrnici Komise 80/1335/EHS⁽³⁾ a druhý krok spočívá v definování metod důkazu některých oxidačních činidel a stanovení peroxidu vodíku v prostředcích pro péči o vlasy, důkazu a semikvantitativního stanovení určitých oxidačních barviv v barvách na vlasy, důkazu a stanovení dusitanů, důkazu a stanovení volného formaldehydu, stanovení resorcinolu

— důkaz a semikvantitativní stanovení určitých oxidačních barviv v barvách na vlasy,

— důkaz a stanovení dusitanů,

⁽¹⁾ Úř. věst. L 262, 27.9.1976, s. 169.⁽²⁾ Úř. věst. L 192, 31.7.1979, s. 35.⁽³⁾ Úř. věst. L 383, 31.12.1980, s. 27.

— důkaz a stanovení volného formaldehydu,

— stanovení resorcinolu v šamponech a vlasových lotionech,
— stanovení methanolu vzhledem k ethanolu nebo propan-2-olu
prováděly metodami popsány v příloze.

Článek 2

Členské státy uvedou v účinnost právní a správní předpisy nezbytné pro dosažení souladu s touto směrnicí nejpozději do 31. prosince 1983.

Neprodleně o nich uvědomí Komisi.

Článek 3

Tato směrnice je určena členskými státy.

V Bruselu dne 14. května 1982.

Za Komisi
Karl-Heinz NARJES
člen Komise

PŘÍLOHA

I. DŮKAZ OXIDAČNÍCH ČINIDEL A STANOVENÍ PEROXIDU VODÍKU V PROSTŘEDCÍCH PRO PÉČI O VLASY

ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ

Jodometrické stanovení peroxidu vodíku v kosmetice je možné pouze za nepřítomnosti jiných oxidačních činidel vytvářejících jod z jodidů. Z tohoto důvodu je před jodometrickým stanovením peroxidu vodíku nutné zjistit a identifikovat jakákoli jiná přítomná oxidační činidla. Tento důkaz se dělí do dvou fází; první zahrnuje peroxodisírany, bromičnany a peroxid vodíku, druhá peroxid barnatý.

A. DŮKAZ PEROXODISÍRANŮ, BROMIČNANŮ A PEROXIDU VODÍKU

1. PODSTATA METODY

Peroxodisíran sodný, peroxodisíran draselný a peroxodisíran amonný, bromičnan draselný, bromičnan sodný a peroxid vodíku – bez ohledu na to, zda pochází či nepochází z peroxidu barnatého – se dokazují pomocí sestupné papírové chromatografie, při které se používá dvou vyvíjecích rozpouštědel.

2. REAKČNÍ ČINIDLA

Všechna použitá reakční činidla musí být čistoty p.a.

2.1 0,5 % (m/v) vodné referenční roztoky následujících sloučenin:

2.1.1 Peroxodisíran sodný

2.1.2 Peroxodisíran draselný

2.1.3 Peroxodisíran amonný

2.1.4 Bromičnan draselný

2.1.5 Bromičnan sodný

2.1.6 Peroxid vodíku

2.2 Vyvíjecí rozpouštědlo A, 80 % (v/v) ethanol

2.3 Vyvíjecí rozpouštědlo B, benzen – methanol – 3-methyl-butan-1-ol – voda (34: 38: 18: 10 objemově)

2.4 Detekční činidlo A, 10 % (m/v) vodný roztok jodidu draselného

2.5 Detekční činidlo B, 1 % (m/v) vodný roztok škrobu

2.6 Detekční činidlo C, 10 % (m/m) kyselina chlorovodíková

2.7 4 N kyselina chlorovodíková

3. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

3.1 Chromatografický papír (papír Whatman č. 3 nebo č. 4 nebo jejich ekvivalenty)

3.2 Mikropipeta na 1 µl

3.3 Odměrné baňky na 100 ml

3.4 Skládané filtry

3.5 Zařízení pro sestupnou papírovou chromatografii

4. PŘÍPRAVA VZORKU

4.1 Výrobky rozpustné ve vodě

Z každého vzorku se připraví dva roztoky rozpuštěním 1 g a 5 g výrobku ve 100 ml vody. 1 µl každého z těchto roztoků se použije pro provedení papírové chromatografie popsané v oddílu 5.

4.2 Výrobky mírně rozpustné ve vodě

4.2.1. Navází se 1 g a 5 g vzorku a rozptýlí se v 50 ml vody, v obou případech se doplní vodou na 100 ml a promíchají se. Obě suspenze se přefiltrují přes skládaný filtr (3.4) a z každého z filtrátů se použije 1 µl pro provedení papírové chromatografie popsané v oddílu 5.

4.2.2. Ještě jednou se připraví dvě suspenze vzorků rozptýlením 1 g a 5 g v 50 ml vody, okyselí se zředěnou kyselinou chlorovodíkovou (2.7), doplní se vodou na 100 ml a promíchají se. Suspenze se přefiltrují přes skládaný filtr (3.4) a 1 µl každého z těchto roztoků se použije pro provedení papírové chromatografie popsané v oddílu 5.

4.3 Krémy

5 g a 20 g každého výrobku se rozptýlí ve 100 ml vody a suspenze se použijí pro provedení papírové chromatografie popsané v oddílu 5.

5. METODA

5.1. Přiměřené množství rozpouštědel A (2.2) a B (2.3) se umístí do dvou oddělených chromatografických komor, aby se provedla sestupná papírová chromatografie. Chromatografické komory se sytí párami rozpouštědla alespoň 24 hodin.

5.2. 1 µl roztoku vzorku a všech referenčních roztoků připravených podle oddílu 4 a bodu 2.1 se nanese na startovní body proužku chromatografického papíru (Whatman č. 3 nebo ekvivalentní) 40 cm dlouhého a 20 cm širokého (3.1) nebo jiných vhodných rozměrů a rozpouštědlo se nechá odpařit na vzduchu.

5.3. Chromatografický proužek (5.2) se umístí do chromatografické kolony naplněné vyvíjecím rozpouštědlem A (5.1) a vyvíjí se, dokud čelo rozpouštědla nepostoupí o 35 cm (asi 15 hodin).

5.4. Postup popsáný v bodech 5.2 a 5.3 se opakuje za použití chromatografického papíru (Whatman č. 4 nebo ekvivalentní) (3.1) a vyvíjecího roztoku B. Chromatografie probíhá, dokud čelo rozpouštědla nepostoupí o 35 cm (asi pět hodin).

5.5. Po ukončení vyvíjení se chromatogramy vyjmou a usuší se na vzduchu.

5.6. Skvrny se objeví po následném postříkání:

5.6.1. detekčním činidlem A a krátce poté detekčním činidlem B (2.5). Skvrny peroxidisíranů se na chromatogramu objeví nejdříve a budou je následovat skvrny peroxidu vodíku. Skvrny se označí tužkou;

5.6.2. detekčním činidlem C (2.6) na chromatogramech získaných podle bodu 5.6.1; přítomnost bromičnanů se projeví šedavě modrými skvrnami na chromatogramu.

5.7. Za výše zmíněných podmínek vztahujících se k vyvíjecím rozpouštědlům A (2.2) a B (2.3) jsou hodnoty R_f referenčních látek (2.1) přibližně následující:

	Vyvíjecí rozpouštědlo A (2.2)	Vyvíjecí rozpouštědlo B (2.3)
Peroxodisíran sodný	0,40	0,10
Peroxodisíran draselný	0,40	0,02 + 0,05
Peroxodisíran amonný	0,50	0,10 + 0,20
Bromičnan sodný	0,40	0,20
Bromičnan draselný	0,40	0,10 + 0,20
Peroxid vodíku	0,80	0,80

B. STANOVENÍ PEROXIDU BARNATÉHO

1. PODSTATA METODY

Peroxid barnatý se dokazuje tvorbou peroxidu vodíku po okyselení vzorku (A.4.2) a přítomností barnatých iontů:

- v nepřítomnosti peroxidisíranů (A) přidávkem zředěné kyseliny sírové do části kyselého roztoku vzorku (B.4.1), čímž vznikne bílá sraženina síranu barnatého. Přítomnost barnatých iontů ve vzorku (B.4.1) se opět potvrdí papírovou chromatografií způsobem popsáným níže (B.5),
- ve vzorcích, ve kterých jsou peroxid barnatý a peroxidisírany přítomny současně (B.4.2), vyloužením zbytku z roztoku (B.4.2) v alkalickém prostředí; po rozpuštění taveniny (B.4.2.3) v kyselině chlorovodíkové se přítomnost barnatých iontů potvrdí papírovou chromatografií a/nebo vysrážením síranu barnatého.

2. REAKČNÍ ČINIDLA

2.1 Methanol

2.2 36 % (m/m) koncentrovaná kyselina chlorovodíková

2.3 6 N kyselina chlorovodíková

2.4 4 N kyselina sírová

2.5 Disodná sůl kyseliny rhodizonové (5,6-dihydroxycyklohex-5-en1,2,3,4-tetron, sodná sůl)

2.6 Chlorid barnatý ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

2.7 Bezvodý uhličitan sodný

2.8 1 % (m/v) vodný roztok chloridu barnatého

2.9 Vytvájecí rozpouštědlo skládající se z methanolu, koncentrované kyseliny chlorovodíkové (koncentrace 36 %) a vody (80: 10: 10 objemově)

2.10 Detekční činidlo, 0,1 % (m/v) vodný roztok disodné soli kyseliny rhodizonové, připravuje se bezprostředně před použitím.

3. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

3.1 Mikropipeta na 5 μl

3.2 Platinové kelímky

3.3 Odměrné baňky na 100 ml

3.4 Chromatografický papír Schleicher and Schüll 2043 b nebo ekvivalentní. Papír se vyčistí tak, že se přes noc nechá vyvíjet v komoře pro sestupnou chromatografii (A.3.5) obsahující vytvájecí rozpouštědlo (B.2.9) a poté se usuší.

3.5 Skládáný filtrační papír

3.6 Běžné zařízení pro provádění vzestupné papírové chromatografie

4. PŘÍPRAVA VZORKU

4.1 **Výrobky, ve kterých nejsou přítomny peroxidisírany**

4.1.1 2 g výrobku se rozptýlí v 50 ml vody a pH suspenze se upraví přibližně na hodnotu 1 kyselinou chlorovodíkovou (B.2.3).

4.1.2 Suspenze se pomocí vody převede do odměrné baňky na 100 ml, doplní se po rysku vodou a promíchá se. Tato suspenze se použije pro analýzu papírovou chromatografií popsanou v oddílu 5 a pro důkaz barya vysrážením síranu.

4.2 Výrobky, ve kterých jsou přítomny peroxidisírany

4.2.1 2 g výrobku se rozptýlí ve 100 ml vody a přefiltruje se.

4.2.2 K vysušenému zbytku se přidá množství uhličitanu sodného odpovídající sedmi až desetinásobku hmotnosti zbytku (B.2.7), promíchá se a směs se půl hodiny taví v platinovém kelímku (B.3.2).

4.2.3 Ochladí se na pokojovou teplotu, tavenina se rozpustí v 50 ml vody a přefiltruje se (B.3.5).

4.2.4 Zbytek z taveniny se rozpustí v kyselině chlorovodíkové (B.2.3) a doplní se vodou na 100 ml. Tento roztok se použije pro analýzu papírovou chromatografií popsanou v oddílu 5 a pro důkaz barya vysrážením síranu.

5. METODA

5.1 Přiměřené množství vyvíjecího rozpouštědla (B.2.9) se umístí do komory pro vzestupnou chromatografii a komora se sytí alespoň 15 hodin.

5.2 Na kus chromatografického papíru – předem upraveného tak, jak je popsáno v bodu B.3.4 – se nanese do třech startovních bodů 5 µl každého z roztoků připravených podle bodů B.4.1.2 a B.4.2.4 a referenční roztok B.2.8.

5.3 Vzorek a referenční skvrny se vysuší na vzduchu. Chromatogram se vyvíjí, dokud čelo rozpouštědla nepostoupí o 30 cm.

5.4 Chromatogram se vyjme z komory a usuší na vzduchu.

5.5 Skvrny na chromatogramu se objeví po postříkání papíru detekčním činidlem B.2.10. V přítomnosti barya se na chromatogramu objeví červené skvrny s hodnotou R_f asi 0,10.

C. STANOVENÍ PEROXIDU VODÍKU

1. PODSTATA METODY

Jodometrické stanovení peroxidu vodíku je založeno na následující reakci:



Tato konverze probíhá pomalu, může však být urychlena přidáním molybdenanu amonného. Vzniklý jod se stanoví titračně thiosíranem sodným a je mírou obsahu peroxidu vodíku.

2. DEFINICE

Obsah peroxidu vodíku změřený níže popsaným způsobem se vyjádří v hmotnostních procentech výrobku (% m/m).

3. REAKČNÍ ČINIDLA

Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a.

3.1 2 N kyselina sírová

3.2 Jodid draselný

3.3 Molybdenan amonný

3.4 0,1 N thiosíran sodný

- 3.5 10 % (m/v) roztok jodidu draselného, připravuje se bezprostředně před použitím
- 3.6 20 % (m/v) roztok molybdenanu amonného
- 3.7 1 % (m/v) roztok škrobu

4. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

- 4.1 Kádinky na 100 ml
- 4.2 Byreta na 50 ml
- 4.3 Odměrné baňky na 250 ml
- 4.4 Odměrné válce na 25 a 100 ml
- 4.5 Nedělené pipety na 10 ml
- 4.6 Erlenmeyerovy baňky na 250 ml

5. METODA

- 5.1 Do kádinky na 100 ml se naváží 10 g (m gramů) výrobku obsahujícího asi 0,6 g peroxidu vodíku. Obsah se pomocí vody převede do odměrné baňky na 250 ml, doplní se po rysku vodou a promíchá se.
- 5.2 10 ml roztoku vzorku (5.1) se odpipetuje do Erlenmeyerovy baňky na 250 ml (4.6) a postupně se přidá 100 ml 2 N kyseliny sírové (3.1), 20 ml roztoku jodidu draselného (3.5) a tři kapky roztoku molybdenanu amonného (3.6).
- 5.3 Vzniklý jod se okamžitě titruje 0,1 N roztokem thiosíranu sodného (3.4) a těsně před dosažením bodu ekvivalence se přidá několik mililitrů roztoku škrobu (3.7) jako indikátoru. Zaznamená se spotřeba 0,1 N roztoku thiosíranu sodného (3.4) v mililitrech (V).
- 5.4 Způsobem popsaným v bodech 5.2 a 5.3 se provede slepý pokus, přičemž se nahradí 10 ml roztoku vzorku 10 ml vody. Zaznamená se spotřeba 0,1 N roztoku thiosíranu sodného na slepý pokus (V_0 v ml).

6. VÝPOČET

Obsah peroxidu vodíku ve výrobku vyjádřený v hmotnostních procentech (% m/m) se vypočte pomocí následujícího vzorce:

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

kde

m = množství analyzovaného výrobku (5.1) v gramech,

V_0 = spotřeba 0,1 N roztoku thiosíranu sodného na slepý pokus (5.4) v mililitrech,

V = spotřeba 0,1 N roztoku thiosíranu sodného při titraci roztoku vzorku (5.3) v mililitrech.

7. OPAKOVATELNOST (1)

Pro výrobky obsahující asi 6 % (m/m) peroxidu vodíku by neměla absolutní hodnota rozdílu dvou stanovení provedených současně se stejným vzorkem překročit 0,2 %.

(1) Viz norma ISO 5725.

II. DŮKAZ A SEMIKVANTITATIVNÍ STANOVENÍ URČITÝCH OXIDAČNÍCH BARVIV V BARVÁCH NA VLASY

1. ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ

Tato metoda je vhodná pro důkaz a semikvantitativní stanovení následujících látek v barvách na vlasy ve formě krému nebo kapaliny:

Látky	Symbol
<i>Fenylendiaminy</i>	
o-Fenylendiamin	(OPD)
m-Fenylendiamin	(MPD)
p-Fenylendiamin (příloha V)	(PPD)
<i>Methylfenylendiaminy</i>	
4-Methyl-1,2-fenylendiamin (toluen-3,4-diamin)	(OTD)
4-Methyl-1,3-fenylendiamin (toluen-2,4-diamin)	(MTD)
2-Methyl-1,4-fenylendiamin (toluen-2,5-diamin)	(PTD)
<i>Diaminofenoly</i>	
2,4-Diaminofenol	(DAP)
<i>Hydrochinon</i>	
Benzen-1,4-diol	(H)
a-Naftol	(α N)
<i>Pyrogallol</i>	
1,2,3-trihydroxybenzen	(P)
<i>Resorcinol</i>	
1,3-dihydroxybenzen	(R)

2. PODSTATA METODY

Oxidační barviva se extrahují z barev ve formě krému nebo kapaliny při pH 10 96 % ethanolem a dokazují se chromatografií na tenké vrstvě, a to jedno nebo dvourozměrnou.

K semikvantitativnímu stanovení těchto látek se chromatogram vzorků porovná pomocí čtyř vyvíjecích systémů s chromatogramy referenčních látek vyvíjenými současně a za co nejpodobnějších podmínek.

3. REAKČNÍ ČINIDLA

Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a.

3.1 Ethanol, bezvodý

3.2 Aceton

3.3 Ethanol, 96 % (v/v)

3.4 Roztok amoniaku, 25 % ($d_4^{20} = 0,91$) (obsah závorky vložit z originálu)

- 3.5 Kyselina L(+)-askorbová
- 3.6 Chloroform
- 3.7 Cyklohexan
- 3.8 Dusík, technický
- 3.9 Toluén
- 3.10 Benzen
- 3.11 n-Butanol
- 3.12 Butan-2-ol
- 3.13 Kyselina fosforová, 50 % roztok (v/v)
- 3.14 Diazotační činidlo. Buď:
- 3-nitro-1-benzendiazoniumchlorbensulfonát (ve formě stabilní soli), jako např. v červeni 2 JN – Francolor,
 - 2-chlor-4-nitro-1-benzendiazoniumnaftalenbenzoát (ve formě stabilní soli), jako např. v činidle NNCD – referenční č. 74 150 FLUKA,
- nebo ekvivalentní.
- 3.15 Dusičnan stříbrný
- 3.16 p-Dimethylaminobenzaldehyd
- 3.17 2,5-Dimethylfenol
- 3.18 Chlorid železitý hexahydrát
- 3.19 Kyselina chlorovodíková, 10 % roztok (m/v)
- 3.20 **Referenční látky**

Referenční látky jsou sloučeniny uvedené v oddílu 1 „Rozsah a oblast použití“. V případě aminosloučenin musí být referenční sloučenina buď ve formě hydrochloridu (mono nebo dihydrochloridu), nebo jako volná báze.

3.21 **Referenční roztoky 0,5 % (m/v)**

Připraví se 0,5 % roztoky (m/v) referenčních látek uvedených v bodu 3.20.

Navází se 50 ± 1 mg referenční látky do odměrné baňky na 10 ml.

Přidá se 5 ml 96 % ethanolu (3.3) a 250 ml kyseliny askorbové (3.5).

Roztok se alkalizuje přidáním roztoku amoniaku (3.4) na hodnotu pH 10 (zjišťuje se indikátorovým papírkem).

Doplní se na 10 ml 96 % ethanolem (3.3) a promíchá se.

Roztoky je možno uchovávat po dobu jednoho týdne v chladu a temnu.

V některých případech může po přidání kyseliny askorbové a roztoku amoniaku vzniknout sraženina. Před dalším postupem je třeba ji nechat usadit.

3.22 **Vyvíjecí rozpouštědla**

3.22.1 Aceton – chloroform – toluén (35: 25: 40 objemově)

3.22.2 Chloroform – cyklohexan – absolutní ethanol – 25 % roztok amoniaku (80: 10: 10: 1 objemově)

3.22.3 Benzen – butan-2-ol – voda (50: 25: 25 objemově). Důkladně se protřepe a po dekantaci při pokojové teplotě (20 až 25 °C) se k vyvíjení použije horní fáze.

3.22.4 n-Butanol – chloroform – činidlo M (7: 70: 23 objemově). Fáze se pečlivě dekantují při pokojové teplotě (20 až 25 °C) a použije se spodní fáze.

Příprava činidla M

Roztok amoniaku, 25 % (v/v)	24 objemových jednotek
Kyselina fosforová, 50 % (3.13)	1 objemová jednotka
Voda	75 objemových jednotek

Poznámka:

Vyvíjecí rozpouštědla obsahující amoniak je třeba bezprostředně před použitím dobře protřepat.

3.23 Detekční činidla**3.23.1 Diazotační činidlo**

Připraví se 5 % (m/v) vodný roztok zvoleného činidla (3.14). Tento roztok se musí připravit bezprostředně před použitím.

3.23.2 Ehrlichovo činidlo

2 g p-dimethylaminobenzaldehydu (3.16) se rozpustí ve 100 ml 10 % vodného roztoku kyseliny chlorovodíkové (m/v) (3.19).

3.23.3 2,5-dimethylfenol – chlorid železitý hexahydrát

Roztok 1: Rozpustí se 1 g dimethylfenolu (3.17) ve 100 ml 96 % ethanolu (3.3).

Roztok 2: Rozpustí se 4 g hexahydrátu chloridu železitého (3.18) ve 100 ml 96 % ethanolu (3.3).

Při vyvolání chromatogramu se těmito roztoky provádí postřik samostatně, nejprve roztokem 1, poté roztokem 2.

3.23.4 Amoniakální dusičnan stříbrný

25 % amoniak (3.4) se přidá k 5 % (m/v) vodnému roztoku dusičnanu stříbrného (3.15), až se sraženina rozpustí. Toto reakční činidlo se připravuje bezprostředně před použitím.

Nelze jej uchovávat.

4. PŘÍSTROJE A POMŮCKY**4.1 Běžné laboratorní vybavení pro chromatografii na tenké vrstvě.**

4.1.1 Plastový nebo skleněný kryt konstruovaný tak, aby chromatografickou desku během nanášení skvrn a sušení mohl obtékat dusík. Toto opatření je nezbytné vzhledem k náchylnosti určitých barviv k oxidaci.

4.1.2 Mikrostříkačka na 10 μ l, dělená po 0,2 μ l, s jehlou s rovným koncem nebo lépe dávkovač na 50 μ l uchycený v držáku tak, aby deska mohla být udržována pod atmosférou dusíku.

4.1.3 Hotové silikagelové desky, tloušťka 0,25 mm, rozměry 20 \times 20 cm (Macherey and Nagel, Silica GHR, na plastové podložce nebo ekvivalentní)

4.2 Odstředivka, 4000 ot./min.

4.3 Centrifugační zkumavky na 10 ml se šroubovými uzávěry potaženými PTFE nebo ekvivalentní.

5. POSTUP**5.1 Příprava vzorků k analýze**

První 2 až 3 cm krému vytlačeného z tuby se odstraní.

Do centrifugační zkumavky (4.3) předem propláchnuté dusíkem se převede: 300 mg kyseliny askorbové se 3 g krému nebo 3 g homogenizované kapaliny.

Přidává se po kapkách 25 % amoniak (3.4) až pH dosáhne hodnoty 10. Doplní se na 10 ml 96 % ethanolu (3.3).

Homogenizuje se pod atmosférou dusíku (3.8), zazátkuje se a centrifuguje se po 10 minut při 4000 ot./min.

Použije se supernatant.

5.2 Chromatografie

5.2.1 Nanášení na desku

Pod atmosférou dusíku (3.8) se na chromatografickou desku (4.1.3) nanese po 1 μ l každé shora uvedené referenční látky v devíti bodech vzdálených od sebe 1,5 cm podél linie vzdálené asi 1,5 cm od okraje desky.

Referenční látky se nanášejí v tomto uspořádání:

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

Dále se v bodech 10 a 11 nanesou vždy 2 μ l zkoumaných roztoků získaných podle bodu 5.1.

Deska se uchovává pod atmosférou dusíku (3.8) až do okamžiku, kdy je zahájeno vyvíjení chromatogramu.

5.2.2 Vyvíjení

Deska se vloží do komory předem propláchnuté dusíkem (3.8) a nasycené jedním ze čtyř rozpouštědel (3.22) a nechá se vyvíjet při pokojové teplotě (20 až 25 °C) ve tmě, dokud čelo rozpouštědla nedosáhne vzdálenosti asi 15 cm od startovací linie.

Deska se vyjme a usuší pod atmosférou dusíku (3.8) při pokojové teplotě.

5.2.3 Vyvolání

Deska se postříká jedním ze čtyř roztoků uvedených v bodu 3.23.

5.2.4 Důkaz

Porovnají se hodnoty R_f a barvy skvrn vzorku a chromatografovaných referenčních látek.

V tabulce 1 jsou uvedeny příklady hodnot R_f a barev skvrn pro jednotlivé látky v závislosti na použitém rozpouštědle a indikátoru.

Nejistý důkaz je někdy možné potvrdit tak, že se přidá roztok odpovídající referenční látky k extraktu vzorku.

5.2.5 Semikvantitativní odhad

Intenzita skvrn jednotlivých látek dokázaných v bodu 5.2.4 se porovnává vizuálně s odpovídajícím rozsahem koncentrací referenčních látek.

Při nadměrně vysoké koncentraci jedné nebo více látek nalezených ve vzorku se extrakt vzorku zředí a měření se opakuje.

TABULKA 1

Hodnoty R_f a barvy získané bezprostředně po vyvolání

Referenční látka (3.20)	Vývíjecí rozpouštědla				Detekční činidla			
	Hodnoty R_f				Výsledné barvy			
	(3.22.1)	(3.22.2)	(3.22.3)	(3.22.4)	Diazotační činidlo (3.23.1)	Ehrlichovo činidlo (3.23.2)	Dimethylfenol (3.23.3)	AgNO ₃ (3.23.4)
OPD	0,62	0,60	0,30	0,57	světle hnědá	—	—	světle hnědá
MPD	0,40	0,60	0,47	0,48	fialově hnědá (*)	žlutá	světle hnědá	světle hnědá
PPD	0,20	0,50	0,30	0,48	hnědá	jasně červená (*)	fialová	šedá
OTD	0,60	0,60	0,53	0,60	hnědá (*)	světle oranžová	světle hnědá	šedavě hnědá
MTD	0,40	0,67	0,45	0,60	červenavě hnědá (*)	žlutá	hnědá	černá
PTD	0,33	0,65	0,37	0,70	hnědá	oranžová	fialová (*)	šedá
DAP	0,07	—	0	0,05	hnědá (*)	oranžová	fialová	hnědá
H	0,50	0,35	0,80	0,20	—	oranžová	fialová	černá (*)
αN	0,90	0,80	0,90	0,75	oranžově hnědá	—	fialová (*)	černá
P	0,37	—	0,67	0,05	hnědá	velmi světle fialová	velmi světle hnědá	hnědá (*)
R	0,50	0,37	0,80	0,17	oranžová (*)	světle fialová	velmi světle hnědá	světle hnědá

Poznámka

1. OPD se ukazuje pouze slabě; musí se použít rozpouštědlo (3.22.3), aby se jasně odlišil od OTD.

2. (*) Označuje nejlépe vyvolané barvy.

6. ZKOUŠKA DVOUROZMĚRNOU CHROMATOGRÁFIÍ NA TENKÉ VRSTVĚ

Tato metoda dvourozměrné chromatografie vyžaduje použití dalších standardů a reakčních činidel.

6.1 Další referenční roztoky a látky

6.1.1 β-naftol (β N)

6.1.2 2-aminofenol (OAP)

6.1.3 3-aminofenol (MAP)

6.1.4 4-aminofenol (PAP)

6.1.5 2-nitro-1,4-fenylendiamin (2-NPPD)

6.1.6 4-nitro-1,2-fenylendiamin (4-NOPD)

Připraví se 0,5 % (m/v) roztoky všech dalších referenčních látek způsobem popsaným v bodu 3.21.

6.2 Další vývíjecí rozpouštědlo

6.2.1 Ethylacetát – cyklohexan – 25 % roztok amoniaku (65: 30: 0,5 objemově)

6.3 Další detekční systém

Do vývíjecí komory pro chromatografii na tenké vrstvě se vloží skleněná nádoba, přidají se asi 2 g krystalického jodu a komora se uzavře odpovídajícím víkem.

6.4 Chromatografie

- 6.4.1 Podle obrázku 1 se na desce pro chromatografii na tenké vrstvě (4.1.3) vyznačí na straně s adsorbentem dvě linky.
- 6.4.2 V dusíkové atmosféře (4.1.1) se nanese 1 až 4 μl extraktu (5.1) do základního bodu 1 (obr. 1), který leží asi 2 cm od obou okrajů. Množství extraktu závisí na intenzitě skvrn na chromatogramech (5.2).
- 6.4.3 Mezi body 2 a 3 (obr. 1) se nanesou oxidační barviva dokázaná nebo pokládaná za dokázaná podle bodu 5.2 (vzdálenost mezi body je 1,5 cm). Nanáší se 2 μl každého referenčního roztoku – kromě DAP, který je nutno nanést v objemu 6 μl . Nanášení se provádí v atmosféře dusíku (6.4.2).
- 6.4.4 Postup podle bodu 6.4.3 se opakuje v základních bodech 4 a 5 (obr. 1) a deska se uchovává pod dusíkem až do zahájení vyvolávání chromatogramu (vzdálenost mezi body je 1,5 cm).
- 6.4.5 Chromatografická komora se propláchne dusíkem (3.8) a umístí se do ní vhodné množství vyvíjecího rozpouštědla 3.22.2. Deska (6.4.4) se vloží do komory a vyvíjí se ve tmě v prvním vyvíjecím směru (obr. 1). Vyvíjí se, dokud čelo rozpouštědla nedosáhne linie vyznačené na desce (přibližně 13 cm).
- 6.4.6 Deska se z komory vyjme a umístí do jiné chromatografické komory, předem propláchnuté dusíkem, aby se vyvíjecí rozpouštědlo odpařovalo alespoň 60 minut.
- 6.4.7 Pomocí dělené zkumavky se do komory předem propláchnuté dusíkem (3.8) převede vhodné množství vyvíjecího rozpouštědla (6.2), do komory se vloží deska otočená o 90° (6.4.6) a chromatogram se vyvíjí ve druhém směru (opět ve tmě), dokud čelo rozpouštědla nedosáhne linie vyznačené na straně s adsorbentem. Deska se vyjme z komory a rozpouštědlo se nechá odpařit na vzduchu.
- 6.4.8 Deska se na 10 minut umístí do chromatografické komory obsahující páry jodu (6.3) a dvourozměrný chromatogram se interpretuje s využitím hodnot R_f a barev současně chromatografovaných referenčních látek (hodnoty R_f a barvy skvrn jsou uvedeny v tabulce II).

Poznámka

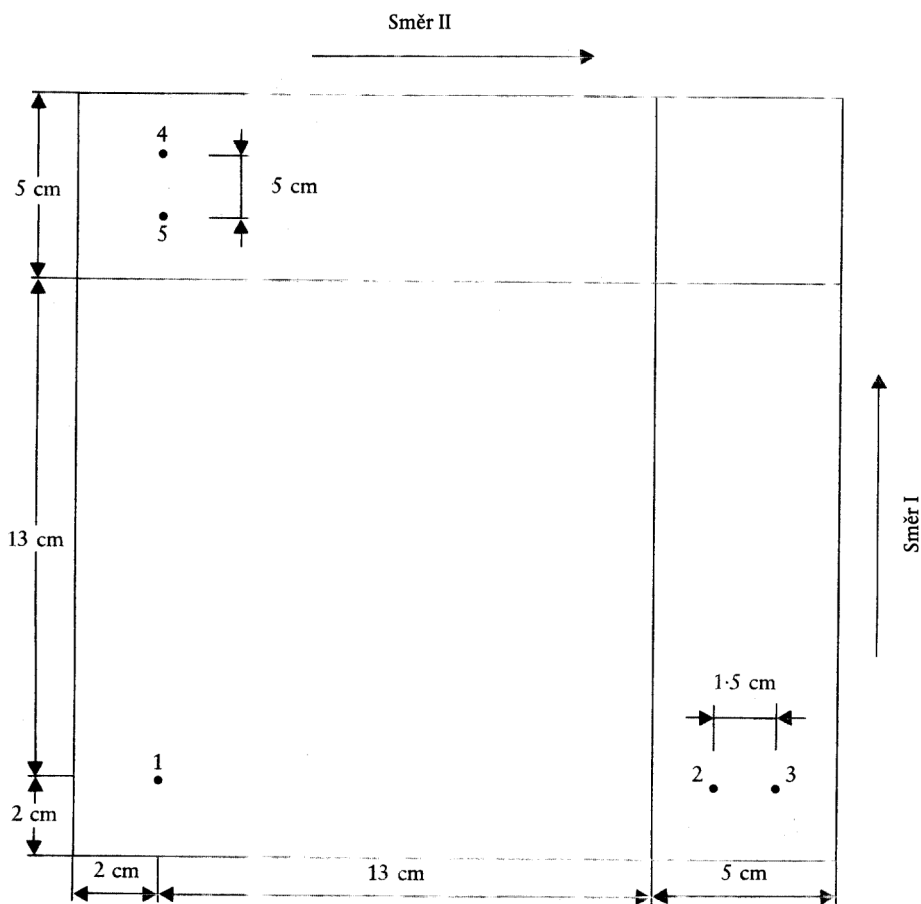
Nejlépšího vybarvení skvrn se dosáhne tehdy, ponechají se po vyvíjení chromatogramu v atmosféře po dobu půl hodiny.

- 6.4.9 Přítomnost oxidačních barviv nalezených podle bodu 6.4.8 je možno definitivně potvrdit opakováním postupu popsaného v bodech 6.4.1 až 6.4.8, kdy se v základním bodu 1 přes množství extraktu podle bodu 6.4.2 nanese 1 μl referenčních látek identifikovaných v bodu 6.4.8. Neobjeví-li se oproti chromatogramu získanému podle bodu 6.4.8 žádná jiná skvrna, je interpretace chromatogramu podle bodu 6.4.8 správná.

TABULKA II
Barvy referenčních látek po chromatografii a vyvíjení parami jodu

Referenční látky	Barvy po vyvíjení parami jodu
R	běžová
P	hnědá
α -N	fialová
β -N	světle hnědá
H	fialově hnědá
MPD	žlutavě hnědá
PPD	fialově hnědá
MTD	tmavě hnědá
PTD	žlutavě hnědá
DAP	tmavě hnědá
OAP	oranžová
MAP	žlutavě hnědá
PAP	fialově hnědá
2NPPD	hnědá
4NOPD	oranžová

Obrázek 1



III. DŮKAZ A STANOVENÍ DUSITANŮ

A. DŮKAZ

1. ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ

Tato metoda je vhodná k důkazu dusitanů v kosmetických prostředcích, zejména v krémech a pastách.

2. PODSTATA METODY

Přítomnost dusitanu indikuje vznik zbarvených derivátů s 2-aminobenzaldehydfenylhydrazonem (Nitrin®).

3. REAKČNÍ ČINIDLA

Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a.

3.1 Zředěná kyselina sírová: 2 ml koncentrované kyseliny sírové ($d_4^{20} = 1,84$) = 1,84 (obsah závorčky vložit z originálu) se zředí 11 ml destilované vody.

3.2 Zředěná kyselina chlorovodíková: 1 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové ($d_4^{20} = 1,19$) = 1,19 (obsah závorčky vložit z originálu) se zředí 11 ml destilované vody.

3.3 Methanol

3.4 Roztok 2-aminobenzaldehydfenylhydrazonu (reakční činidlo Nitrin®) v methanolu.

Navází se 2,0 g Nitrinu® a převede se kvantitativně do odměrné baňky na 100 ml. Po kapkách se přidají 4 ml zředěné kyseliny chlorovodíkové (3.2) a protřepe se. Doplní se po rysku methanolem a míchá, dokud se roztok úplně nevyčechá. Roztok se uchovává v hnědé skleněné lahvi (4.3).

4. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

4.1 Kádinky na 50 ml

4.2 Odměrná baňka na 100 ml

4.3 Hnědá skleněná láhev na 125 ml

4.4 Skleněná deska 10 × 10 cm

4.5 Špachtle z plastu

4.6 Filtrační papír 10 × 10 cm

5. POSTUP

5.1 Část analyzovaného vzorku se rovnoměrně rozetře na skleněnou desku (4.4) tak, aby byl povrch pokryt vrstvou nejvýše 1 cm silnou.

5.2 List filtračního papíru (4.6) se nasákne destilovanou vodou. Položí se na vzorek a přitiskne špachtlí z plastu (4.5).

5.3 Počká se asi jednu minutu a do středu filtračního papíru se nanesou:

— 2 kapky zředěné kyseliny sírové (3.1),

— poté dvě kapky roztoku Nitrinu® (3.4).

5.4 Po 5 až 10 sekundách se filtrační papír odstraní a prohlédne se proti dennímu světlu. Červenofialové zbarvení indikuje přítomnost dusitanů.

Je-li obsah dusitanů nízký, změní se červenofialové zbarvení během 5 až 15 sekund na žluté. Je-li přítomno velké množství dusitanů, dojde k této barevné změně až po jedné nebo dvou minutách.

6. POZNÁMKA

Intenzita tmavočerveného zbarvení a doba, která uplyne před změnou na žlutou, naznačují obsah dusitanů ve vzorku.

B. STANOVENÍ

1. ROZSAH

Metoda popisuje stanovení dusitanů v kosmetických prostředcích.

2. DEFINICE

Obsah dusitanů ve vzorku stanovený touto metodou se vyjádří v hmotnostních procentech dusitanu sodného.

3. PODSTATA METODY

Po zředění vzorku vodou a vyčerení se nechá proběhnout reakce přítomných dusitanů se sulfanilamidem a N-1-naftytlethylendiaminem a absorbance vzniklého zbarvení se měří při 538 nm.

4. REAKČNÍ ČINIDLA

Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a.

4.1 Činidla: tato reakční činidla nelze používat déle než jeden týden po přípravě.

4.1.1 Carrezovo činidlo I:

106 g kyanoželeznanu draselného $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ se rozpustí v destilované vodě a zředí se vodou na 1000 ml.

4.1.2 Carrezovo činidlo II:

219,5 g octanu zinečnatého $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ a 30 ml ledové kyseliny octové se rozpustí v destilované vodě a zředí se vodou na 1000 ml.

4.2 Roztok dusitanu sodného:

0,500 g dusitanu sodného se rozpustí v destilované vodě v odměrné baňce na 1000 ml a doplní se vodou po rysku. 10,0 ml tohoto zásobního standardního roztoku se zředí na 500 ml; 1,0 ml výsledného roztoku = 10 mikrogramů $NaNO_2$.

4.3 1 N roztok hydroxidu sodného

4.4 0,2 % roztok sulfanilamidhydrochloridu:

2,0 g sulfanilamidu se za zahřívání rozpustí v 800 ml vody. Po ochlazení se za míchání přidá 100 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Zředí se vodou na 1000 ml.

4.5 5 N kyselina chlorovodíková

4.6 N-1-naftylové činidlo:

Tento roztok se musí připravit v den použití. Rozpustí se 0,1 g dihydrochloridu N-1-naftytlethylendiaminu ve vodě a zředí se vodou na 100 ml.

5. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

5.1 Analytické váhy

5.2 Odměrné baňky na 100, 250, 500 a 1000 ml

5.3 Nedělené nebo dělené pipety

- 5.4 Odměrné válce na 100 ml
- 5.5 Skládáný filtrační papír, bez dusitanů, průměr 15 cm
- 5.6 Vodní lázeň
- 5.7 Spektrofotometr a kyvety s optickou drahou 1 cm
- 5.8 pHmetr
- 5.9 Mikrobyreta na 10 ml
- 5.10 Kádinky na 250 ml
6. POSTUP
- 6.1 S přesností na 0,1 mg se naváží asi 0,5 g (m gramů) homogenizovaného vzorku, kvantitativně se převede horkou destilovanou vodou do kádinky na 250 ml (5.10) a doplní se horkou destilovanou vodou asi na 150 ml. Kádinka (5.10) se na půl hodiny vloží do vodní lázně (5.6) vyhřáté na 80 °C. Během této doby se obsah občas protřepe.
- 6.2 Ochladí se na pokojovou teplotu a postupně se za míchání přidají 2 ml Carrezova činidla I (4.1.1) a 2 ml Carrezova činidla II (4.1.2).
- 6.3 Přidává se 1 N roztok hydroxidu sodného (4.3), dokud se pH neupraví na 8,3. (Použije se pHmetr (5.8)). Obsah se kvantitativně převede do odměrné baňky na 250 ml (5.2) a doplní destilovanou vodou po rysku.
- 6.4 Obsah se promíchá a zfiltruje přes skládaný papírový filtr (5.5).
- 6.5 Do odměrné baňky na 100 ml (5.2) se odpipetuje (5.3) odpovídající alikvotní část (V mililitrů) čirého filtrátu, avšak ne více než 25 ml, a doplní se destilovanou vodou na objem 60 ml.
- 6.6 Po promíchání se přidá 10,0 ml roztoku sulfanilamid–hydrochloridu (4.4) a poté 6,0 ml 5 N kyseliny chlorovodíkové (4.5). Promíchá se a ponechá stát pět minut. Přidají se 2,0 ml N-1-naftylového činidla (4.6), promíchá se a ponechá stát tři minuty. Zředí se vodou po rysku a promíchá se.
- 6.7 Připraví se slepý pokus opakováním operací popsaných v bodech 6.5 a 6.6 bez přidavku N1-naftylového činidla (4.6).
- 6.8 Změří se (5.7) absorpance roztoku připraveného podle bodu 6.6 při 538 nm proti roztoku slepého pokusu (6.7).
- 6.9 Z kalibračního grafu (6.10) se odečte obsah dusitanu sodného v mikrogramech na 100 ml roztoku (ml mikrogramů), odpovídající absorpance změřené podle bodu 6.8.
- 6.10 S využitím roztoku dusitanu sodného o koncentraci 10 µg na ml (4.2) se sestrojí kalibrační graf pro koncentrace 0, 20, 40, 60, 80 a 100 µg dusitanu sodného ve 100 ml.
7. VÝPOČET

Obsah dusitanu sodného ve vzorku vyjádřený v hmotnostních procentech se vypočte pomocí následujícího vzorce:

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

kde:

m = hmotnost vzorku odebraného pro analýzu v gramech (6.1),

m_1 = obsah dusitanu sodného v mikrogramech zjištěný podle bodu 6.9,

V = počet mililitrů filtrátu použitého pro měření (6.5).

8. OPAKOVATELNOST ⁽¹⁾

Pro obsah asi 0,2 % (m/m) dusitanu sodného by neměla absolutní hodnota rozdílu dvou stanovení provedených současně se stejným vzorkem překročit 0,005 %.

IV. DŮKAZ A STANOVENÍ VOLNÉHO FORMALDEHYDU

1. ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ

Tato metoda popisuje důkaz a stanovení volného formaldehydu. Je použitelná pro všechny kosmetické prostředky a skládá se ze tří částí:

1.1 Důkaz

1.2 Kolorimetrické stanovení pomocí pentan-2,4-dionu

Tato metoda je nevhodná, je-li formaldehyd vázán nebo je-li v polymerní formě jako v případě donorů formaldehydu. Pokud výsledek přesáhne nejvyšší povolenou koncentraci, musí se použít následující metoda.

1.3 Stanovení pomocí hydrogensířičitanu

Při této metodě se nebere v úvahu silně vázaný formaldehyd nebo formaldehyd v polymerní formě. Některé nestabilní sloučeniny (např. hexamethylentetramin) se však stanoví. Navíc je měření alkality roztoku v přítomnosti pufrčního roztoku nesnadné.

2. DEFINICE

Obsah volného formaldehydu ve vzorku stanovený touto metodou se vyjadřuje v hmotnostních procentech.

3. PODSTATA METODY

3.1 Část I – Důkaz

Formaldehyd v prostředí kyseliny sírové zbarvuje Schiffovo činidlo do růžova nebo do lila.

3.2 Část II – Stanovení pomocí pentan-2,4-dionu

Formaldehyd reaguje s pentan-2,4-dionem v přítomnosti octanu amonného za vzniku 3,5-diacetyl-1,4-dihydro-lutidinu. Ten se extrahuje butanolem a absorbance extraktu se měří při 410 nm.

⁽¹⁾ Viz norma ISO 5725.

3.3 Část III – Stanovení pomocí siřičitanu

Formaldehyd reaguje se siřičitanem v kyselém prostředí při teplotě 0 °C za vzniku adiční sloučeniny. Nadbytek protonů se titruje hydroxidem sodným. Spotřebované protony tvoří základ výpočtu pro stanovení množství formaldehydu. Alkalita nebo acidita prostředí se stanoví slepým pokusem bez siřičitanu.

4. REAKČNÍ ČINIDLA

Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a.

4.1 Ledová kyselina octová

4.2 Bezvodý octan amonný

4.3 Butan-1-ol

4.4 Kyselina sírová, přibližně 2 N

4.5 Čerstvě připravený 0,1 M roztok siřičitanu sodného

4.6 Schiffovo činidlo: do kádinky se naváží 100 mg fuchsinu a rozpustí se v 75 ml vody o teplotě 80 °C.

Po vychladnutí se přidá 2,5 g siřičitanu sodného heptahydrátu ($\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) a 1,5 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové ($(d_4^{20} = 1,19) = 1,19$). Objem se doplní do 100 ml.

(Toto reakční činidlo nelze použít po dvou týdnech.)

4.7 Činidlo obsahující pentan-2,4-dion

V odměrné baňce na 1000 ml se rozpustí:

150 g octanu amonného (4.2),

2 ml Pentan-2,4-dionu (čerstvě destilovaného za sníženého tlaku – neměl by vykazovat žádnou absorpci při 410 nm),

3 ml ledové kyseliny octové (4.1).

Doplní se na 1000 ml vodou (pH roztoku: asi 6,4).

Toto činidlo musí být připraveno čerstvě.

4.8 Odměrný roztok kyseliny sírové, 0,1 N

4.9 Odměrný roztok hydroxidu sodného, 0,1 N

4.10 Roztok jodu, 0,1 N

4.11 Roztok thiosíranu sodného, 0,1 N

4.12 Zásobní roztok formaldehydu

5 g 37 až 40 % roztoku formaldehydu se odměří do odměrné baňky na 1000 ml a doplní se na 1000 ml.

Koncentrace tohoto roztoku se stanoví takto: odebere se 10,00 ml, přidá se 25,00 ml 0,1 N odměrného roztoku jodu (4.10) a 10 ml 1 N roztoku hydroxidu sodného.

Nechá se stát pět minut.

Přidá se 11 ml 1 N HCl a přebytek 0,1 N odměrného roztoku jodu (4.10) se titruje 0,1 N odměrným roztokem thiosíranu sodného (4.11), jako indikátor se použije škrob.

1 ml 0,1 N odměrného roztoku jodu (4.10) odpovídá 1,5 mg formaldehydu.

4.13 Referenční roztok formaldehydu

5,00 ml zásobního roztoku (4.12) se odpipetuje do odměrné baňky na 100 ml a doplní se na 100 ml demineralizovanou vodou.

5,00 ml vzniklého roztoku se odpipetuje do odměrné baňky na 500 ml a doplní se na 500 ml demineralizovanou vodou.

1 ml tohoto roztoku obsahuje asi 1 µg formaldehydu.

Přesný obsah se vypočte.

4.14 Roztok thymolftaleinu, 0,1 g/100 ml 50 % ethanolu

4.15 Roztok referenčního činidla: jako činidlo 4.7, ale bez přídavku pentan-2,4-dionu.

5. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

5.1 Běžné laboratorní vybavení

5.2 Filtr pro separaci fází, Whatman 1 PS (nebo ekvivalentní)

5.3 Odstředivka

- 5.4 Spektrofotometr
- 5.5 Skleněné kyvety s délkou optické dráhy 1 cm
- 5.6 Potenciometr se zapisovačem
- 5.7 Skleněná/kalomelová elektroda (doporučuje se používat speciální elektrody pro nízké teploty).
6. POSTUP
- 6.1 **Důkaz**
- 6.1.1 Do kádinky na 10 ml se naváží 2 g analyzovaného vzorku.
- 6.1.2 Přidají se dvě kapky 2 N kyseliny sírové (4.4) a 2 ml Schiffova činidla (4.6) (použité činidlo musí být při použití naprosto bezbarvé).
- Protřepe se a nechá stát pět minut.
- 6.1.3 Objeví-li se do pěti minut růžové nebo lila zbarvení, je přítomen formaldehyd v množství vyšším než 0,01 % a musí být stanoven postupem podle bodu 6.2 a v případě potřeby postupem podle bodu 6.3.
- 6.2 **Kolorimetrické stanovení pomocí pentan-2,4-dionu**
- 6.2.1 *Roztok vzorku*
- 6.2.1.1 Do odměrné baňky na 100 ml se s přesností na 0,001 g naváží množství analyzovaného vzorku (m gramů) odpovídající očekávanému obsahu formaldehydu asi 150 mikrogramů.
- 6.2.1.2 Doplní se na 100 ml demineralizovanou vodou a promíchá.
- 6.2.1.3 Do Erlenmeyerovy baňky na 50 ml se přidá:
- 10,00 ml roztoku podle bodu 6.2.1.2,
- 5,00 ml činidla obsahujícího pentan-2,4-dion (4.7),
- demineralizovaná voda na celkový objem 30 ml.
- 6.2.2 *Srovnávací roztok*
- Eventuální rušivý vliv základního zbarvení analyzovaného vzorku se odstraní použitím tohoto referenčního roztoku.
- Do Erlenmeyerovy baňky na 50 ml se přidá:
- 10,00 ml roztoku podle bodu 6.2.1.2,
- 5,00 ml roztoku referenčního činidla (4.15),
- demineralizovaná voda na celkový objem 30 ml.
- 6.2.3 *Roztok pro slepý pokus*
- Do Erlenmeyerovy baňky na 50 ml se přidá:
- 5,00 ml činidla obsahujícího pentan-2,4-dion (4.7),
- demineralizovaná voda na celkový objem 30 ml.
- 6.2.4 *Stanovení*
- 6.2.4.1 Baňky podle bodů 6.2.1.3, 6.2.2 a 6.2.3 se protřepou a ponoří se přesně na 10 minut do vodní lázně vyhřáté na 60 °C. Nechají se dvě minuty chladnout v lázni s ledovou vodou.

- 6.2.4.2 Obsah se převede do dělicích nálevek na 50 ml obsahujících 10 ml butan-1-olu (4.3). Každá baňka se vypláchne 3 až 5 ml vody a výplachy se přidají do dělicích nálevek. Směs se přesně 30 sekund důkladně třepe. Fáze se nechají oddělit.
- 6.2.4.3 Obsah se zfiltruje do měřicích kyvet přes filtr pro separaci fází. Odstředění (pět minut při 5000 ot./min) je méně praktické a trvá déle.
- 6.2.4.4 Změří se absorbance (A_1) extraktu roztoku vzorku podle bodu 6.2.1.3 proti extraktu srovnávacího roztoku 6.2.2. při 410 nm.
- 6.2.4.5 Obdobně se změní extrakt roztoku slepého pokusu (A_2) podle bodu 6.2.3 proti butan-1-olu.

Poznámka

Všechny tyto operace musí být provedeny do 25 minut od okamžiku, kdy byly Erlenmeyerovy baňky vloženy do lázně vyhřáté na 60 °C.

6.2.5 Kalibrační křivka

6.2.5.1 Do Erlenmeyerovy baňky na 50 ml se přidá:

5 ml standardního roztoku (4.13),

5 ml činidla obsahujícího pentan-2,4-dion (4.7),

demineralizovaná voda na celkový objem 30 ml.

6.2.5.2 Postupuje se tak, jak je popsáno v bodu 6.2.4.5, změní se absorbance proti butan-1-olu (4.3).

6.2.5.3 Postup se opakuje s 10, 15, 20 a 25 ml standardního roztoku.

6.2.5.4 Nulová hodnota se získá postupem podle bodu 6.2.4.5.

6.2.5.5 Po odečtení nulové hodnoty (6.2.4.5) se sestrojí kalibrační křivka ze všech absorbancí získaných podle bodů 6.2.5.2 a 6.2.5.3. Beerův zákon platí až do 30 μg formaldehydu.

6.3 Stanovení pomocí hydrogensířčitanu

6.3.1 Příprava analyzovaného vzorku

6.3.1.1 Pro zkoušku

Do vytárované kádinky se s přesností na 0,001 g naváží množství analyzovaného vzorku (m gramů) odpovídající očekávanému obsahu 3 až 20 mg formaldehydu.

6.3.1.2 Pro srovnávací zkoušku

Obdobným způsobem se naváží vzorek pro srovnávací zkoušku (m gramů).

6.3.2 Stanovení

6.3.2.1 Do kádinky na 100 ml se odměří 50 ml 0,1 M roztoku sířčitanu sodného (4.5) a přidá se 10 ml 0,1 N kyseliny sírové (4.8). Protřepe se.

6.3.2.2 Kádinka se ponoří do směsi ledu a soli tak, aby se teplota celku udržela na + 2 °C. Přilije se analyzovaný vzorek 6.3.1.1.

6.3.2.3 Rychle se potenciometricky titruje 0,1 N hydroxidem sodným (4.9) za neustálého třepání a udržování teploty mezi + 2 °C a + 4 °C (bod ekvivalence leží mezi pH 9 a 11). Spotřebovaný objem 0,1 N hydroxidu sodného (4.9) se označí jako V_1 .

6.3.3 Slepý pokus

Roztok dodatečně připravený podle bodu 6.3.2.1 se titruje za podmínek popsanych v bodech 6.3.2.

Spotřebovaný objem 0,1 N hydroxidu sodného (4.9) se označí jako V_2 .

6.3.4 Srovnávací zkouška

Acidita nebo alkalita analyzovaného vzorku m' se stanoví potenciometrickou titrací 0,1 N roztokem hydroxidu sodného (4.9) nebo 0,1 N kyseliny sírové (4.8). Spotřebovaný objem 0,1 N hydroxidu sodného nebo 0,1 N kyseliny sírové se označí jako v' .

6.3.5 Poznámky

Prísne dodržení předepsaných podmínek je důležité.

Stanovení je možno provést za přítomnosti thymolftaleinu (4.14) jako indikátoru.

7. VYJÁDŘENÍ VÝSLEDKŮ

7.1 Výpočet pro kolorimetrickou metodu

7.1.1 A_2 se odečte od A_1 a z kalibrační křivky (6.2.5.5) se v mikrogramech odečte množství formaldehydu C v roztoku analyzovaného vzorku (6.2.1.3).

7.1.2 S pomocí následujícího vzorce se vypočte obsah formaldehydu ve vzorku v hmotnostních procentech (% m/m):

$$\text{obsah formaldehydu } v \% = \frac{C}{10^3 \times m}$$

7.2 Výpočet pro titrační metodu s hydrogensířičitanem

Spotřebovaný objem 0,1 N hydroxidu sodného (4.9) nebo 0,1 N kyseliny sírové (4.8) se vztáhne na hmotnost m :

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

Pro neutrální prostředek je hodnota v samozřejmě nulová.

7.2.1 V případě kyselého prostředku:

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

7.2.2 V případě alkalického prostředku:

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

7.3 Poznámka

Jestliže se výsledky obou metod liší, přijme se pouze nižší hodnota.

8. OPAKOVATELNOST (!)

Při obsahu formaldehydu 0,2 % by neměl rozdíl dvou stanovení provedených současně se stejným vzorkem překročit 0,005 % pro kolorimetrickou metodu a 0,05 % pro hydrogensířičitanovou metodu.

(!) Viz norma ISO 5725.

V. STANOVENÍ RESORCINOLU V ŠAMPONECH A VLASOVÝCH LOTIONECH

1. ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ

V této metodě je specifikováno stanovení resorcinolu v šamponech a vlasových lotionech plynovou chromatografií. Metoda je vhodná pro koncentrace od 0,1 do 2,0 hmotnostních procent vzorku.

2. DEFINICE

Obsah resorcinolu ve vzorku stanovený touto metodou se vyjádří v hmotnostních procentech.

3. PODSTATA METODY

Resorcinol a 3,5dihydroxytoluen (5methylresorcinol) přidávaný jako vnitřní standard se ze vzorku oddělí chromatografií na tenké vrstvě. Obě sloučeniny se izolují seškrabáním jejich skvrn z horní vrstvy desky a extrakcí methanolem. Nakonec se vyextrahované sloučeniny vysuší, podrobí silylaci a stanoví se plynovou chromatografií.

4. REAKČNÍ ČINIDLA

Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a.

4.1 25 % kyselina chlorovodíková (m/m)

4.2 Methanol

4.3 Ethanol 96 % (v/v)

4.4 Silikagelové desky pro chromatografii na tenké vrstvě připravené k použití (plastové nebo hliníkové) s fluorescenčním indikátorem. Desky se deaktivují následujícím postupem: běžná silikagelová deska se nastříká vodou, dokud se povrch neleskne. Nastříkané desky se nechají schnout při pokojové teplotě jednu až tři hodiny.

Poznámka

Bez deaktivace může docházet ke ztrátám resorcinolu v důsledku ireverzibilní adsorpce na silikagelu.

4.5 Vytvájecí rozpouštědlo: aceton – chloroform – kyselina octová (20: 75: 5 objemově).

4.6 Standardní roztok resorcinolu: rozpustí se 400 mg resorcinolu ve 100 ml 96 % ethanolu (4.3) (1 ml odpovídá 4000 µg resorcinolu).

4.7 Roztok vnitřního standardu: rozpustí se 400 mg 3,5dihydroxytoluenu (DHT) ve 100 ml 96 % ethanolu (4.3) (1 ml odpovídá 4000 µg DHT).

4.8 Směs standardů: v odměrné baňce na 100 ml se smíchá 10 ml roztoku 4.6 a 10 ml roztoku 4.7, doplní se po rysku 96 % ethanolom (4.3) a promíchá (1 ml roztoku odpovídá 400 µg resorcinolu a 400 µg DHT).

4.9 Silylační činidla:

4.9.1 N,O-bis-(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA)

4.9.2 Hexamethyldisilazan (HMDS)

4.9.3 Trimethylchlorsilan (TMCS)

5. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

5.1 Běžné vybavení pro chromatografii na tenké vrstvě a plynovou chromatografii

5.2 Skleněné laboratorní nádoby

6. POSTUP

6.1 Příprava vzorku

6.1.1 Do kádinky na 150 ml se přesně naváží zkušební vzorek (m gramů) výrobku, který obsahuje asi 20 až 50 mg resorcinolu.

6.1.2 Okyselí se kyselinou chlorovodíkovou (4.1) do kyselé reakce (je potřeba přibližně 2 až 4 ml), přidá se 10 ml (40 mg DHT) roztoku vnitřního standardu (4.7) a promíchá se. Ethanolem (4.3) se převede do odměrné baňky na 100 ml, doplní se ethanolem po rysku a promíchá.

6.1.3 250 µl roztoku (6.1.2) se nanese na deaktivovanou desku se silikagelem (4.4) jako nepřerušovaná linie o délce přibližně 8 cm. Je třeba dbát na to, aby linie byla co nejúžší.

6.1.4 Na stejnou desku se stejným způsobem (6.1.3) nanese 250 µl směsi standardů (4.8).

6.1.5 Do dvou bodů startovací linie se nanese po 5 µl roztoků 4.6 a 4.7 k usnadnění lokalizace skvrn po vyvolání.

6.1.6 Deska se vyvíjí v nenasyčené komoře naplněné vyvíjecím rozpouštědlem 4.5, dokud čelo rozpouštědla nedosáhne vzdálenosti 12 cm od startovací linie; obvykle to trvá asi 45 minut. Deska se usuší na vzduchu a zóna resorcinolu/DHT se lokalizuje pod krátkovlnným UV světlem (254 nm). Obě tyto sloučeniny mají přibližně stejnou hodnotu R_f. Poloha pásů se vyznačí tužkou ve vzdálenosti 2 mm od vnějšího tmavého rozhraní pásů. Tyto zóny se z desky odstraní a adsorbenty každého pásu se shromáždí v lahvi na 10 ml.

6.1.7 Adsorbent obsahující vzorek a adsorbent obsahující směs standardů se extrahují následujícím způsobem:

přidají se 2 ml methanolu (4.2) a extrahuje se jednu hodinu za neustálého míchání. Směs se zfiltruje a extrakce se opakuje po dobu dalších 15 minut se 2 ml methanolu.

6.1.8 Extrakty se spojí a rozpouštědlo se nechá přes noc odpařit ve vakuovém exsikátoru naplněném vhodným sušicím prostředkem. Nezahřívá se.

6.1.9 Odparky (6.1.8) se silylují způsobem popsáním v bodu 6.1.9.1 nebo 6.1.9.2.

6.1.9.1 Mikrostríkačkou se přidá 200 µl BSTFA (4.9.1) a směs se nechá v uzavřené nádobě 12 hodin při pokojové teplotě.

6.1.9.2 Mikrostríkačkou se postupně přidá 200 µl HMDS (4.9.2) a 100 µl TMCS (4.9.3), směs se zahřívá v uzavřené nádobě 30 minut na 60 °C. Směs se ochladí.

6.2 Plynová chromatografie

6.2.1 Chromatografické podmínky

Kolona musí poskytovat rozlišení R rovné nebo lepší než 1,5:

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

kde:

r_1 a r_2 = retenční časy dvou píků v minutách,

w_1 a w_2 = šířky píků v polovině výšky píků v mm,

d' = rychlost posuvu papíru v mm za minutu.

Následující kolona a podmínky pro plynovou chromatografii se ukázaly jako vhodné:

Materiál	kolony:	korozivzdorná ocel
	Délka	200 cm
	Vnitřní průměr:	~ 3 mm
	Náplň:	10 % OV17 na Chromosorbu WAW, 100 až 120 mesh
Plamenový ionizační detektor		
Teplotní režim		
	Kolona:	185 °C (izotermální)
	Detektor:	250 °C
	Nástřík:	250 °C
	Nosný plyn:	dušík
	Průtok:	45 ml/min

Průtoky vodíku a vzduchu se nastaví podle pokynů výrobce.

- 6.2.2 Do plynového chromatografu se nastříkne 1 až 3 µl roztoků připravených podle bodu 6.1.9. Pro každý roztok (6.1.9) se provede pět nástříků, změří se plochy píků, vypočte se průměr a poměr ploch píků: S = plocha píku resorcinolu/plocha píku DHT.

7. VÝPOČET

Koncentrace resorcinolu ve vzorku vyjádřená v hmotnostních procentech (% m/m) je dána vztahem:

$$\% \text{ resorcinolu} = \frac{4}{M} \times \frac{S_{\text{vzorku}}}{S_{\text{standardní směsi}}}$$

kde:

- M = hmotnost zkušební vzorku v gramech (6.1.1),
 S_{vzorku} = průměrná plocha píku podle bodu 6.2.2 pro roztok vzorku,
 $S_{\text{standardní směsi}}$ = průměrná plocha píku podle bodu 6.2.2 pro směs standardů.

8. OPAKOVATELNOST ⁽¹⁾

Pro obsah resorcinolu asi 0,5 % by neměla absolutní hodnota rozdílu dvou stanovení provedených současně se stejným vzorkem překročit 0,025 %.

VI. STANOVENÍ METHANOLU VZHEDEM K ETHANOLU NEBO PROPAN-2-OLU

1. ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ

V metodě je popsána analýza methanolu ve všech typech kosmetických prostředků (včetně aerosolů) plynovou chromatografií.

Metodou je možno stanovit relativní hladiny od 0 do 10 %.

2. DEFINICE

Obsah methanolu stanovený podle této metody se vyjadřuje v hmotnostních procentech methanolu vzhledem k ethanolu nebo propan-2-olu.

3. PODSTATA METODY

Stanovení se provádí plynovou chromatografií.

⁽¹⁾ Viz norma ISO 5725.

4. REAKČNÍ ČINIDLA

Používají se reakční činidla čistoty p.a.

4.1 Methanol

4.2 Absolutní ethanol

4.3 Propan-2-ol

4.4 Chloroform zbavený alkoholů promytím vodou

5. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

5.1 Plynový chromatograf:

s tepelně vodivostním detektorem pro aerosolové vzorky,

s plamenovým ionizačním detektorem pro jiné než aerosolové vzorky.

5.2 Odměrné baňky na 100 ml

5.3 Pipety na 2 ml, 20 ml a 0 až 1 ml

5.4 Mikrostříkačky na 0 až 100 μ l a 0 až 5 μ l

a (pouze pro aerosolové vzorky) speciální plynotěsná injekční stříkačka s posuvným ventilem (viz obrázek 5⁽¹⁾) postup odběru vzorků).

6. POSTUP

6.1 Příprava vzorku

6.1.1 Vzorky z výrobků v obalech na aerosoly se odebírají postupem podle kapitoly II přílohy ke směrnici Komise 80/1335/EHS ze dne 22. prosince 1980⁽¹⁾ a poté se analyzují plynovou chromatografií za podmínek popsaných v bodu 6.2.1.

6.1.2 Vzorky výrobků, které nejsou v obalech na aerosoly, odebírané postupem podle výše uvedené kapitoly II se zředí vodou na koncentraci 1 až 2 % ethanolu či propan-2-olu a poté se analyzují plynovou chromatografií za podmínek popsaných v bodu 6.2.2.

6.2 Plynová chromatografie

6.2.1 Pro aerosolové vzorky se použije tepelně vodivostní detektor.

6.2.1.1 Náplní kolony je 10 % Hallcomid M18 na Chromosorbu WAW, 100 až 200 mesh.

6.2.1.2 Kolona musí poskytovat rozlišení R rovné nebo lepší než 1,5:

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

kde:

r_1 a r_2 = retenční časy dvou píků v minutách,

w_1 a w_2 = šířky píků v polovině výšky píků v mm,

d' = rychlost posuvu papíru v mm za minutu.

6.2.1.3 Tohoto rozlišení je možno dosáhnout za následujících podmínek:

Materiál	kolony:	korozivzdorná ocel
	Délka:	3,5 metru
	Průměr:	3 mm
	Proud můstkem tepelně vodivostního detektoru (katarometru):	150 mA

⁽¹⁾ Úř. věst. L 383, 31.12.1980, s. 27.

Nosný plyn:	helium
Tlak:	2,5 bar
Průtok:	45 ml/min
Teplotní režim:	
Nástřik:	150 °C
Detektor:	150 °C
Kolona:	65 °C

Měření plochy píků je možno vylepšit elektronickou integrací.

6.2.2 Jiné než aerosolové vzorky:

6.2.2.1 Náplň kolony je Chromosorb 105 nebo Porapak QS; použije se plamenový ionizační detektor.

6.2.2.2 Kolona musí poskytovat rozlišení R rovné nebo lepší než 1,5:

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

kde:

- r_1 a r_2 = retenční časy dvou píků v minutách
 w_1 a w_2 = šířky píků v polovině výšky píků v mm,
 d' = rychlost posuvu papíru v mm za minutu.

6.2.2.3 Tohoto rozlišení je možno dosáhnout za následujících podmínek:

Materiál kolony:	korozivzdorná ocel
Délka:	2 metry
Průměr:	3 mm
Citlivost elektrometru:	8×10^{-10} A

Plyny:

Nosný plyn:	dusík
Tlak:	2,1 bar
Průtok:	40 ml/min
Pomocný plyn:	vodík
Tlak:	1,5 bar
Průtok:	20 ml/min

Teplotní režim:

Nastřikovač:	150 °C
Detektor:	230 °C
Kolona:	120 až 130 °C

7. KALIBRAČNÍ GRAF

7.1 Pro plynovou chromatografii podle bodu 6.2.1 (náplň kolony Hallcomid M18) se použijí následující standardní směsi. Tyto směsi se připraví odměřením pomocí pipet, ale přesné množství se stanoví zvážením pipety nebo baňky po každém přidání.

Relativní koncentrace (% m/m):	Methanol (ml)	Ethanol nebo propan2ol (ml)	Doplněno chloroformem na objem
Přibližně 2,5 %	0,5	20	100 ml
Přibližně 5,0 %	1,0	20	100 ml
Přibližně 7,5 %	1,5	20	100 ml
Přibližně 10,0 %	2,0	20	100 ml

Do chromatografu se nastříkují 2 až 3 μ l za podmínek uvedených v bodu 6.2.1.

Pro každou směs se vypočtou poměry ploch píků (methanol/ethanol) nebo (methanol/propan2ol). Sestrojí se kalibrační graf vynesemím:

na osu x: množství methanolu vzhledem k ethanolu nebo propan-2-olu v %

na osu y: poměr ploch píků (methanol/ethanol) nebo (methanol/propan-2-ol).

- 7.2 Pro plynovou chromatografii podle bodu 6.2.2 (náplň kolony Porapak QS nebo Chromosorb 105) se použijí následující standardní směsi. Tyto směsi se připraví odměřením pomocí pipet, ale přesné množství se stanoví zvážením pipety nebo baňky po každém přidání.

Relativní koncentrace (% m/m):	Methanol (μl)	Ethanol nebo propan2ol (ml)	Doplněno vodou na objem
Přibližně 2,5 %	50	2	100 ml
Přibližně 5,0 %	100	2	100 ml
Přibližně 7,5 %	150	2	100 ml
Přibližně 10,0 %	200	2	100 ml

Do chromatografu se nastříkují 2 až 3 μl za podmínek uvedených v bodu 6.2.2.

Pro každou kalibrační směs se vypočtou poměry ploch píků (methanol/ethanol) nebo (methanol/propan2ol) a sestrojí se kalibrační graf vynesením:

na osu x: množství methanolu vzhledem k ethanolu nebo propan-2-olu v %

na osu y: poměr ploch píku (methanol/ethanol) nebo (methanol/propan-2-ol).

- 7.3 Kalibrační graf musí být přímkový.

8. OPAKOVATELNOST (1)

Při relativním obsahu 5 % methanolu vzhledem k ethanolu nebo propan2olu by neměl rozdíl dvou stanovení provedených současně se stejným vzorkem překročit 0,25 %.

(1) Viz norma ISO 5725.