

31985L0490

L 295/30

EUROOPA ÜHENDUSTE TEATAJA

7.11.1985

NELJAS KOMISJONI DIREKTIIV,**11. oktoober 1985,****kosmeetikatoodete koostise kontrolliks vajalikke analüüsimeetodeid käsitlevate liikmesriikide õigusaktide ühtlustamise kohta**

(85/490/EMÜ)

EUROOPA ÜHENDUSTE KOMISJON,

võttes arvesse Euroopa Majandusühenduse asutamislepingut,

võttes arvesse nõukogu 27. juuli 1976. aasta direktiivi 76/768/EMÜ liikmesriikides kosmeetikatoodete kohta vastuvõetud õigusaktide ühtlustamise kohta, ⁽¹⁾ viimati muudetud direktiiviga 85/391/EMÜ, ⁽²⁾ eriti selle artikli 8 lõiget 1,

ning arvestades, et:

direktiiviga 76/768/EMÜ on ette nähtud kosmeetikatoodete ametlik katsetamine, et tagada kosmeetikatoodete koostist käsitlevate ühenduse õigusnormidega ettenähtud tingimuste täitmine;

kõik vajalikud analüüsimeetodid tuleks sätestada niipea kui võimalik; kõnealuse eesmärgi saavutamiseks on juba astutud kolm sammu, määratledes teatavad meetodid komisjoni direktiivides 80/1335/EMÜ, ⁽³⁾ 82/434/EMÜ ⁽⁴⁾ ja 83/514/EMÜ ⁽⁵⁾ ning neljanda sammuna tuleks määratleda meetodid, mis käsitlevad glütserool-1-(4-aminobensoadi) identifitseerimist ja määramist, klorobutanooli määramist, kiniini identifitseerimist ja määramist, anorgaaniliste sulfitite ja vesiniksulfitite identifitseerimist ja määramist, leelismetallide kloraatide identifitseerimist ja määramist ning naatriumjodaadi identifitseerimist ja määramist;

käesolevas direktiivis sätestatud meetmed on kooskõlas direktiivi 76/768/EMÜ kohandamist tehnika arenguga käsitleva komitee arvamusega,

ON VASTU VÕTNUD KÄESOLEVA DIREKTIIVI:

Artikkel 1

Liikmesriigid võtavad kõik vajalikud meetmed tagamaks, et kosmeetikatoodete ametliku katsetamise käigus:

- glütserool-1-(4-aminobensoadi) identifitseerimine ja määramine,
 - klorobutanooli määramine,
 - kiniini identifitseerimine ja määramine,
 - anorgaaniliste sulfitite ja vesiniksulfitite identifitseerimine ja määramine,
 - leelismetallide kloraatide identifitseerimine ja määramine ning
 - naatriumjodaadi identifitseerimine ja määramine
- viiakse läbi kooskõlas lisas kirjeldatud meetoditega.

Artikkel 2

Liikmesriigid jõustavad käesoleva direktiivi järgimiseks vajalikud õigus- ja haldusnormid hiljemalt 31. detsembriks 1986.

Liikmesriigid teatavad nendest viivitamata komisjonile.

Artikkel 3

Käesolev direktiiv on adresseeritud liikmesriikidele.

Brüssel, 11. oktoober 1985

*Komisjoni nimel**komisjoni liige*

Stanley CLINTON-DAVIS

⁽¹⁾ EÜT L 262, 27.9.1976, lk 169.⁽²⁾ EÜT L 224, 22.8.1985, lk 40.⁽³⁾ EÜT L 383, 31.12.1980, lk 27.⁽⁴⁾ EÜT L 185, 30.6.1982, lk 1.⁽⁵⁾ EÜT L 291, 24.10.1983, lk 9.

LISA

GLÜTSEROOL-1-(4-AMINOBEENSOAADI) IDENTIFITSEERIMINE JA MÄÄRAMINE

A. IDENTIFITSEERIMINE

1. RAKENDATAVUS JA RAKENDUSALA

Käesoleva meetodiga määratakse kindlaks alfa-monoglütserüül-4-aminobensoaat (glütserool-1-(4-aminobensoaat)). Samuti määratakse sellega etüül-4-aminobensoaat (bensokaiin INN), mis võib esineda lisandina.

2. PÕHIMÕTE

Identifitseeritakse õhekihikromatograafia (ÕKK) abil fluorestsentsindikaatoriga silikageelplaadil ja vaba primaarne amiinirühm määratakse kindlaks plaadile moodustuva diasovärvi alusel.

3. REAKTIIVID

Kõik reaktiivid peaksid olema analüütiliselt puhtad.

3.1. Lahustisegu: tsükloheksaan/propaan-2-ool/stabiliseeritud diklorometaan (mahuvahekorras 48:64:9).

3.2. Eluent: petrooleeter (40-60)/benseen/atsetoon/ammooniumhüdrosiidi lahus (vähemalt 25 % NH₃): mahuvahekorras 35:35:35:1.

- 3.3. Ilmutamislahus:
- naatriumnitrit: 1 g lahustatakse 100 ml 1 M soolhappes (valmistatakse vahetult enne kasutamist);
 - 2-naftool: 0,2 g lahustatakse 100 ml 1 M kaaliumhüdrosiidis.

3.4. Standardlahused:

alfa-monoglütserüül-4-aminobensoaat: 0,05 g 100 ml-s punktis 3.1 nimetatud lahustisegus;

etüül-4-aminobensoaat: 0,05 g 100 ml-s punktis 3.1 nimetatud lahustisegus.

3.5. Silikageelplaadid 60 F254, kihi paksus 0,25 mm, mõõtmed 200 × 200 mm.

4. SEADMED

4.1. Tavalised ÕKK-seadmed.

4.2. Ultrahelivann.

4.3. Filter *Millipore filter FH* 0,5 µm või samaväärne.

5. ANALÜÜSI KÄIK

5.1. **Proovi ettevalmistamine**

1,5 g analüüsivat toodet kaalutakse 10-ml suletavasse mõõtekolbi. Täiendatakse märgini punktis 3.1 nimetatud lahustiga. Suletakse ja jäetakse üheks tunniks toatemperatuurile ultrahelivanni (4.2). Filtreeritakse läbi membraanfiltritri (4.3) ja filtraati kasutatakse kromatografeerimiseks.

5.2. **Õhekihikromatograafia**

10 µl proovilahust (5.1) ja mõlemat standardlahust (3.4) kantakse plaadile (3.5).

Elueeritakse eelnevalt punktis 3.2 nimetatud lahustiga küllastatud kambris seni, kuni lahusti piir on tõusnud 150 mm-ni. Plaadil lastakse kuivada toatemperatuuril.

5.3. **Ilmutamine**

5.3.1. Plaati vaadeldakse UV-valguses 254 nm juures.

5.3.2. Täielikult kuivanud plaadile pihustatakse punkti 3.3 alapunktis a nimetatud lahust.

Lastakse kuivada toatemperatuuril üks minut ja sellele pihustatakse kohe punkti 3.3 alapunktis b nimetatud lahust.

Plaati kuivatatakse kuivatuskapis temperatuuril 60 °C. Plaadile ilmuvad oranžid laigud. Alfa-monoglütserüül-4-aminobensoaat: R_f 0,07; etüül-4-aminobensoaat: R_f 0,55.

B. MÄÄRAMINE

1. RAKENDATAVUS JA RAKENDUSALA

Käesoleva meetodiga määratakse alfa-monoglütserüül-4-aminobensoaat. Samuti määratakse sellega etüül-4-aminobensoaat. Meetodit ei ole võimalik kasutada, kui alfa-monoglütserüül-4-aminobensoaadi sisaldus on suurem kui 5 massiprotsenti ja etüül-4-aminobensoaadi sisaldus on suurem kui 1 massiprotsent.

2. MÄÄRATLUS

Käesoleva meetodiga mõõdetud alfa-monoglütserüül-4-aminobensoaadi ja etüül-4-aminobensoaadi sisaldust tootes väljendatakse massiprotsentides.

3. PÕHIMÕTE

Analüüsitava toode suspendeeritakse metanoolis ja pärast proovi asjakohast töötlemist määratakse sisaldus kõrgefektiivse vedelikromatograafia (HPLC) abil.

4. REAKTIIVID

Kõik reaktiivid peaksid olema analüütiliselt puhtad ja peaksid vajaduse korral sobima kõrgefektiivseks vedelikromatograafiaks.

4.1. Metanool.

4.2. Kaaliumdivesinikortofosfaat (KH_2PO_4).4.3. Tsinkdiatsetaat ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).4.4. Äädikhape ($d \frac{20}{4} = 1,05$).4.5. Tetrakaaliumheksatsüanoferraat ($\text{K}_4(\text{Fe}(\text{CN})_6) \cdot 3\text{H}_2\text{O}$).

4.6. Etüül-4-hüdroksübensoaat.

4.7. Alfa-monoglütserüül-4-aminobensoaat.

4.8. Etüül-4-aminobensoaat.

4.9. Fosfaatpuhverlahus (0,02 M): 2,72 g kaaliumdivesinikortofosfaati (4.2) lahustatakse ühes liitris vees.

4.10. Eluent: fosfaatpuhverlahus (4.9), metanool (4.1) mahuvahekorras 61:39.

Liikva faasi koostist võib muuta, et saavutada lahutusteguri R väärtuseks vähemalt 1,5.

$$R = 2 \frac{d'R_2 - d'R_1}{W_1 + W_2}$$

kus:

R_1 ja R_2 = piikide retentsiooniajad minutites,

W_1 ja W_2 = piikide laiused millimeetrites poolkõrgusel,

d' = lindi kiirus millimeetrites minutis.

4.11. Alfa-monoglütserüül-4-aminobensoaadi põhilahus: kaalutakse umbes 40 mg alfa-monoglütserüül-4-aminobensoaati ja viiakse 100-ml mõõtekolbi. Lahustatakse 40 ml metanoolis (4.1). Täiendatakse puhverlahusega (4.9) määrgini ja segatakse.

4.12. Etüül-4-aminobensoaadi põhilahus: kaalutakse umbes 40 mg etüül-4-aminobensoaati ja viiakse 100-ml mõõtekolbi. Lahustatakse 40 ml metanoolis (4.1). Täiendatakse puhverlahusega (4.9) määrgini ja segatakse.

4.13. Sisestandardi lahus: kaalutakse umbes 50 mg etüül-4-hüdroksübensoaati (4.6), viiakse 100-ml mõõtekolbi, lahustatakse 40 ml metanoolis (4.1), täiendatakse puhverlahusega (4.9) määrgini ja segatakse.

4.14. Standardlahused: valmistatakse neli standardlahust, lahustades 100 ml eluendis (4.10) vastavalt järgmisele tabelile:

Standardlahus	Alfa-monoglütserüül-4-aminobensoaat		Etüül-4-aminobensoaat		Etüül-4-hüdroksübensoaat	
	($\mu\text{g}/\text{ml}$) (*)	ml (4.11)	($\mu\text{g}/\text{ml}$) (*)	ml (4.12)	($\mu\text{g}/\text{ml}$) (*)	ml (4.13)
I	8	2	8	2	50	10
II	16	4	12	3	50	10
III	24	6	16	4	50	10
IV	40	10	20	5	50	10

(*) Need väärtused on orienteeruvad ning vastavad punktides 4.11, 4.12 ja 4.13 esitatud täpsetele massidele.

NB: Kõnealuseid lahuseid võib valmistada teisiti.

- 4.15. I Carrez' lahust: 25,5 g tetrakaaliumheksatsüanoferraati (4.5) lahustatakse vees ja täiendatakse 250 ml-ni.
- 4.16. II Carrez' lahust: 54,9 g tsinkdiatsetaati (4.3) ja 7,5 ml äädikhapet (4.4) lahustatakse vees ja täiendatakse 250 ml-ni.
- 4.17. Merck Lichrosorb RP-18 või samaväärne, osakeste keskmine suurus 5 µm.

5. SEADMED

- 5.1. Tavalised laboriseadmed.
- 5.2. Kõrgefektiivne vedelikromatograaf muudetava lainepikkusega UV-detektoriga ja temperatuurile 45 °C reguleeritud kolonni termostaadiga.
- 5.3. Roostevaba terasest kolonn: pikkus: 250 mm; siseläbimõõt: 4,6 mm; kolonni täidis: Lichrosorb RP - 18 (4.17).
- 5.4. Ultrahelivann.

6. ANALÜÜSI KÄIK

6.1. Proovi ettevalmistamine

- 6.1.1. 100-ml keeduklaasi kaalutakse 1 g proovi ja lisatakse 10 ml metanooli (4.1).
- 6.1.2. Keeduklaas asetatakse 20 minutiks ultrahelivanni (5.4), et proov suspendeerida. Sel viisil saadud suspensioon viiakse kvantitatiivselt 100-ml mõõtekolbi maksimaalselt 75 ml eluendiga (4.10).

Lisatakse järjest 1 ml I Carrez' lahust (4.15) ja 1 ml II Carrez' lahust (4.16) ning segatakse pärast mõlemat lisamist. Täiendatakse eluendiga (4.10) määrgini, segatakse uuesti ja filtreeritakse läbi kurdfiltrii.

- 6.1.3. 50-ml mõõtekolbi pipeteeritakse 3,0 ml punkti 6.1.2 kohaselt saadud filtraati ja 5,0 ml sisestandardi lahust (4.13). Täiendatakse eluendiga (4.10) määrgini ja segatakse. Kõnealusel viisil saadud lahust kasutatakse punktis 6.2 kirjeldatud kromatograferimiseks.

6.2. Kromatograafia

- 6.2.1. Liikuva faasi (4.10) voolukiiruseks reguleeritakse 1,2 ml minutis ja kolonni temperatuuriks 45 °C.
- 6.2.2. Detektor (5.2) reguleeritakse lainepikkusele 274 nm.
- 6.2.3. Mikrosüstlaga süstitakse kromatograafi vähemalt kaks korda 20 ml lahust (6.1.3) ja mõõdetakse piikide pindalad.

6.3. Kalibreerimiskõver

- 6.3.1. Süstitakse 20 µl kõiki standardlahuseid (4.14) ja mõõdetakse piikide pindalad.
- 6.3.2. Iga kontsentratsiooni jaoks arvutatakse alfa-monoglütserüül-4-aminobensoadi ja sisestandardi piikide pindalade suhe. Kõnealusel suhe kantakse abstsissiteljele ja vastavate masside suhe ordinaatteljele.
- 6.3.3. Samamoodi toimitakse etüül-4-hüdroksübensoadi puhul.

7. ARVUTAMINE

- 7.1. Punkti 6.3 kohaselt saadud kalibreerimiskõveralt loetakse masside suhted (RP1, RP2), mis vastavad punkti 6.2.3 kohaselt arvutatud piikide pindalade suhetele, kus

RP1 = alfa-monoglütserüül-4-aminobensoadi mass/etüül-4-hüdroksübensoadi mass,

RP2 = etüül-4-aminobensoadi mass/etüül-4-hüdroksübensoadi mass.

- 7.2. Sel viisil saadud masside suhte alusel arvutatakse alfa-monoglütseriül-4-aminobensoaadi ja etiül-4-aminobensoaadi sisaldus massiprotsentides järgmiste valemite järgi:

$$R_p \text{ massiprotsent alfa-monoglütseriül-4-aminobensoaati} = RP1 \times RP1 \times \frac{q}{6 p}$$

$$R_p \text{ massiprotsent etiül-4-aminobensoaati} = RP2 \times RP2 \times \frac{q}{6 p}$$

q = punkti 4.12 kohaselt kaalutud etiül-4-hüdroksübensoaadi (sisestandard) kogus milligrammides,

p = punkti 6.1.1 kohaselt kaalutud proovi kogus grammides.

8. KORRATAVUS (1)

- 8.1. Kui alfa-monoglütseriül-4-aminobensoaadi sisaldus on 5 massiprotsenti, ei tohi ühest ja samast proovist samaaegselt tehtud kahe määramise tulemuste vahe ületada 0,25 %.
- 8.2. Kui etiül-4-aminobensoaadi sisaldus on 1 massiprotsent, ei tohi ühest ja samast proovist samaaegselt tehtud kahe määramise tulemuste vahe ületada 0,10 %.

9. MÄRKUSED

- 9.1. Enne analüüside tegemist kontrollitakse, kas proov sisaldab aineid, mille piigid võivad kromatogrammil kattuda sisestandardi (etiül-4-aminobensoaat) piigiga.
- 9.2. Et vevenduda segavate tegurite puudumises, korratakse määramist, muutes metanooli osa liikuvus faasis 10 % võrra.

KLOROBUTANOOLI MÄÄRAMINE

1. RAKENDATAVUS JA RAKENDUSALA

Käesolev meetod sobib klorobutanooli (INN) kuni 0,5 massiprotsendilise sisalduse määramiseks kõigis kosmeetikatoodetes, v.a aerosoolid.

2. MÄÄRATLUS

Käesoleva meetodiga mõõdetud klorobutanoolisaldust tootes väljendatakse massiprotsendina.

3. PÕHIMÕTE

Pärast analüüsitava toote asjakohast töötlemist toimub määramine gaasikromatograafiliselt, kasutades sisestandardina 2,2,2-trikloroetanooli.

4. REAKTIIVID

Kõik reaktiivid peaksid olema analüütiliselt puhtad.

- 4.1. Klorobutanool (1,1,1-trikloro-2-metüülpropan-2-ool).
- 4.2. 2,2,2-trikloroetanool.
- 4.3. Absoluutne alkohol.
- 4.4. Klorobutanooli standardlahus: 0,025 g 100 ml etanoolis (4.3) (m/v).
- 4.5. 2,2,2-trikloroetanooli standardlahus: 4 mg 100 ml etanoolis (4.3) (m/v).

5. SEADMED

- 5.1. Tavalised laboriseadmed.
- 5.2. Gaasikromatograaf elektronihaardedetektoriga, Ni 63.

6. ANALÜÜSI KÄIK

6.1. Proovi ettevalmistamine

Kaalutakse 0,1–0,3 g (p grammi) proovi. Viiakse 100-ml mõõtekolbi. Lahustatakse etanoolis (4.3), lisatakse 1 ml sisestandardi lahust (4.5) ja täiendatakse etanooliga (4.3) märgini.

(1) Standard ISO 5725.

6.2. Gaasikromatograafia tingimused

6.2.1. Analüüsiitingimused peavad tagama lahutusteguri R väärtuseks vähemalt 1,5.

$$R = 2 \frac{d'R_2 - d'R_1}{W_1 + W_2}$$

kus:

R_1 ja R_2 = piikide retentsiooniajad minutites,

W_1 ja W_2 = piikide laiused millimeetrites poolkõrgusel,

d' = lindi kiirus millimeetrites minutis.

6.2.2. Ettenähtud lahutusvõime annavad näiteks järgmised analüüsiitingimused:

Kolonn	I	II
Materjal	Klaas	Roostevaba teras
Pikkus	1,80 m	3 m
Läbimõõt	3 mm	3 mm
Statsionaarne faas	10 % Carbowax 20 M TPA Gaschrom Q-1, 80–100 mešši	5 % OV17 Chromosorb WAW DMCS, 80–100 mešši
Konditsioneerimine	2–3 päeva temperatuuril 190 °C	
Temperatuur:		
– aurusti	200 °C	150 °C
– kolonn	150 °C	100 °C
– detektor	200 °C	150 °C
Kandegaas	Lämmastik	Argoon, metaan (mahuvahekorras 95:5)
Voolukiirus	35 ml/min	35 ml/min

6.3. Standardköver

Viide 100-ml mõõtekolbi viiakse 1 ml standardlahust (4.5) ning vastavalt 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, ja 0,6 ml punktis 4.4 esitatud lahust, täiendatakse etanooliga (4.3) märgini ja segatakse. 1 µl kõiki kõnealuseid lahuseid süstitakse kromatograafi vastavalt punktis 6.2.2 kirjeldatud tingimustele ning koostatakse kalibreerimisköver, kandes abstsisssteljele klorobutanooli ja 2,2,2-trikloroetanooli masside suhte ning ordinaatteljele vastavate piikide pindalade suhte.

6.4. Süstitakse 1 µl punkti 6.1 kohaselt saadud lahust ja jätkatakse punktis 6.2.2 kirjeldatud tingimustel.

7. ARVUTAMINE

7.1. Standardköveral (6.3) arvutatakse klorobutanooli kogus a mikrogrammides punktis 6.1 esitatud lahuses.

7.2. Proovi klorobutanoolisisaldus arvutatakse järgmise valemi alusel:

$$\text{Klorobutanoolisisaldus massiprotsentides} = \frac{a \times 10^2}{p \times 10^6} = \frac{a}{p \times 10^4}$$

8. KORRATAVUS (*)

Kui klorobutanoolisisaldus on 0,5 massiprotsenti, ei tohiks ühest ja samast proovist samaaegselt tehtud kahe määramise tulemuste vahe ületada 0,01 %.

Märkus

Kui tulemus on võrdne lubatud maksimaalse lubatud sisaldusega või sellest suurem, tuleb kontrollida, et proovis ei esineks määramist segavaid aineid.

(*) Standard ISO 5725.

KINIINI IDENTIFITSEERIMINE JA MÄÄRAMINE

A. IDENTIFITSEERIMINE

1. RAKENDATAVUS JA RAKENDUSALA

Käesolev meetod on ette nähtud kiniini kindlakstegemiseks šampoonides ja juuksevedelikes.

2. PÕHIMÕTE

Identifitseeritakse õhekihikromatograafia (ÕKK) abil silikageelil. Kiniin tehakse kindlaks siniselt fluorestseeruva laigu järgi happelises keskkonnas 360 nm juures.

Täiendava kinnituse saamiseks võib fluorestsentsi kõrvaldada broomiaaurudega ja ammoniaagiaurudega tekitada kollakalt fluorestseeruva laigu.

3. REAKTIIVID

Kõik reaktiivid peaksid olema analüütiliselt puhtad.

3.1. Silikageelplaadid, fluorestsentsindikaatorita, kihi paksus 0,25 mm, mõõtmed 200 mm × 200 mm.

3.2. Eluent: toluen/dietüüleeter/diklorometaan/dietüülamiin (mahuvahekorras 20:20:20:8).

3.3. Metanool.

3.4. Väävelhape (96 %; $d \frac{20}{4} = 1,84$).

3.5. Dietüüleeter.

3.6. Ilmuti: 95 ml dietüüleetrile (3.5) lisatakse jahutatud nõus ettevaatlikult 5 ml väävelhapet (3.4).

3.7. Broom.

3.8. Ammooniumhüdrosiidi lahus (28 %; $d \frac{20}{4} = 0,90$).

3.9. Veevaba kiniin.

3.10. Standardlahus: mõõtekolbi kaalutakse hoolikalt umbes 100,0 mg veevaba kiniini (3.9) ja lahustatakse 100 ml metanoolis (3.3).

4. SEADMED

4.1. Tavalised ÕKK-seadmed.

4.2. Ultrahelivann.

4.3. Membraanfilter *Millipore filter FH 0,5 m* või samaväärne, sobiva filtreerimiseseadmega.

5. ANALÜÜSI KÄIK

5.1. Proovi ettevalmistamine

100-ml mõõtekolbi kaalutakse selline kogus proovi, mis eeldatavalt sisaldab umbes 100 mg kiniini, lahustatakse see ja täiendatakse metanooliga (3.3) märgini.

Kolb suletakse ja jäetakse üheks tunniks toatemperatuurile ultrahelivanni (4.2). Filtreeritakse (4.3) ja filtraati kasutatakse kromatograferimiseks.

5.2. Õhekihikromatograafia

Silikageelplaadile (3.1) viiakse 1,0 µl standardlahust (3.10) ja 1,0 µl proovilahust (5.1). Elueeritakse punktis 3.2 nimetatud lahusti abil eelnevalt lahustiaurudega (3.2) küllastatud kambris seni, kuni lahusti piir on tõusnud 150 mm-ni.

5.3. Ilmutamine

5.3.1. Plaat kuivatatakse toatemperatuuril.

5.3.2. Sellele pihustatakse punktis 3.6 nimetatud reaktiivi.

5.3.3. Jäetakse plaat üheks tunniks toatemperatuurile kuivama.

5.3.4. Uuritakse UV-lambi all lainepikkusel 360 nm. Kiniin on nähtav intensiivse sinakalt fluorestseeruva laiguna.

Järgmises tabelis on toodud näidiseina punktis 3.2 nimetatud lahustiga elueeritud kiniiniga seotud peamiste alkaloidide R_f väärtused.

Alkaloid	R_f
Kiniin	0,20
Kinidiin	0,29
Tsinhoniin	0,33
Tsinhoniidiin	0,27
Hüdrokiniidiin	0,17

- 5.3.5. Kiniini olemasolu täiendavaks kinnitamiseks asetatakse plaat umbes üheks tunniks broomiaurudesse (3.7). Fluorestseerumine kaob. Kui sama plaat asetatakse ammoniaagaurudesse (3.8), ilmuvad uuesti pruunid laigud ja kui vaadelda plaati UV-valguses 360 nm juures, võib täheldada kollakalt fluorestseerumist.

Avastamiskünnis: 0,1 µg kiniini.

B. MÄÄRAMINE

1. RAKENDATAVUS JA RAKENDUSALA

Käesolev meetod kirjeldab kiniini määramist. Seda võib kasutada, kui maksimaalne lubatud kiniinisaldus on 0,5 massiprotsenti šampoonides ja 0,2 % juuksevedelikes.

2. MÄÄRATLUS

Käesoleva meetodiga määratud kiniinisaldust tootes väljendatakse massiprotsendina.

3. PÕHIMÕTE

Pärist analüüsitava toote asjakohast töötlemist kasutatakse määramiseks kõrgefektiivset vedelikkromatograafiat (HPLC).

4. REAKTIIVID

Kõik reaktiivid peaksid olema analüütiliselt puhtad ja sobivad kõrgefektiivse vedelikkromatograafia jaoks.

4.1. Atsetonitriil.

4.2. Kaaliumdivesinikortofosfaat (KH_2PO_4).

4.3. Ortofosforhape (85 %; $d \frac{20}{4} = 1,7$).

4.4. Tetrametüülammooniumbromiid.

4.5. Veevaba kiniin.

4.6. Metanool.

4.7. Ortofosforhappe lahus (0,1 M): mõõtekolbi kaalutakse 11,53 g ortofosforhapet (4.3) ja lahustatakse veega 1 000 ml-ni.

4.8. Kaaliumdivesinikortofosfaadi lahus (0,1 M): mõõtekolbi kaalutakse 13,6 g kaaliumdivesinikortofosfaati (4.2) ja lahustatakse veega 1 000 ml-ni.

4.9. Tetrametüülammooniumbromiidi lahus: 15,40 g tetrametüülammooniumbromiidi (4.4) lahustatakse mõõtekolvis 1 000 ml vees.

4.10. Eluent: ortofosforhape (4.7)/kaaliumdivesinikortofosfaat (4.8)/tetrametüülammooniumbromiid (4.9)/vesi/atsetonitriil (4.1) (mahuvahekorras 10:50:100:340:90).

Liikuva faasi koostist võib muuta, et saavutada lahutusteguri R väärtuseks vähemalt 1,5.

$$R = 2 \frac{d'R_2 - d'R_1}{W_1 + W_2}$$

kus:

R_1 ja R_2 = piikide retentsiooniajad minutites,

W_1 ja W_2 = piikide laiused millimeetrites poolkõrgusel,

d' = lindi kiirus millimeetrites minutis.

4.11. Silikageel, töödeldud oktaetsüülsilaaniga, 10 µm.

4.12. Standardlahused: 100-ml mõõtekolbidesse kaalutakse vastavalt umbes 5,0, 10,0, 15,0 ja 20,0 mg veevaba kiniini (4.5). Täiendatakse metanooliga (4.6) märgini ja kolbide sisu loksutatakse, kuni kiniin on lahustunud. Kõik proovid filtreeritakse läbi 0,5-µm filtri.

5. SEADMED

5.1. Tavalised laboriseadmed.

5.2. Ultrahelivann.

5.3. Kõrgefektiivne vedelikkromatograaf muudetava lainepikkusega detektoriga.

5.4. Kolonn: pikkus: 250 mm; siseläbimõõt: 4,6 mm; kolonni täidis: silikageel (4.11).

5.5. Membraanfilter Millipore filter FH 0,5 µm või samaväärne, sobiva filtreerimisomadmega.

6. ANALÜÜSI KÄIK

6.1. Proovi ettevalmistamine

100-ml mõõtekolbi kaalutakse toodet koguses, mis eeldatavalt sisaldab 10,0 mg veevaba kiniini, lisatakse 20 ml metanooli (4.6) ja asetatakse kolb 20 minutiks ultrahelivanni (5.2). Täiendatakse metanooliga (4.6) märgini. Lahus segatakse ja seejärel filtreeritakse vajalik kogus (5.5).

6.2. Kromatograafia

Voolukiirus: 1,0 ml/min.

Detektori lainepikkus (5.3): 332 nm.

Süstitava maht: 10 µl filtreeritud lahust (6.1).

Mõõtmise pindala.

6.3. Kalibreerimiskõver

10,0 µl kõiki võrdlusalahuseid (4.12) süstitakse vähemalt kolm korda, mõõdetakse piikide pindalad ja arvutatakse iga kontsentratsiooni puhul saadud piigi keskmine pindala.

Koostatakse kalibreerimiskõver ja kontrollitakse, et see oleks sirgjooneline.

7. ARVUTAMINE

7.1. Kalibreerimiskõvera (6.3) järgi määratakse süstitud koguse (6.2) veevaba kiniini sisaldus mikrogrammides.

7.2. Proovi veevaba kiniini sisaldus massiprotsentides saadakse järgmise valemi alusel:

$$\text{veevaba kiniini sisaldus massiprotsentides} = \frac{B}{A}$$

kus:

B – veevaba kiniini kogus mikrogrammides 10 mikrolitris filtreeritud lahuses (6.1).

A – proovi mass grammides (6.1).

8. KORRATAVUS (1)

Kui veevaba kiniini sisaldus on 0,5 massiprotsenti, ei tohi ühest ja samast proovist samaaegselt tehtud kahe määramise tulemuste vahe ületada 0,02 %.

Kui veevaba kiniini sisaldus on 0,2 massiprotsenti, ei tohi ühest ja samast proovist samaaegselt tehtud kahe määramise tulemuste vahe ületada 0,01 %.

ANORGAANILISTE SULFITITE JA VESINIKSULFITITE IDENTIFITSEERIMINE JA MÄÄRAMINE

RAKENDATAVUS JA RAKENDUSALA

Käesolev meetod kirjeldab anorgaaniliste sulfitite ja vesiniksulfitite identifitseerimist ja määramist kosmeetikatoodetes. Seda kohaldatakse ainult vesi- või alkoholilahuste suhtes, mis sisaldavad kuni 0,2 % vääveldioksiidi.

A. IDENTIFITSEERIMINE

1. PÕHIMÕTE

Proovi kuumutatakse soolhappes ning vabanenud vääveldioksiid identifitseeritakse lõhna järgi või indikaatorpaberiga.

2. REAKTIIVID

Kõik reaktiivid peaksid olema analüütiliselt puhtad.

2.1. Soolhape (4 M).

2.2. Kaaliumjodaadiga tärglisepaber või muu sobiv vahend.

3. SEADMED

3.1. Tavalised laboriseadmed.

3.2. Kolb (25 ml) lühikese püstjahutiga.

4. ANALÜÜSI KÄIK

4.1. Kolbi (3.2) viiakse umbes 2,5 g proovi ja 10 ml soolhapet (2.1).

4.2. Segatakse ja kuumutatakse keemiseni.

4.3. Kontrollitakse vääveldioksiidi moodustumist lõhna järgi või indikaatorpaberiga (2.2).

(1) Standard ISO 5725.

B. MÄÄRAMINE

1. MÄÄRATLUS

Käesoleva meetodiga määratud sulfiti- või vesiniksulfitisisaldust proovis väljendatakse vääveldioksiidi massiprotsentina.

2. PÕHIMÕTE

Pärist proovi hapestamist destilleeritakse vabanenud vääveldioksiid vesinikperoksiidi lahusesse. Moodustunud väävelhape tiitritakse naatriumhüdroksiidi standardlahusega.

3. REAKTIIVID

Kõik reaktiivid peaksid olema analüütiliselt puhtad.

3.1. Vesinikperoksiid, 0,2 massi/mahuprotsenti. Valmistatakse samal päeval.

3.2. Ortofosforhape (d d $\frac{20}{4} = 1,75$).

3.3. Metanool.

3.4. Naatriumhüdroksiidi (0,01 M) standardlahus.

3.5. Lämmastik.

3.6. Indikaator: metüülpunase (0,03-massi/mahuprotsentiline lahus etanoolis) ja metüleensinise (0,05-massi/mahuprotsentiline lahus etanoolis) segu mahuvahekorras 1:1. Lahus filtreeritakse.

4. SEADMED

4.1. Tavalised laboriseadmed.

4.2. Destilleerimisaparaat (vt joonis).

5. ANALÜÜSI KÄIK

5.1. Umbes 2,5 g proovi kaalutakse nõuetekohaselt destillatsioonikolbi A (vt joonis).

5.2. Lisatakse 60 ml vett ja 50 ml metanooli (3.3) ning segatakse.

5.3. Destillaatori vastuvõtukolbi D (vt joonis) pannakse 10 ml vesinikperoksiidi (3.1), 60 ml vett ja mõned tilgad indikaatorit (3.6). Lisatakse mõned tilgad naatriumhüdroksiidi (3.4), kuni indikaator värvub roheliseks.

5.4. Punktis 5.3 esitatud protseduuri korratakse pesupudeliga E (vt joonis).

5.5. Seade pannakse kokku ja lämmastikujuga (3.5) reguleeritakse kiirusele umbes 60 mulli minutis.

5.6. Lehtrist lastakse destillatsioonikolbi A 15 ml ortofosforhapet (3.2).

5.7. Kuumutatakse kiiresti keemiseni ja seejärel keedetakse tasa kokku 30 minutit.

5.8. Vastuvõtukolb D võetakse seadme küljest. Loputatakse toru ja seejärel tiitritakse naatriumhüdroksiidi lahusega (3.4), kuni indikaator (3.6) värvub roheliseks.

6. ARVUTAMINE

Proovi sulfiti- või vesiniksulfitisisaldus massiprotsentides arvutatakse järgmise valemi alusel:

$$\text{Vääveldioksiidi sisaldus massiprotsentides} = \frac{3,2 \text{ MV}}{m}$$

kus:

M = naatriumhüdroksiidi lahuse (3.4) molaarsus,

V = tiitrimiseks (5.8) kulunud naatriumhüdroksiidi lahuse (3.4) maht milliliitrites,

m = proovi (5.1) mass grammides.

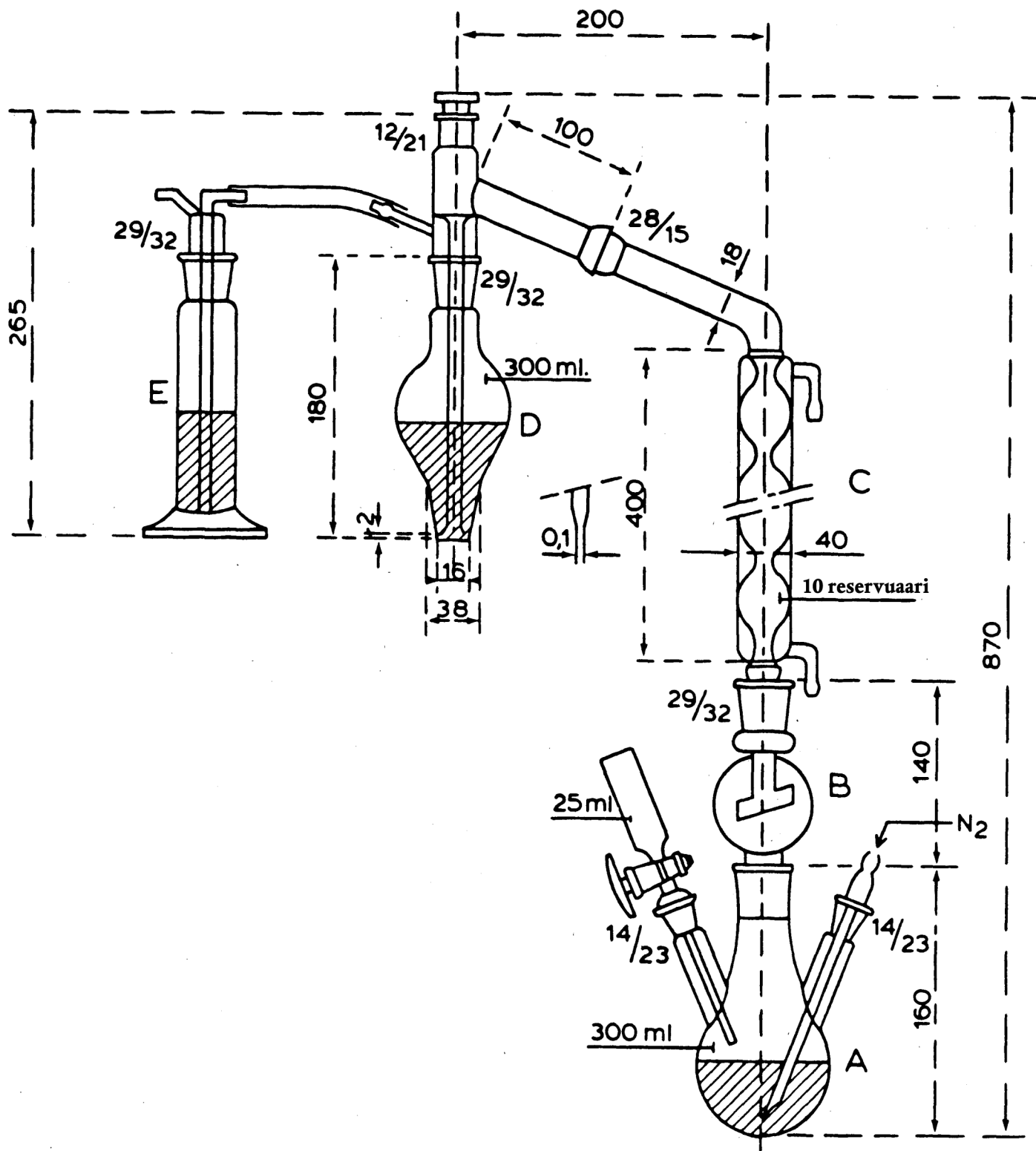
7. KORRATAVUS (1)

Kui vääveldioksiidisisaldus on 0,2 massiprotsenti, tohiks ühest ja samast proovist samaaegselt tehtud kahe määramise tulemuste vahe ületada 0,006 %.

(1) Standard ISO 5725.

Väaveldioksiidi destilleerimisaparaat Tanneri järgi

Kõik mõõtmed on esitatud millimeetrites



LEELISMETALLIDE KLORAATIDE IDENTIFITSEERIMINE JA MÄÄRAMINE

RAKENDATAVUS JA RAKENDUSALA

Käesolev meetod kirjeldab kloraatide identifitseerimist ja määramist hambapastades ja muudes kosmeetikatoodetes.

A. IDENTIFITSEERIMINE

1. PÕHIMÕTE

Kloraadid eraldatakse teistest halaatidest õhekihikromatograafia (ÕKK) abil ning identifitseeritakse jodiidi oksüdeerimisega joodiks.

2. REAKTIIVID

Kõik reaktiivid peaksid olema analüütiliselt puhtad.

- 2.1. Võrdluslahused: kaaliumkloraadi, -bromaadi ja -jodaadi vesilahused (0,2 massi/mahuprotsenti), värskest valmistatud.
- 2.2. Eluent: ammoniaagilahus (28 massi/mahuprotsenti)/atsetoon/butanool (mahuvahekorras 60:130:30).
- 2.3. Kaaliumjodiidi vesilahus (5 massi/mahuprotsenti).
- 2.4. Tärkliselahus (1–5 massi/mahuprotsenti).
- 2.5. Soolhape (1 M).
- 2.6. Tselluloosiga ÕKK-plaadid, kasutusvalmis (kihi paksus 0,25 mm).

3. SEADMED

Tavalised ÕKK-seadmed.

4. ANALÜÜSI KÄIK

- 4.1. Umbes 1 g proovi ekstraheeritakse veega, filtreeritakse ja lahjendatakse umbes 25 ml-ni.
- 4.2. Plaadile (2.6) kantakse 2 µl lahust (4.1) ja 2 µl kõiki kolme võrdluslahuseid (2.1).
- 4.3. Plaat pannakse tõusva kromatograafia kambrisse ja elueeritakse, kuni punktis 2.2 nimetatud lahusti piir on tõusnud umbes 2/3 plaadi (2.6) kõrguseni.
- 4.4. Plaat võetakse kambrist välja ja lastakse lahustil aurustuda. (NB: Selleks võib kuluda kuni kaks tundi).
- 4.5. Paadile pihustatakse kaaliumjodiidi (2.3) ja lastakse kuivada umbes viis minutit.
- 4.6. Paadile pihustatakse tärkliselahust (2.4) ja lastakse kuivada umbes viis minutit.
- 4.7. Plaadile pihustatakse soolhapet (2.5).

5. HINDAMINE

Kloraaadi olemasolu korral ilmub poole tunni pärast sinine laik (laik võib olla ka pruun), mille R_f väärtus on ligikaudu 0,7–0,8.

Halaadid	R_f
Jodaat	0–0,2
Bromaat	0,5–0,6
Kloraat	0,7–0,8

Tuleks silmas pidada, et bromaadid ja jodaadid reageerivad kohe. Tuleb olla tähelepanelik, et bromaadi- ja kloraadilaike mitte segi ajada.

B. MÄÄRAMINE

1. MÄÄRATLUS

Käesoleva meetodiga määratud kloraadisisaldust proovis väljendatakse kloraaži massiprotsendina.

2. PÕHIMÕTE

Kloraat redutseeritakse tsiingipulbriga happelises keskkonnas. Moodustunud kloriidi mõõdetakse potentsiomeetrisel tiitrimisel hõbenitraadilahusega. Samasugune määramine enne redutseerimist võimaldab kindlaks teha halogeeniidide sisalduse.

3. REAKTIIVID

Kõik reaktiivid peaksid olema analüütiliselt puhtad.

3.1. Äädikhape, 80 massiprotsenti.

3.2. Tsiingipulber.

3.3. Hõbenitraadi standardlahus (0,1 M).

4. SEADMED

4.1. Tavalised laboriseadmed.

4.2. Potentsiomeeter hõbeindikaatorelektroodiga.

5. ANALÜÜSI KÄIK

5.1. Proovi ettevalmistamine

Tsentrifuugiküveti kaalutakse ligikaudu 2 g (m grammi) proovi. Lisatakse umbes 15 ml äädikhapet (3.1) ja segatakse hoolikalt. Oodatakse 30 minutit ja tsentrifuugitakse 15 minutit kiirusel 2 000 pööret minutis. Supernatant viiakse 50-ml mõõtekolbi. Korratakse tsentrifuugimist kaks korda, lisades jäägile 15 ml äädikhapet (3.1). Kloraaži sisaldav lahust kogutakse samasse mõõtekolbi. Täiendatakse äädikhappega (3.1) märgini.

5.2. Kloraaži redutseerimine

Võetakse 20 ml punktis 5.1 nimetatud lahust ja lisatakse 0,6 g tsiingipulbrit (3.2). Lastakse keema jahutiga varustatud kolvis. Pärast 30 minutit keetmist jahutatakse ja filtreeritakse. Kolb loputatakse veega. Filtreeritakse ja filtraat ühendatakse loputusveega.

5.3. Kloriidi määramine

20 ml punktis 5.2 nimetatud lahust tiitritakse hõbenitraadiga (3.3) potentsiomeetriga (4.2). Analoogselt tiitritakse 20 ml punktis 5.1 nimetatud lahust hõbenitraadiga (3.3).

NB: Kui toode sisaldab broomi või joodi derivaate, mis pärast redutseerimist annavad bromiide või jodiide, on tiitrimiskõveral mitu käänupunkti. Sel juhul on kloriidiile vastava tiitritud lahuse (3.3) mahuks viimase ja eelviimase käänupunkti vahe.

6. ARVUTAMINE

Proovi kloraadisisaldus massiprotsentides arvutatakse järgmise valemi alusel:

$$\text{Kloraaži (ClO}_3^-) \text{ sisaldus massiprotsentides} = \frac{20,9 (V - V') M}{m}$$

kus:

V = punktis 5.2 nimetatud lahuse tiitrimiseks kulunud hõbenitraadilahuse (3.3) maht milliliitrites,

V' = 20 ml punktis 5.1 nimetatud lahuse tiitrimiseks kulunud hõbenitraadilahuse (3.3) maht milliliitrites,

M = hõbenitraadi standardlahuse (3.3) molaarsus,

m = proovi mass grammides.

7. KORRATAVUS (1)

Kui kloraadisisaldus on 3–5 massiprotsenti, ei tohiks ühest ja samast proovist samaaegselt tehtud kahe määramise tulemuste vahe ületada 0,07 massiprotsenti.

(1) Standard ISO 5725.

NAATRIUMJODAADI IDENTIFITSEERIMINE JA MÄÄRAMINE

RAKENDATAVUS JA RAKENDUSALA

Käesolev meetod kirjeldab naatriumjodaadi identifitseerimist ja määramist kosmeetikatoodete loputusvedelikes.

A. IDENTIFITSEERIMINE

1. PÕHIMÕTE

Naatriumjodaati eraldatakse teistest halaatidest õhekihikromatograafia (ÖKK) abil ning identifitseeritakse jodiidi oksüdeerimisega joodiks.

2. REAKTIIVID

Kõik reaktiivid peaksid olema analüütiliselt puhtad.

2.1. Võrdluslahused. Kaaliumkloriidi, -bromiidi ja -jodaadi vesilahused (0,01 massi/mahuprotsenti), värskest valmistatud.

2.2. Eluent.

Ammoniaagilahus (28 massi/mahuprotsenti)/atsetoon/butanool (mahuvahekorras 60:130:30).

2.3. Kaaliumjodiidi vesilahus (5 massi/mahuprotsenti).

2.4. Tärgliselahus (1–5 massi/mahuprotsenti).

2.5. Soolhape (1 M).

3. SEADMED

3.1. Tselluloosiga ÖKK-plaadid, kasutusvalmis (kihi paksus 0,25 mm).

3.2. Tavalised ÖKK-seadmed.

4. ANALÜÜSI KÄIK

4.1. Umbes 1 g proovi ekstraheeritakse veega, filtreeritakse ja lahjendatakse umbes 10 ml-ni.

4.2. Plaadi (3.1) stardijoonele kantakse 2 µl kõnealust lahust ja 2 µl kõiki kolme võrdluslahuseid (2.1).

4.3. Plaat pannakse tõusva kromatograafia kambrisse ja elueeritakse, kuni punktis 2.2 nimetatud lahusti piir on tõusnud umbes 2/3 plaadi kõrguseni.

4.4. Plaat võetakse kambrist välja ja lastakse lahustil toatemperatuuril aurustuda. (NB: Selleks võib kuluda kuni kaks tundi).

4.5. Plaadile pihustatakse kaaliumjodiidi (2.3) ja lastakse kuivada umbes viis minutit.

4.6. Plaadile pihustatakse tärgliselahust (2.4) ja lastakse kuivada umbes viis minutit.

4.7. Lõpuks pihustatakse soolhapet (2.5).

5. HINDAMINE

Jodaadi olemasolu korral ilmub kohe sinine laik (laik võib olla ka pruun või muutuda seistes pruuniks), mille R_f väärtus on ligikaudu 0–0,2.

Tuleks märkida, et kohe reageerivad bromiidid, mille R_f väärtus on ligikaudu 0,5–0,6 ning umbes 30 minuti pärast kloriidid, mille R_f väärtus on vastavalt 0,7–0,8.

B. MÄÄRAMINE

1. MÄÄRATLUS

Käesoleva meetodiga määratud naatriumjodaadisaldust väljendatakse selle massiprotsendina.

2. PÕHIMÕTE

Naatriumjodaati lahustatakse vees ja määratakse kõrgefektiivse vedelikkromatograafia abil, kasutades järjest pöördfaaskoloni C18 ja anioniitkoloni.

3. REAKTIIVID

Kõik reaktiivid peaksid olema analüütiliselt puhtad ja eelkõige sobivad kõrgefektiivse vedelikukromatograafia (HPLC) jaoks.

3.1. Soolhape (4 M).

3.2. Naatriumsulfiiti vesilahus, 5 massi/mahuprotsenti.

3.3. Naatriumjodaadi põhilahus.

Valmistatakse põhilahus, mis sisaldab 50 naatriumjodaati 100 ml vee kohta.

3.4. Kaaliumdivesinikortofosfaat.

3.5. Dinaatriumvesinikortofosfaat × 2H₂O.

3.6. HPLC liikuv faas: 3,88 g kaaliumdivesinikortofosfaati (3.4) ja 1,19 g dinaatriumvesinikortofosfaat × 2H₂O-d (3.5) lahustatakse ühes liitris vees.

Saadud lahuse pH on 6,2.

3.7. Universaalne indikaatorpaber, pH 1–11.

4. SEADMED

4.1. Tavalised laboriseadmed.

4.2. Paberfilter, läbimõõt 110 mm, *Schleicher and Schuell nr 575* või samaväärne.

4.3. Kõrgefektiivne vedelikukromatograaf muudetava lainepikkusega detektoriga.

4.4. Kolonnid: pikkus: 120 mm; siseläbimõõt: 4,6 mm; arv: kaks järjestikku ühendatud kolonni; esimene kolonn – *Nucleosil[®] 5 C18* või samaväärne; teine kolonn – *Vydac[™]-301-SB* või samaväärne.

5. ANALÜÜSI KÄIK

5.1. Proovi ettevalmistamine

5.1.1. Vedelad proovid (šampoonid)

Ligikaudu 1,0 g proovi kaalutakse 10-ml suletavasse kalibreeritud klaastorusse või mõõtekolbi.

Täiendatakse veega märgini ja segatakse.

Vajaduse korral lahustatakse filtreeritakse.

Lahuse jodaadisisaldus määratakse kõrgefektiivse vedelikukromatograafia (HPLC) abil, nagu on kirjeldatud punktis 5.2.

5.1.2. Tahked proovid (seep)

Proov tükeldatakse hoolikalt ja 100-ml suletavasse mõõtesilindrisse kaalutakse umbes 1,0 g katsekogust. Täiendatakse veega 50 ml-ni ja loksutatakse tugevasti üks minut. Tsentrifugeeritakse ja filtreeritakse läbi filterpaberi (4.1) või lastakse segul seista vähemalt üks öö.

Tarretisesarnast lahust loksutatakse tugevasti ja filtreeritakse läbi filterpaberi (4.1).

Filteraadi jodaadisisaldus määratakse kõrgefektiivse vedelikukromatograafia (HPLC) abil, nagu on kirjeldatud punktis 5.2.

5.2. Kromatograafia

Voolukiirus: 1 ml minutis.

Detektori lainepikkus (4.2): 210 nm.

Süstiv maht: 10 µl.

Mõõtmise pindala.

5.3. Kalibreerimine

50-ml mõõtekolbidesse pipeteeritakse vastavalt 1,0, 2,0, 5,0, 10,0 ja 20,0 ml naatriumjodaadi põhilahust (3.3). Täiendatakse märgini ja segatakse.

Saadud lahused sisaldavad vastavalt 0,01, 0,02, 0,05, 0,10 ja 0,20 mg naatriumjodaati milliliitri kohta.

10 µl kõiki jodaadi standardlahuseid süstitakse vedelikukromatograafi (4.2) ja saadakse kromatogramm. Määratakse jodaadi piigi pindala ja konstrueeritakse kõver, kus piigi pindala vastab naatriumjodaadi sisaldusele.

6. ARVUTAMINE

Naatriumjodaadi sisaldus massiprotsentides arvutatakse järgmise valemi alusel:

$$\text{Naatriumjodaadi sisaldus massiprotsentides} = \frac{Vc}{10 m}$$

kus:

m – = katsekoguse (5.1) mass grammides,

V – = punkti 5.1 kohaselt saadud proovilahuse kogumaht milliliitrites,

c – = naatriumjodaadi sisaldus milligrammides milliliitri kohta vastavalt kalibreerimiskõverale (5.3).

7. KORRATAVUS (1)

Kui naatriumjodaadisisaldus on 0,1 massiprotsenti, ei tohi ühest ja samast proovist samaaegselt tehtud kahe määramise tulemuste vahe ületada 0,002 %.

8. TÕESTAMINE

8.1. Põhimõte

Kosmeetikatoote hapestatud lahuses redutseerub jodaat (IO₃⁻) sulfiti toimele jodiidiks (I⁻) ja saadud lahust analüüsitakse kõrgefektiivse vedelikkromatograafia (HPLC) abil. Kui jodaadi retentsiooniajale vastav piik kaob pärast sulfitiga töötlemist, on algne piik tõenäoliselt jodaadi piik.

8.2. Analüüsi käik

5 ml punktis 5.1 kirjeldatud viisis saadud proovilahust pipeteeritakse koonilisse kolbi.

Lahuse pH viiakse soolhappega (3.1) 3-ni või madalamale; universaalne indikaatorpaber (3.7).

Lisatakse kolm tilka naatriumsulfiti lahust (3.2) ja segatakse.

10 µl saadud lahust süstitakse vedelikkromatograafi (4.2).

Seda kromatogrammi võrreldakse sama proovi kohta punktis 5 kirjeldatud viisil saadud kromatogrammiga.

(1) Standard ISO 5725.