

31982L0434

30.6.1982.

SLUŽBENI LIST EUROPSKIH ZAJEDNICA

L 185/1

DRUGA DIREKTIVA KOMISIJE**od 14. svibnja 1982.****o usklađivanju zakonodavstava država članica u odnosu na metode analize potrebne za provjeru sastava kozmetičkih proizvoda**

(82/434/EEZ)

KOMISIJA EUROPSKIH ZAJEDNICA,

identifikacija i određivanje slobodnog formaldehida, određivanje rezorcinola u šamponima i losionima za kosu, i određivanje metanola u odnosu na etanol ili propan-2-ol;

uzimajući u obzir Ugovor o osnivanju Europske ekonomske zajednice,

budući da su mjere utvrđene ovom Direktivom u skladu s mišljenjem Odbora za prilagodbu Direktive 76/768/EEZ tehničkom napretku,

uzimajući u obzir Direktivu Vijeća 76/768/EEZ od 27. srpnja 1976. o usklađivanju zakonodavstava država članica u odnosu na kozmetičke proizvode ⁽¹⁾, kako je izmijenjena Direktivom 79/661/EEZ ⁽²⁾, a posebno njezin članak 8. stavak 1.,

DONIJELA JE OVU DIREKTIVU:

Članak 1.

Države članice poduzimaju sve potrebne mjere da osiguraju da se tijekom službenog testiranja kozmetičkih proizvoda:

budući da Direktiva 76/768/EEZ predviđa službeno testiranje kozmetičkih proizvoda sa svrhom osiguranja zadovoljenja uvjeta propisanih odredbama Zajednice, koji se odnose na sastav kozmetičkih proizvoda;

— identifikacija oksidacijskih sredstava i određivanje vodikova peroksida u proizvodima za njegu kose,

budući da sve potrebne analitičke metode moraju biti postavljene što je moguće prije; budući da je prvi korak prema tome cilju već poduzet definiranjem određenih metoda u Direktivi Komisije 80/1335/EEZ ⁽³⁾, drugi korak je definiranje metoda za identifikaciju nekih oksidacijskih sredstava i određivanje vodikova peroksida u kozmetičkim proizvodima za njegu kose, identifikacija i polukvantitativno određivanje nekih oksidacijskih bojila u bojilima za kosu, identifikacija i određivanje nitrita,

— identifikacija i polukvantitativno određivanje nekih oksidacijskih bojila u bojilima za kosu,

— identifikacija i određivanje nitrita,

⁽¹⁾ SL L 262, 27.9.1976., str. 169.⁽²⁾ SL L 192, 31.7.1979., str. 35.⁽³⁾ SL L 383, 31.12.1980., str. 27.

— identifikacija i određivanje slobodnog formaldehida,

— određivanje rezorcinola u šamponima i losionima za kosu,
— određivanje metanola u odnosu na etanol ili propan-2-ol
provode u skladu s metodama opisanima u Prilogu.

Članak 2.

Države članice donose zakone i druge propise potrebne za usklađivanje s ovom Direktivom najkasnije do 31. prosinca 1983. One o tome odmah obavješćuju Komisiju.

Članak 3.

Ova je Direktiva upućena državama članicama.

Sastavljeno u Bruxellesu 14. svibnja 1982.

Za Komisiju
Karl-Heinz NARJES
Član Komisije

PRILOG

I. IDENTIFIKACIJA OKSIDACIJSKIH SREDSTAVA I ODREĐIVANJE VODIKOVA PEROKSIDA U PROIZVODIMA ZA NJEGU KOSE

SVRHA I PODRUČJE PRIMJENE

Jodometrijsko određivanje vodikova peroksida u kozmetičkim proizvodima je moguće samo ako nisu prisutna druga oksidacijska sredstva koja iz jodida daju jod. Posljedično, prije određivanja vodikova peroksida jodometrijski, potrebno je detektirati i identificirati druga prisutna oksidacijska sredstva. Identifikacija se provodi u dva stupnja; prvi obuhvaća persulfate, bromate i vodikov peroksid, a drugi obuhvaća barijev peroksid.

A. IDENTIFIKACIJA PERSULFATA, BROMATA I VODIKOVA PEROKSIDA

1. NAČELO

Natrijev persulfat, kalijev persulfat i amonijev persulfat; kalijev bromat, natrijev bromat i vodikov peroksid – bez obzira potječe li od barijeva peroksida ili ne – identificiraju se silaznom papirnom kromatografijom pri kojoj se rabe dvije otopine za razvijanje.

2. REAGENSI

Svi reagensi trebaju biti analitičke čistoće (p.a.).

2.1. 0,5 % (m/v) referentne vodene otopine sljedećih spojeva:

2.1.1. natrijev persulfat

2.1.2. kalijev persulfat

2.1.3. amonijev persulfat

2.1.4. kalijev bromat

2.1.5. natrijev bromat

2.1.6. vodikov peroksid

2.2. Otapalo za razvijanje A, 80 % (v/v) etanol

2.3. Otapalo za razvijanje B, benzen –metanol – 3metil butan-1-ol – voda (34: 38: 18: 10 po volumenu)

2.4. Sredstvo za detekciju A, 10 % (m/v) vodena otopina kalijeva jodida

2.5. Sredstvo za detekciju B, 1 % (m/v) vodena otopina škroba

2.6. Sredstvo za detekciju C, 10 % (m/m) klorovodična kiselina

2.7. 4N klorovodična kiselina

3. APARATURA I OPREMA

3.1. Kromatografski papir (Whatman papir br. 3 i br. 4 ili njihovi ekvivalenti)

3.2. Mikropipeta, 1 µL

3.3. Standardne tikvice, 100 ml

3.4. Naborani filtrirni papiri

3.5. Aparatura za silaznu papirnu kromatografiju

4. PRIPREMA UZORKA

4.1. **Proizvodi topivi u vodi**

Otapanjem 1 g i 5 g proizvoda u 100 mL vode, pripreme se dvije otopine svakog uzorka. Kako bi se provela papirna kromatografija opisana u odjeljku 5., uporabi se 1 μ L svake od tih otopina.

4.2. **Proizvodi djelomično topivi u vodi**

4.2.1. Izvaže se 1 g i 5 g uzorka i dispergira u 50 mL vode, nadopuni se u oba slučaja do 100 ml vodom i u oba slučaja miješa. Kako bi se provela papirna kromatografija opisana u odjeljku 5., obje disperzije se profiltriraju preko naboranog filtrirnog papira (3.4.) te se uporabi 1 μ L svakog od filtrata.

4.2.2. Ponovno se pripreme dvije disperzije od svakog uzorka disperzijom 1 g i 5 g u 50 ml vode, zakiselje se razrijeđenom klorovodičnom kiselinom (2.7.), nadopuni vodom do 100 ml i miješa. Kako bi se provela papirna kromatografija opisana u odjeljku 5., disperzije se profiltriraju preko naboranog filtrirnog papira (3.4.) te se uporabi 1 μ L svakog od filtrata.

4.3. **Kreme**

Kako bi se provela papirna kromatografija opisana u odjeljku 5., dispergira se 5 g i 20 g svakog proizvoda u 100 ml vode i uporabe disperzije.

5. METODA

5.1. Kako bi se provela silazna papirna kromatografija, prikladna količina otapala A (2.2) i B (2.3) stavi se u dvije odvojene posude za kromatografiju. Posude za kromatografiju zasićuju se parama otapala najmanje 24 sata.

5.2. Stavi se 1 μ L otopine jednog uzorka i jedne referentne otopine pripremljene u skladu s odjeljcima 4. i 2.1. na svaku početnu točku trake kromatografskog papira (Whatman br. 3 ili ekvivalent), duljine 40 cm i širine 20 cm (3.1.), ili drugog pogodnog formata te se otopina isparava na zraku.

5.3. Kromatografska traka (5.2.) se stavi u kromatografsku posudu napunjenu otapalom za razvijanje A (5.1.) i razvija se dok fronta otapala ne dosegne 35 cm (oko 15 sati).

5.4. Ponovi se postupak opisan u odjeljcima 5.2. i 5.3., rabeći kromatografski papir (Whatman br. 4 ili ekvivalent) (3.1.) i otapalo za razvijanje B. Razvija se dok fronta otapala ne dosegne 35 cm (oko pet sati).

5.5. Nakon razvijanja kromatogrami se maknu i suše na zraku.

5.6. Mrlje na kromatogramu prikažu se ako se uzastopno prska:

5.6.1. Sredstvom za detekciju A (2.4.) i kratko nakon toga sredstvom za detekciju B (2.5.). Na kromatogramu će se najprije pojaviti mrlje persulfata, a za njima mrlje vodikova peroksida. Mrlje se označe olovkom;

5.6.2. Sredstvom za detekciju C (2.6.) na kromatogramima dobivenim u skladu s odjeljkom 5.6.1.; prisustvo bromata pokazat će se sivo plavim mrljama na kromatogramu.

5.7. U gore opisanim uvjetima koji se odnose na sredstva za razvijanje A (2.2.) i B (2.3.), R_f vrijednosti referentnih tvari (2.1.) su približno jednake kako slijedi:

	Otopina A za razvijanje (2.2)	Otopina B za razvijanje (2.3)
Natrijev persulfat	0,40	0,10
Kalijev persulfat	0,40	0,02 + 0,05
Amonijev persulfat	0,50	0,10 + 0,20
Natrijev bromat	0,40	0,20
Kalijev bromat	0,40	0,10 + 0,20
Vodikov peroksid	0,80	0,80

B. IDENTIFIKACIJA BARIJEVA PEROKSIDA

1. NAČELO

Barijev peroksid se identificira nastankom vodikova peroksida nakon zakiseljavanja uzorka (A.4.2.), i prisustvom barijeva iona:

— u odsustvu persulfata (A), dodatkom razrijeđene sumporne kiseline dijelu kisele otopine uzorka (B.4.1.), pri čemu nastaje bijeli talog barijeva sulfata. Prisustvo barijevih iona u uzorku (B.4.1.) potvrđuje se papirnom kromatografijom kako je dolje opisano (B.5),

— ako su barijev peroksid i persulfati prisutni zajedno (B.4.2.), raščinjavanjem ostatka od otopine (B.4.2.) pomoću lužine; nakon otapanja u klorovodičnoj kiselini, prisustvo barijevih iona se potvrđuje u otopini taljevine (B.4.2.3.) papirnom kromatografijom i/ili taloženjem barijeva sulfata.

2. REAGENSI

2.1. Metanol

2.2. 36 % (m/m) koncentrirana klorovodična kiselina

2.3. 6N klorovodična kiselina

2.4. 4N sumporna kiselina

2.5. Dinatrijeva sol rodizonske kiseline

2.6. Barijev klorid ($\text{BaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$)

2.7. Bezvodni natrijev karbonat

2.8. 1 % (m/v) vodena otopina barijeva klorida

2.9. Otapalo za razvijanje koje se sastoji od metanola, koncentrirane klorovodične kiseline (koncentracija 36 %) i vode (80: 10: 10 po volumenu)

2.10. Sredstvo za detekciju, 0,1 % (m/v) vodena otopina dinatrijeve soli rodizonske kiseline, pripravljena neposredno prije uporabe.

3. APARATURA I OPREMA

3.1. Mikropipeta, 5 μL

3.2. Platinski lončići

3.3. Standardne tikvice, 100 ml

3.4. Kromatografski papir Schleicher i Schull 2043 b ili ekvivalent. Papir se očisti razvijanjem preko noći u posudi za silaznu kromatografiju (A.3.5.), koja sadrži otapalo za razvijanje (B.2.9.), te se zatim posuši.

3.5. Naborani filtrirni papir

3.6. Uobičajena aparaturna za provođenje uzlazne papirne kromatografije

4. PRIPREMA UZORKA

4.1. **Proizvodi u kojima nema persulfata**

4.1.1. Dispergira se 2 g proizvoda u 50 ml vode i podesi pH disperzije klorovodičnom kiselinom (B.2.3.) na oko 1.

- 4.1.2. Disperzija se vodom prenese u standardnu tikvicu od 100 ml, tikvica nadopuni vodom do oznake i miješa se. Ta se disperzija uporabi za papirnu kromatografsku analizu opisanu u odjeljku 5., a za identifikaciju barija taloženjem sulfata.

4.2. **Proizvodi koji sadrže persulfate**

- 4.2.1. Dispergira se 2 g proizvoda u 100 ml vode i filtrira.
- 4.2.2. Osušenom ostatku doda se sedam do 10 puta veća masa natrijeva karbonata (B.2.7.), miješa se te se smjesa otapa u platinском lončiću (B.3.2.) pola sata.
- 4.2.3. Ohladi se na sobnu temperaturu, taljevina se otopi u 50 ml vode i filtrira (B.3.5.).
- 4.2.4. Ostatak od taljenja otopi se u klorovodičnoj kiselini (B.2.3.) i otopina nadopuni na 100 ml vodom. Ta otopina uporabi se za papirnu kromatografsku analizu opisanu u odjeljku 5., a za identifikaciju barija taloženjem sulfata.

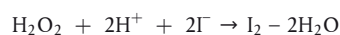
5. METODA

- 5.1. Stavi se prikladna količina otapala za razvijanje (B.2.9.) u posudu za uzlaznu kromatografiju i posuda zasićuje najmanje 15 sati.
- 5.2. Na komad kromatografskog papira-predobrađenog kao što je opisano u odjeljku B.3.4.- na tri početne točke nanese se 5 µL svake od otopina pripremljenih u skladu s odjeljcima B.4.1.2. i B.4.2.4. i referentna otopina B.2.8.
- 5.3. Uzorak i referentne točke osuše se na zraku. Razvija se kromatogram dok fronta otapala ne dosegne 30 cm.
- 5.4. Kromatogram se makne iz posude i osuši na zraku.
- 5.5. Mrlje se na kromatogramu prikažu ako se prska papir sredstvom za detekciju B.2.10. U prisustvu barija, na kromatogramu se pojave crvene mrlje s vrijednošću R_f oko 0,10.

C. ODREĐIVANJE VODIKOVA PEROKSIDA

1. NAČELO

Jodometrijsko određivanje vodikova peroksida se zasniva na sljedećoj reakciji:



Ta reakcija je spora, ali se može ubrzati dodatkom amonijeva molibdata. Nastali jod se određuje titracijom s natrijevim tiosulfatom i mjera je za sadržaj vodikova peroksida.

2. DEFINICIJA

Sadržaj vodikova peroksida mjeren na način kako je dolje opisano izražava se kao maseni udio (% m/m) proizvoda.

3. REAGENSI

Svi reagensi trebaju biti analitičke čistoće (p.a.).

- 3.1. 2N sumporna kiselina
- 3.2. Kalijev jodid
- 3.3. Amonijev molibdat
- 3.4. 0,1 N natrijev tiosulfat

3.5. 10 % (m/v) otopina kalijeva jodida, pripremljena neposredno prije uporabe

3.6. 20 % (m/v) otopina amonijeva molibdata

3.7. 1 % (m/v) otopina škroba

4. APARATURA I OPREMA

4.1. Čaše, 100 ml

4.2. Bireta, 50 ml

4.3. Standardne tikvice, 250 ml

4.4. Menzure, 25 i 100 ml

4.5. Pipete s jednom oznakom, 10 ml

4.6. Erlenmeyerove tikvice, 250 ml

5. METODA

5.1. U čašu od 100 ml odvaži se 10 g (m grama) proizvoda, koji sadrži oko 0,6 g vodikova peroksida. Sadržaj se prenese s vodom u standardnu tikvicu od 250 ml, tikvica se nadopuni do oznake vodom i miješa.

5.2. Otpipetira se 10 ml otopine uzorka (5.1.) u Erlenmeyer tikvicu od 250 ml (4.6.) i doda se uzastopno 100 ml 2N sumporne kiseline (3.1.), 20 ml otopine kalijeva jodida (3.5.) i tri kapi otopine amonijeva molibdata (3.6.).

5.3. Nastali jod se odmah titrira otopinom 0,1N natrijev tiosulfata (3.4.) i neposredno prije točke završetka doda se nekoliko mililitara škroba kao indikatora (3.7.). Zapiše se utrošak 0,1 N natrijev tiosulfata (3.4.) u mililitrima (V).

5.4. Na način opisan u odjeljcima 5.2. i 5.3. izvede se slijepa proba, tako da se zamijeni 10 mL uzorka s 10 ml vode. Zapiše se utrošak 0,1 N natrijev tiosulfata za slijepu probu (Vo ml).

6. RAČUN

Izračuna se sadržaj vodikova peroksida u proizvodu kao maseni udio (% m/m) pomoću sljedeće formule:

$$\begin{aligned} \% \text{H}_2\text{O}_2 &= \frac{(V - V_0) \times 1,7008 \times 250 \times 100}{m \times 10 \times 1000} \\ &= \frac{(V - V_0) \times 4,252}{m} \end{aligned}$$

gdje je:

m = količina analiziranog uzorka u gramima (5.1.),

Vo = utrošak 0,1 N otopine natrijeva tiosulfata u mililitrima za slijepu probu (5.4.),

V = utrošak 0,1 N otopine natrijeva tiosulfata u mililitrima za titraciju otopine uzorka (5.3.).

7. PONOVLJIVOST ⁽¹⁾

Za proizvod koji sadrži oko 6 % m/m vodikova peroksida apsolutna vrijednost razlike u rezultatima između dva usporedna određivanja provedena na istom uzorku ne treba biti veća od 0,2 %.

⁽¹⁾ Vidjeti ISO 5725.

II. IDENTIFIKACIJA I POLUKVANTITATIVNO ODREĐIVANJE NEKIH OKSIDACIJSKIH BOJILA U BOJILIMA ZA KOSU

1. SVRHA I CILJ

Ta metoda je pogodna za identifikaciju i polukvantitativno određivanje sljedećih tvari u bojilima za kosu koja su u obliku kreme ili tekućina:

Tvari	Simbol
<i>Fenilenediamini</i>	
o-fenilenediamin	(OPD)
m-fenilenediamin	(MPD)
p-fenilenediamin (Prilog V.)	(PPD)
<i>Metilfenilenediamini</i>	
4-metil-1,2-fenilenediamin (toluen-3,4-diamin)	(OTD)
4-metil-1,3-fenilenediamin (toluen-2,4-diamin)	(MTD)
2-metil-1,4-fenilenediamin (toluen-2,5-diamin)	(PTD)
<i>Diaminofenoli</i>	
2,4-diaminofenol	(DAP)
<i>Hidrokinon</i>	
1,4 benzendiol	(H)
α -naftol	(α -N)
<i>Pirogalol</i>	
1,2,3-trihidroksibenzen	(P)
<i>Resorcinol</i>	
1,3-dihidroksibenzen	(R)

2. NAČELO

Oksidacijska bojila se ekstrahiraju pri pH 10 96 % etanolom iz bojila u obliku kreme ili tekućine i identificiraju se tankoslojnom kromatografijom, bilo jedno-, bilo dvodimenzionalnom.

Za polukvantitativno određivanje tih tvari, kromatogram uzoraka se uspoređuje pomoću četiri sustava za razvijanje s onima za referentne tvari, dobivene u isto vrijeme i pod što je više moguće jednakim uvjetima.

3. REAGENSI

Svi reagensi trebaju biti analitičke čistoće (p.a.).

3.1. Bezvodni etanol

3.2. Aceton

3.3. Etanol, 96 % v/v

3.4. Otopina amonijaka, 25 % ($d_4^{20} = 0,91$)

- 3.5. L(+)-askorbinska kiselina
- 3.6. Kloroform
- 3.7. Cikloheksan
- 3.8. Dušik, tehničke čistoće
- 3.9. Toluen
- 3.10. Benzen
- 3.11. N-butanol
- 3.12. Butan-2-ol
- 3.13. Hipofosforna kiselina, 50 % otopina v/v
- 3.14. Diazo reagens: ili
- 3-nitro-1-benzendiazonijev naftalenbenzoat (u obliku stabilizirane soli) kao u Red 2 JN – Francolor,
 - 2-kloro-4-nitro-1-benzendiazonijev naftalenbenzoat (u obliku stabilizirane soli) kao u NNCD reagensu - referentni br. 74 150 FLUKA,
- ili ekvivalent.
- 3.15. Srebrov nitrat
- 3.16. p-dimetilaminobenzaldehid
- 3.17. 2,5-dimetilfenol
- 3.18. Željezov(III) klorid heksahidrat
- 3.19. Klorovodična kiselina, 10 % otopina m/v
- 3.20. **Referentne tvari**
- Referentne tvari su one prikazane u odjeljku 1. „Svrha i cilj”. U slučaju aminospojeva, referentna tvar mora biti ili hidroklorid (mono ili di) ili slobodna baza.
- 3.21. **Referentne otopine 0,5 % (m/v)**
- Pripremi se 0,5 % otopina svake od referentnih tvari iz odjeljka 3.20.
- Odvaži se 50 mg \pm 1 mg referentne tvari u standardnu tikvicu od 10 ml. Doda se 5 ml 98 % etanola (3.3.) i 250 mg askorbinske kiseline (3.5.). Otopina se zaluzi dodatkom otopine amonijaka (3.4.) na oko pH 10 (provjeri se indikator papirom). Nadopuni se do 10 ml 96 % etanolom (3.3.) i miješa. Otopine se mogu držati tjedan dana na hladnom i tamnom mjestu. Ponekad nakon dodatka askorbinske kiseline i amonijaka može nastati talog. Prije nastavka rada, potrebno je pustiti da se talog slegne.
- 3.22. **Otapala za razvijanje**
- 3.22.1. Aceton – kloroform – toluen (35:25:40 po volumenu)
- 3.22.2. Kloroform – cikloheksan – apsolutni alkohol – 25 % amonijak (80: 10: 10: 1 po volumenu)
- 3.22.3. Benzen – butan-2-ol – voda (50: 25:25 po volumenu). Dobro se protresa i nakon odvajanja faza na sobnoj temperaturi (20 do 25 °C) uporabi se gornja faza.
- 3.22.4. n-butanol – kloroform – reagens M (7: 70: 23 po volumenu). Pažljivo se razdvoje faze na sobnoj temperaturi (20 do 25 °C) te se rabi donja faza.

Priprava reagensa M

Otopina amonijaka, 25 % (v/v)

24 volumna dijela

Hipofosforna kiselina, 50 % (3,13)

1 volumni dio

Voda

75 volumnih dijelova

Napomena

Sredstva za razvijanje koja sadrže amonijak moraju se dobro protresti prije uporabe.

3.23. Raspršivači za indikaciju**3.23.1. Diazo reagens**

Pripremi se 5 % (m/v) vodena otopina odabranog reagensa (3.14.). Otopina mora biti svježe pripremljena, neposredno prije uporabe.

3.23.2. Ehrlichov reagens

Otopi se 2 g p-dimetilaminobenzaldehida (3.16.) u 100 ml 10 % (m/v) vodene otopine klorovodične kiseline (3.19.).

3.23.3. 2,5-dimetilfenol – željezov(III) klorid heksahidrat

Otopina 1: Otopi se 1 g dimetilfenola (3.17.) u 100 ml 96 % etanola (3.3.).

Otopina 2: Otopi se 4 g željezova(III) klorida heksahidrata (3.18.) u 100 ml 96 % etanola (3.3.).

Za razvijanje se te otopine raspršuju odvojeno, najprije otopina 1, zatim otopina 2.

3.23.4. Amonijakalni srebrov nitrat

25 % amonijak (3.4.) se dodaje u 5 % (m/v) vodenu otopinu srebrova nitrata (3.15.) dok se talog ne otopi. Taj reagens mora biti pripremljen neposredno prije uporabe. Reagens se ne čuva.

4. APARATURA**4.1. Uobičajena laboratorijska oprema za tankoslojnu kromatografiju.****4.1.1.** Plastični ili stakleni pokrov konstruiran tako, da kromatografska ploča može biti okružena dušikom tijekom primjene mrlja i sušenja. Ta mjera opreza je potrebna jer su pojedina bojila podložna oksidaciji.**4.1.2.** Mikrošprica, 10 µL, građurana na 0,2 razdjeljka, s ravno prerezanom iglom, ili, bolje, 50 mikrolitarski automatski razdjeljivač, koji je namješten na stalak za štipaljke tako, da se ploča može držati u atmosferi dušika.**4.1.3.** Tankoslojne silikagel ploče spremne za uporabu, 0,25 mm debele, veličine 20 × 20 cm (Macherey i Nagel, Silica G-HR, koje su na plastičnoj potpori, ili ekvivalent)**4.2.** Centrifuga, 4 000 okretaja/minuta**4.3.** Kivete za centrifugiranje, 10 ml s PTFE-obloženim kavicama s navojima, ili ekvivalent**5. POSTUPAK****5.1. Obrada uzoraka za testiranje**

Odbaci se prvih 2 do 3 cm kreme istisnute iz tube.

U kivetu centrifuge (4.3.), prethodno ispranu dušikom, stavi se sljedeće: 300 mg askorbinske kiseline s 3 g kreme ili 3 g homogenizirane tekućine.

Doda se kap po kap 25 % amonijaka (3.4.) do pH 10. Nadopuni se 96 % etanolom (3.3.).

Homogenizira se pod dušikom (3.8.), začepi i centrifugira na 4 000 okretaja/min. 10 minuta.

Upotrijebi se bistra tekućina nad talogom (supernatantna).

5.2. Kromatografija

5.2.1. Mrljanje (obojenje) ploča

U atmosferi dušika (3.8.) nanese se na kromatografsku ploču (4.1.3.) 1 μ L svake od gore opisanih referentnih otopina na devet točaka udaljenih međusobno oko 1,5 cm duž linije, približno 1,5 cm od ruba ploče. Ta mjesta s referentnim otopinama poredana su kako slijedi:

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

Nadalje se na točke 10 i 11 nanese 2 μ L otopina uzoraka za testiranje dobivenih u skladu s odjeljkom 5.1. Ploča se drži pod dušikom (3.8.) do trenutka kromatografiranja.

5.2.2. Razvijanje

Ploča se stavi u posudu prethodno ispranu dušikom (3.8.), zasićenu jednim od četiri otapala (3.22.) i pusti da se razvija na sobnoj temperaturi (20 do 25 °C) u mraku, sve dok se fronta otapala ne pomakne oko 15 cm od osnovne linije.

Ploča se makne i suši pod dušikom (3.8.) na sobnoj temperaturi.

5.2.3. Prskanje

Ploča se odmah popraska jednim od četiri otapala specificiranih u 3.23.

5.2.4. Identifikacija

Usporede se R_f vrijednosti i boje dobivene od uzorka s onima kromatografiranih referentnih tvari.

Tablica I. prikazuje primjere R_f vrijednosti i boja za svaku tvar, ovisno o uporabljenom otapalu i indikatoru.

Potvrda sumnjivih identifikacija se može ponekad postići tako, da se otopina odgovarajuće referentne tvari doda ekstraktu uzorka.

5.2.5. Polukvantitativno procjenjivanje

Vizualno se uspoređi intenzitet mrlja za svaku tvar identificiranu u 5.2.4. s odgovarajućim rasponom koncentracija referentnih tvari.

Ako je koncentracija jedne ili više tvari u uzorku prevelika, razrijedi se ekstrakt uzorka i mjerenje ponovi.

TABLICA I.

R_f vrijednosti i boje dobivene nakon raspršivanja

Referentna tvar (3.20)	Otopine za razvijanje				Raspršivači za indikaciju			
	R _f -vrijednosti				Rezultantne boje			
	(3.22.1)	(3.22.2)	(3.22.3)	(3.22.4)	Diazo (3.23.1)	Ehrlich (3.23.2)	Dimetilfenol (3.23.3)	AgNo (3.23.4)
OPD	0,62	0,60	0,30	0,57	blijedosmeđa	—	—	blijedosmeđa
MPD	0,40	0,60	0,47	0,48	ljubičasto smeđa (*)	žuta	blijedosmeđa	blijedosmeđa
PPD	0,20	0,50	0,30	0,48	smeđa	svijetlocrvena (*)	ljubičasta	siva
OTD	0,60	0,60	0,53	0,60	smeđa (*)	blijedonarančasta	blijedo smeđa	sivkastosmeđa
MTD	0,40	0,67	0,45	0,60	crvenkastosmeđa (*)	žuta	smeđa	crna
PTD	0,33	0,65	0,37	0,70	smeđa	narančasta	ljubičasta (*)	siva
DAP	0,07	—	0	0,05	smeđa	narančasta	ljubičasta	smeđa
H	0,50	0,35	0,80	0,20	—	narančasta	ljubičasta	crna (*)
α-N	0,90	0,80	0,90	0,75	smeđenarančasta	—	ljubičasta (*)	crna
P	0,37	—	0,67	0,05	smeđa	vrlo blijedoljubičasta	vrlo blijedosmeđa	smeđa (*)
R	0,50	0,37	0,80	0,17	narančasta (*)	blijedoljubičasta	vrlo blijedosmeđa	blijedosmeđa

Napomena

- OPD je prikazan posebno; mora se uporabiti otopina (3.22.3) odvojeno da se jasno razluči OTD
- (*) Označuje najbolju boju pri razvijanju

6. ISPITIVANJE DVODIMENZIONALNOM TANKOSLOJNOM KROMATOGRAFIJOM

Postupak dvodimenzionalne kromatografije zahtijeva uporabu dodatnih standarda i reagensa.

6.1. Dodatne referentne otopine i tvari

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-fenilendiamin (2-NPPD)

6.1.6. 4-nitro-1,2-fenilendiamin (4-NOPD). Pripremi se 0,5 % m/v otopina svake od dodatnih referentnih tvari kako je opisano u 3.21.

6.2. Dodatna otapala za razvijanje

6.2.1. Etil acetat – cikloheksan – otopina amonijaka, 25 % (65: 30: 0,5 po volumenu)

6.3. Dodatni sustav za indikaciju

U posudu za razvijanje za tankoslojnu kromatografiju stavi se staklena posuda, doda oko 2 g kristalnog joda i posuda zatvori odgovarajućim zaklopcem.

6.4. Kromatografija

- 6.4.1. Na površinu apsorbenta na tankoslojnoj ploči (4.1.3.), ucrtaju se dvije linije, kako pokazuje slika 1.
- 6.4.2. U atmosferi dušika (4.1.1.) nanese se 1 do 4 μL ekstrakta (5.1.) na osnovnu točku 1 (Slika 1.) koja je na 2 cm od obje strane. Količina ekstrakta ovisi o intenzitetu mrlja na kromatogramima 5.2.
- 6.4.3. Između točaka 2 i 3 (Slika 1.) podijele se oksidacijska bojila koja su identificirana ili se trebaju identificirati prema 5.2. (udaljenost između točaka 1,5 cm). Nanese se 2 μL svake od referentnih otopina – osim DAP kojega mora biti 6 μL . Provede se postupak pod dušikom (6.4.2.).
- 6.4.4. Ponovi se postupak iz 6.4.3. na osnovnim točkama 4 i 5 (Slika 1.) i drži ploča pod dušikom do trenutka kromatografiranja (udaljenost točaka 1,5 cm).
- 6.4.5. Posuda za kromatografiranje ispere se dušikom (3.8.) i stavi u nju prikladna količina otapala za razvijanje 3.22.2. Ploča (6.4.4.) se stavi u posudu i razvija u mraku u prvom smjeru elucije (Slika 1.). Eluira se sve dok fronta otapala ne dosegne liniju označenu na ploči (približno 13 cm).
- 6.4.6. Ploča se makne iz posude i stavi se u posudu za kromatografiju, prethodno ispranu dušikom, kako bi elucijsko otapalo isparilo za najviše 60 minuta.
- 6.4.7. Graduiranom epruvetom za testiranje stavi se prikladna količina elucijskog otapala (6.2.) u posudu ispranu dušikom (3.8.), stavi se ploča, zarotirana za 90° u posudu (6.4.6.) i kromatografira se u drugom smjeru (također u mraku), dok fronta otapala ne dosegne liniju ucrtanu na površinu apsorbenta. Ploča se makne iz posude i elucijsko otapalo se isparava na zraku.
- 6.4.8. Ploča se stavi na 10 minuta u kromatografsku posudu s parama joda (6.3.) i interpretiraju se dvosmjerni kromatogrami pomoću R_f vrijednosti i boje referentnih tvari, kromatografiranih u isto vrijeme (Tablica II. prikazuje vodič za R_f vrijednosti i boje).

Napomena

Kako bi se dobilo najjače obojenje mrlja, ostavi se kromatogram izložen atmosferi pola sata nakon razvijanja.

- 6.4.9. Prisustvo oksidacijskih bojila, pronađenih u 6.4.8. može se definitivno potvrditi ponavljanjem postupka opisanog u 6.4.1. do 6.4.8. i dodatkom 1 μL referentne tvari identificirane u 6.4.8. na osnovnu točku 1, na vrh količine ekstrakta specificiranog u 6.4.2.

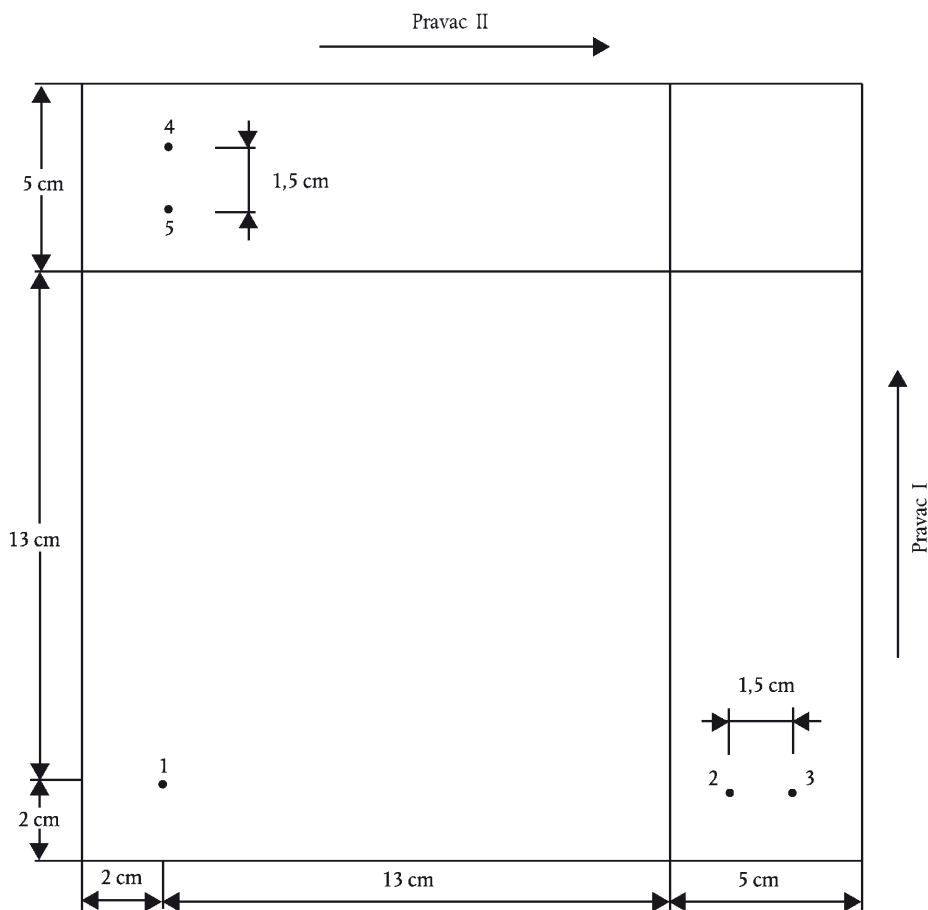
Ako se u usporedbi s kromatogramom dobivenim u 6.4.8. ne nađe drugih mrlja, interpretacija kromatograma 6.4.8. je ispravna.

TABLICA II.

Boja referentnih tvari nakon kromatografije i razvijanja s jodovim parama

Referentne tvari	Boja nakon razvijanja s jodovim parama
R	bež
P	smeđa
α -N	ljubičasta
β -N	blijedosmeđa
H	ljubičastosmeđa
MPD	žučkastosmeđa
PPD	ljubičastosmeđa
MTD	tamnosmeđa
PTD	žučkastosmeđa
DAP	tamnosmeđa
OAP	narančasta
MAP	žučkastosmeđa
PAP	ljubičastosmeđa
2-NPPD	smeđa
4-NOPD	narančasta

Slika 1.



III. IDENTIFIKACIJA I ODREĐIVANJE NITRITA

A. IDENTIFIKACIJA

1. SVRHA I CILJ

1. Ova metoda je prikladna za identifikaciju nitrita u kozmetičkim proizvodima, posebno kremama i pastama.

2. NAČELO

Prisustvo nitrita je indicirano nastankom obojenih derivata s 2-aminobenzaldehid fenilhidrazonom (Nitrin®).

3. REAGENSI

Svi reagensi trebaju biti analitičke čistoće (p.a.)

3.1. Razrijeđena sumporna kiselina: razrijedi se 2 ml koncentrirane sumporne kiseline ($d_4^{20} = 1,84$) s 11 ml destilirane vode.

3.2. Razrijeđena klorovodična kiselina: razrijedi se 1 ml koncentrirane klorovodične kiseline ($d_4^{20} = 1,19$) s 11 ml destilirane vode.

3.3. Metanol

3.4. Otopina 2-aminobenzaldehid fenilhidrazona (Nitrin ® reagens) u metanolu.

Odvaži se 2,0 g Nitrina ® i kvantitativno se prenese u standardnu tikvicu od 100 ml. Kap po kap se dodaje 4 ml razrijeđene klorovodične kiseline (3.2.) i protrese se. Do oznake se dopuni metanolom i promiješa, dok otopina ne postane potpuno bistra. Otopina se spremi u smeđu staklenu bocu (4.3.).

4. APARATURA

4.1. Čaše, 50 ml

4.2. Standardne tikvice, 100 ml

4.3. Smeđa staklena boca, 125 ml

4.4. Staklena ploča, 10 × 10 cm

4.5. Plastična lopatica (spatula)

4.6. Filtrirni papir, 10 × 10 cm

5. POSTUPAK

5.1. Preko staklene ploče (4.4.) se ravnomjerno rasprostire dio uzorka koji treba analizirati, tako da pokrivni sloj ne bude deblji od 1 cm.

5.2. Namoči se list filtrirnog papira (4.6.) u destiliranu vodu. Položi ga se na uzorak i pritisne prema dolje plastičnom lopaticom (spatulom) (4.5.).

5.3. Pričeka se oko jedne minute i nanese se u središte filtrirnog papira:

— dvije kapi razrijeđene sumporne kiseline (3.1.)

— zatim se doda još dvije kapi Nitrinove ® otopine (3.4.).

5.4. Nakon 5 do 10 sekundi ukloni se filtrirni papir te ga se ispita i na dnevnom svjetlu. Na prisutnost nitrita ukazuje crveno ljubičasto (grimizno) obojenje.

Ako je sadržaj nitrita nizak, crveno ljubičasta boja se nakon pet do 15 sekundi mijenja u žutu. Ako su prisutne velike količine nitrita, do promjene boje dolazi tek nakon jedne do dvije minute.

6. NAPOMENA

Intenzitet crvenoljubičaste boje i vrijeme koje protekne do promjene boje u žutu može biti indikator sadržaja nitrita u uzorku.

B. ODREĐIVANJE

1. SVRHA

Ova metoda opisuje određivanje nitrita u kozmetičkim proizvodima.

2. DEFINICIJA

Sadržaj nitrita u uzorku određen ovom metodom izražava se kao maseni udio (%) natrijeva nitrita.

3. NAČELO

Nakon razrjeđivanja uzorka vodom i razbistrenja, prisutni nitriti reagiraju sa sulfanilamidom i N-1-naftiletilendiaminom te se mjeri optička gustoća dobivene boje na 538 nm.

4. REAGENSI

Svi reagensi trebaju biti analitičke čistoće (p.a.)

4.1. Reagensi za bistrenje: ti reagensi ne trebaju se koristiti dulje od tjedan dana nakon pripreve.

4.1.1. Carrez I. reagens:

Otopi se 106 g kalijeva cianoferata (II), $K_4Fe(CN)_6 \times 3H_2O$, u destiliranoj vodi i razrijedi vodom na 1 000 ml.

4.1.2. Carrez II. reagens:

Otopi se 219,5 g cinkova acetata $Zn(CH_3COO)_2 \times 2H_2O$ i 30 ml ledene octene kiseline u destiliranoj vodi i razrijedi vodom na 1 000 ml.

4.2. Otopina natrijeva nitrita:

Otopi se 0,500 g natrijeva nitrita u destiliranoj vodi u odmjerne tikvici od 1 000 ml i razrijedi vodom do oznake. Razrijedi se 10,00 ml te osnovne standardne otopine na 500 ml.; 1 ml posljednje otopine = 10 mikrograma $NaNO_2$.

4.3. 1N otopina natrijeva hidroksida

4.4. 0,2 % otopina sulfanilamid hidroklorida:

Otopi se 2,0 g sulfanilamida u 800 ml vode uz zagrijavanje. Ohladi se i doda 100 ml koncentrirane klorovodične kiseline uz miješanje. Razrijedi se vodom na 1 000 ml.

4.5. 5N klorovodična kiselina

4.6. N-1-naftil reagens

Ta otopina mora biti pripravljena na dan uporabe. Otopi se 0,1 g N-1- naftiletilendiamina dihidroklorida u vodi i razrijedi vodom na 100 ml.

5. APARATURA

5.1. Analitička vaga

5.2. Odmjerne tikvice od 100, 250, 500 i 1 000 ml

5.3. Trbušaste ili graduirane pipete

- 5.4. Menzure od 100 ml
- 5.5. Naborani filtrirni papir bez nitrita, promjera 15 cm
- 5.6. Vodena kupelj
- 5.7. Spektrofotometar s optičkom ćelijom (kivetom) duljine puta 1 cm
- 5.8. pH metar
- 5.9. Mikrobireta od 10 ml
- 5.10. Čaše od 250 ml
6. POSTUPAK
 - 6.1. Odvaži se oko 0,5 g (m grama) s točnošću od 0,1 mg homogeniziranog uzorka, prenese se vrućom destiliranom vodom kvantitativno u čašu od 250 ml (5.10.) i nadopuni vrućom destiliranom vodom na približno 150 ml. Čaša (5.10.) se stavi na pola sata u vodenu kupelj (5.6.) na 80 °C. Tijekom tog vremena sadržaj se povremeno protrese.
 - 6.2. Ohladi se na sobnu temperaturu i doda se uzastopno, uz miješanje, 2 ml Carrez I. reagensa (4.1.1.) i 2 ml Carrez II. reagensa (4.1.2.).
 - 6.3. Doda se 1N natrijeva hidroksida, kako bi se pH podesio na 8,3. (Pritom se rabi pH metar (5.8.)). Sadržaj se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 250 ml (5.2.) i nadopuni do oznake destiliranom vodom.
 - 6.4. Sadržaj se miješa i filtrira preko naboranog filtrirnog papira (5.5.).
 - 6.5. Odpijetira se (5.3.) najviše 25 ml bistrog filtrata u odmjernu tikvicu od 100 ml (5.2.) i doda destilirane vode do volumena od 60 ml.
 - 6.6. Nakon miješanja doda se 10,0 ml otopine sulfanilamid hidroklorida (4.4.), pa zatim 6,0 ml 5N klorovodične kiseline (4.5.). Promiješa se i pusti stajati pet minuta. Doda se 2,0 ml N-1-naftil reagensa (4.6.), promiješa i pusti stajati tri minute. Razrijedi se vodom do oznake i promiješa.
 - 6.7. Pripremi se slijepa proba ponavljanjem postupaka 6.5. i 6.6., bez dodatka N-1-naftil reagensa (4.6.).
 - 6.8. Izmjeri se (5.7.) optička gustoća otopine dobivene u 6.6., uz slijepu probu kao referentnu otopinu, na 538 nm.
 - 6.9. Iz kalibracijskog grafa (6.10.) očita se sadržaj natrijev nitrita u mikrogramima na 100 ml otopine (m_1 mikrograma), što odgovara optičkoj gustoći izmjerenoj u 6.8.
 - 6.10. Uporabivši 10 μ g po ml otopine natrijeva nitrita (4.2.), pripremi se kalibracijski graf za koncentracije od 0, 20, 40, 60, 80, 100 μ g natrijeva nitrita na 100 ml.
7. RAČUN

Izračuna se sadržaj natrijeva nitrita u uzorku u postotku kao maseni udio pomoću sljedeće formule:

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

gdje je:

m = masa uzorka, odvagano za analizu, u gramima (6.1),

m₁ = količina natrijeva nitrita, određenog u 6.9, u mikrogramima,

V = broj mililitara filtrata, uporabljenoga za mjerenje (6.5).

8. PONOVLJIVOST ⁽¹⁾

Za sadržaj od oko 0,2 % m/m natrijeva nitrita apsolutna vrijednost razlike u rezultatima između dva usporedna određivanja provedena na istom uzorku ne treba biti veća od 0,005 %.

IV. IDENTIFIKACIJA I ODREĐIVANJE SLOBODNOG FORMALDEHIDA

1. SVRHA I CILJ

Ova metoda opisuje identifikaciju i određivanje slobodnog formaldehida. Primjenjiva je na sve kozmetičke proizvode i obuhvaća tri dijela:

1.1. Identifikaciju

1.2. Određivanje pentan-2,4-dion kolorimetrijom

Ta metoda je nedostatna kada je formaldehid kombiniran ili polimeriziran, kao u slučaju formaldehidnih donora. Ako rezultat prelazi najveću dozvoljenu koncentraciju, mora se uporabiti sljedeća metoda.

1.3. Određivanje bisulfitom

Kod ove metode formaldehid se u većini kombiniranih i polimernih spojeva ne uzima u obzir. Međutim, određuju se neke nestabilne kombinacije (npr. heksametilen tetramin). Osim toga, u prisutnosti puferske otopine mjerenje alkaliteta je teško.

2. DEFINICIJA

Sadržaja slobodnog formaldehida u uzorku, određen ovom metodom, izražava se kao postotak masenog udjela.

3. NAČELO

3.1. Dio I. – identifikacija

Formaldehid u sumporno kiselom mediju mijenja Schiffov reagens u ružičasto ili svijetloljubičasto.

3.2. Dio II. – određivanje pentan-2,4-dionom

U prisutnosti amonijeva acetata, formaldehid reagira s pentan-2,4-dionom dajući 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidin. On se ekstrahira s butan-1-olom i mjeri se apsorbancijom ekstrakta na 410 nm.

⁽¹⁾ Vidjeti ISO 5725.

3.3. Dio III. – određivanje bisulfitom.

Formaldehid reagira sa sulfitom u kiselom mediju na 0 °C dajući adicijski spoj. Višak protona se titrira natrijevim hidroksidom. Utrošeni protoni čine osnovu proračuna za određivanje količine formaldehida. Alkalinitet ili kiselost medija mjeri se slijepom probom bez sulfitu.

4. REAGENSI

Svi reagensi trebaju biti analitičke čistoće (p.a.)

4.1. Ledena octena kiselina**4.2. Bezvodni amonijev acetat****4.3. Butan-1-ol****4.4. Sumporna kiselina, oko 2N****4.5. Svježe pripravljena otopina 0,1 M natrijeva sulfita****4.6. Schiffov reagens**

100 mg fuksina se odvaži u čašu i otopi u 75 ml vode na 80 °C. Nakon hlađenja doda se 2,5 g natrijeva sulfita heptahidrata ($\text{Na}_2\text{SO}_3 \times 7\text{H}_2\text{O}$) i 1,5 ml koncentrirane klorovodične kiseline ($d_4^{20} = 1,19$). Nadopuni se do 100 ml.

(Taj reagens je neupotrebljiv nakon dva tjedna.)

4.7. Pentan-2,4-dion reagens.

U odmjernu tikvicu od 1 000 ml otopi se:

150 g amonijevoga acetata (4.2),

2 ml pentan-2,4-diona (svježe destilirana pod sniženim tlakom – ne smije se vidjeti absorpcija pri 410 nm),

3 ml ledene octene kiseline (4.1).

Nadopuni se na 1 000 ml vodom (pH otopine: oko 6,4).

Reagens mora biti svježe pripremljen.

4.8. Standardna otopina sumporne kiseline, 0,1N**4.9. Standardna otopina natrijeva hidroksida, 0,1N****4.10. Otopina joda, 0,1N****4.11. Natrijev tiosulfat, 0,1N****4.12. Osnovna otopina formaldehida**

Ulije se 5 g 37 do 40 % otopine formaldehida u odmjernu tikvicu od 1 000 ml i nadopuni do 1 000 ml. Odredi se jakost te otopine kako slijedi: Makne se 10,00 ml otopine; doda se 25,00 ml standardne 0,1N otopine joda (4.10.) i 10 ml 1N otopine natrijeva hidroksida. Pusti se da stoji pet minuta. Doda se 11 ml 1N HCl i titrira suvišak standardne 0,1N otopine joda (4.10.) standardnom 0,1N otopinom natrijeva tiosulfata (4.11.), uz škrob kao indikator.

1 ml 0,1N otopine joda (4.10.) ekvivalentno je s 1,5 mg formaldehida.

4.13. Referentna otopina formaldehida

Odpipetira se 5,00 ml osnovne otopine (4.12.) u graduiranu tikvicu od 100 ml i nadopuni na 100 ml demineraliziranom vodom. Odpipetira se 5,00 ml gornje otopine u graduiranu tikvicu od 500 ml i nadopuni do 500 ml demineraliziranom vodom.

1 ml te otopine sadrži oko 1 µg formaldehida.

Izračuna se točan sadržaj.

4.14. Otopina timoltaleina, 0,1 g/100 ml 50 % etanola**4.15. Referentna otopina reagensa:**

Kao reagens 4.7., ali bez pentan-2,4-diona

5. APARATURA**5.1. Standardna laboratorijska aparatura****5.2. Filtar za odvajanje faza, Whatman 1 PS (ili ekvivalent)****5.3. Centrifuga**

- 5.4. Spektrofotometar
- 5.5. Staklene kivete s optičkim putem od 1 cm
- 5.6. Potencijometar s automatskim pisačem grafičkog prikaza
- 5.7. Staklene/kalomel elektrode (preporuča se uporaba specijalnih elektroda za rad na niskim temperaturama)
6. POSTUPAK
- 6.1. **Identifikacija**
- 6.1.1. Odvaži se 2 g uzorka za testiranje u čašu od 10 ml.
- 6.1.2. Doda se dvije kapi 2N sumporne kiseline (4.4.) i 2 ml Schiffovoga reagensa (4.6.) (pri uporabi, taj reagens mora biti potpuno bezbojan). Protresti i ostaviti da stoji pet minuta.
- 6.1.3. Ako se unutar pet minuta opazi ružičasto ili svijetloljubičasto obojenje, formaldehid je prisutan u suvišku od 0,01 % i mora se odrediti postupkom 6.2. i, ako je potrebno, postupkom 6.3.
- 6.2. **Određivanje pentan-2,4-dion kolorimetrijom**
- 6.2.1. *Otopina uzorka*
- 6.2.1.1. Odvaži se u odmjernu tikvicu od 100 ml s točnošću od 0,001g količina (m u gramima) uzorka za testiranje koja odgovara predviđenoj količini formaldehida od oko 150 mikrograma.
- 6.2.1.2. Nadopuni se do 100 ml demineraliziranom vodom i promiješa.
- 6.2.1.3. U Erlenmeyerovu tikvicu od 50 ml doda se:
10,00 ml otopine iz 6.2.1.2.,
5,00 ml pentan-2,4-dion reagensa (4.7.),
demineralizirane vode do konačnog volumena od 30 ml.
- 6.2.2. *Referentna otopina*
- Moguće interferencije uzrokovane pozadinskom bojom u uzorku za testiranje uklone se uporabom te referentne otopine. U Erlenmeyerovu tikvicu od 50 ml doda se:
10,00 ml otopine iz 6.2.1.2.,
10,00 ml otopine iz 6.2.1.2.,
demineralizirane vode do konačnog volumena od 30 ml.
- 6.2.3. *Slijepa proba*
- U Erlenmeyerovu tikvicu od 50 ml doda se:
5,00 ml pentan-2,4-dion reagensa (4.7.),
demineralizirane vode do konačnog volumena od 30 ml.
- 6.2.4. *Određivanje*
- 6.2.4.1. Protrese se tikvice iz 6.2.1.3., 6.2.2. i 6.2.3. i urone se u vodenu kupelj od 60 °C na točno deset minuta. Pusti se da se ohladi dvije minute u kupelji ledene vode.

- 6.2.4.2. Prenese se u lijevke za odjeljivanje od 50 ml, koji sadrže 10,00 ml butan-1-ola (4.3.). Svaka tikvica se ispere s 3 do 5 ml vode, a ispirci se dodaju u lijevke. Smjesa se snažno trese točno 30 sekundi. Pusti se da se odijele faze.
- 6.2.4.3. Filtrira se u ćelije za mjerenje kroz filtar za odvajanje faza. Centrifugiranje (5 000 okretaja/min., pet minuta) je manje praktično i dulje traje.
- 6.2.4.4. Na 410 nm se mjeri optička gustoća A_1 ekstrakta otopine uzorka iz 6.2.1.3. prema ekstraktu referentne otopine.
- 6.2.4.5. Jednako se mjeri ekstrakt otopine slijepe probe iz 6.2.3. prema buta-1-olu (A_2)

Napomena

Svi ti postupci moraju se provesti unutar 25 minuta od trenutka stavljanja Erlenmeyerovih tikvica u vodenu kupelj na 60 °C.

6.2.5. *Kalibracijska krivulja*

- 6.2.5.1. U Erlenmeyerovu tikvicu od 50 ml stavi se:
 - 5,00 ml standardne otopine (4.13.),
 - 5,00 ml pentan-2,4-dion reagensa (4.7.),
 - demineralizirana voda do konačnog volumena od 30 ml.
- 6.2.5.2. Nastavi se kako je opisano u odjeljku 6.2.4.5., mjeri se optičku gustoću prema butan-1-olu (4.3.).
- 6.2.5.3. Ponovi se postupak s 10, 15, 20 i 25 ml standardne otopine.
- 6.2.5.4. Za dobivanje nulte vrijednosti nastaviti kao u 6.2.4.5.
- 6.2.5.5. Konstruirati kalibracijsku krivulju nakon oduzimanja nulte vrijednosti (6.2.4.5.) od svake optičke gustoće dobivene u 6.2.5.2. i 6.2.5.3. Beerov zakon vrijedi do 30 µg formaldehida.

6.3. **Određivanje bisulfitom**

6.3.1. *Priprema uzorka za testiranje*

6.3.1.1. Za testiranje

U tariranu čašu odvaži se s točnošću 0,001 g količina uzorka za testiranje (m grama) koja odgovara očekivanoj količini između 3 i 20 mg formaldehida.

6.3.1.2. Za referentni test

Na jednaki način odvaži se referentni uzorak za testiranje (m grama).

6.3.2. *Određivanje*

- 6.3.2.1. Stavi se 5,00 ml 0,1M natrijeva sulfita (4.5.) u čašu od 100 ml i doda se 10,00 ml 0,1N sumporne kiseline (4.8.). Protresa se.
- 6.3.2.2. Čaša se uroni u smjesu leda i soli, kako bi se održala temperatura cjeline na + 2 °C. Ulije se u uzorak za testiranje 6.3.1.1.
- 6.3.2.3. Titrira se brzo potenciometrijski s 0,1N natrijevim hidroksidom (4.9.) uz stalno potresanje i održavanje temperature između + 2 i + 4 °C (neutralna točka leži između pH 9 i 11). Neka je V_1 volumen utrošenog 0,1N natrijeva hidroksida (4.9.)

6.3.3. *Slijepa proba*

Nitrat i dodatno pripremljena otopina kao u 6.3.2.1., pod uvjetima opisanim u 6.3.2.

Neka je V_2 volumen utrošenog 0,1N natrijeva hidroksida (4.9.)

6.3.4. *Referentni test*

Potenciometrijskom titracijom s 0,1N natrijevim hidroksidom (4.9.) ili 0,1N sumpornom kiselinom (4.8.) odredi se kiselost ili alkalnost uzorka u uzorku za testiranje m' . Neka je v' volumen utrošenog 0,1N natrijeva hidroksida ili 0,1N sumporne kiseline.

6.3.5. *Napomene*

Važno je striktno pridržavanje uvjeta testiranja.

Određivanje se može provesti uz timolftalein (4.14.) kao indikator.

7. PRIKAZ REZULTATA

7.1. **Račun za kolorimetrijsku metodu**

7.1.1. Oduzme se A_2 od A_1 i odčita iz kalibracijske krivulje (6.2.5.5.) količina C , u mikrogramima, formaldehida u uzorku za testiranje (6.2.1.3.).

7.1.2. Pomoću sljedeće formule izračuna se sadržaj formaldehida u uzorku kao postotak masenog udjela (% m/m):

$$\text{kol. formaldehida u \%} = \frac{C}{10^3 \times m}$$

7.2. **Račun za metodu titracije bisulfitom**

Poveže se utrošeni volumen 0,1N natrijeva hidroksida (4.9.) ili 0,1N sumporne kiseline (4.8.) u referentnom testu s masom m :

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

U neutralnom proizvodu je v , naravno jednak nuli.

7.2.1. U slučaju kiselog proizvoda:

$$\text{kol. formaldehida u \%} = \frac{0 \cdot 30 (V_2 - V_1 + v)}{m}$$

7.2.2. U slučaju alkalnog proizvoda:

$$\text{kol. formaldehida u \%} = \frac{0 \cdot 30 (V_2 - V_1 - v)}{m}$$

7.3. **Napomena**

Ako se rezultati dviju metoda razlikuju uzima se niža vrijednost.

8. PONOVLJIVOST ⁽¹⁾

Za sadržaj formaldehida od 0,2 %, razlika u rezultatima između dva usporedna određivanja provedena na istom uzorku ne treba biti veća od 0,005 % za kolorimetrijsku metodu i 0,05 %

za bisulfitnu metodu.

⁽¹⁾ Vidjeti ISO 5725.

V. ODREĐIVANJE REZORCINOLA U ŠAMPONIMA I LOSIONIMA ZA KOSU

1. SVRHA I CILJ

Ova metoda specificira određivanje rezorcinola u šamponima i losionima za kosu plinskom kromatografijom. Metoda je pogodna za koncentracije od 0,1 do 2,0 masenih postotaka u uzorku.

2. DEFINICIJA

Sadržaj rezorcinola u uzorku, određen ovom metodom izražava se kao postotak masenog udjela.

3. NAČELO

Rezorcinol i 3,5-dihidrotoluen, (5-metilrezorcinol) dodan kao unutarnji standard, odvajaju se od uzorka tankoslojnom kromatografijom. Oba spoja se izoliraju struganjem njihovih mrlja s tankoslojne ploče i ekstrakcijom metanolom. Konačno se ekstrahirani spojevi suše, siliraju i određuju plinskom kromatografijom.

4. REAGENSI

Svi reagensi trebaju biti analitičke čistoće (p.a.).

4.1. 25 % klorovodična kiselina (m/m)

4.2. Metanol

4.3. 96 % etanol (v/v)

4.4. Već pripravljene TLC silika gel ploče (plastične ili aluminijske) s fluorescentnim indikatorom. Deaktivira se kako slijedi: već obično unaprijed pokrivene silika ploče se poprskaju vodom dok ne postanu glazirane. Pusti se poprskane ploče da se suše na sobnoj temperaturi jedan do tri sata.

Napomena

Ako ploče nisu deaktivirane, može doći do gubitaka rezorcinola zbog ireverzibilne adsorpcije na siliki.

4.5. Otopalo za razvijanje; aceton – kloroform – octena kiselina (20: 75: 5 po volumenu)

4.6. Standardna otopina rezorcinola; otopi se 400 mg rezorcinola u 100 ml 96 % etanola (4.3.) (1 ml odgovara 4 000 µg rezorcinola).

4.7. Unutarnja standardna otopina; otopi se 400 mg 3,5-dihidrotoluena (DHT) u 100 ml 98 % etanola (4.3.) (1 ml odgovara 4 000 µg DHT).

4.8. Standardna smjesa; u odmjernoj tikvici od 100 ml pomiješa se 10 ml otopine 4.6. i 10 ml otopine 4.7., nadopuni do oznake 96 % etanolom (4.3.) i promiješa (1 ml odgovara 400 µg rezorcinola i 400 µg DHT).

4.9. Tvari za siliranje:

4.9.1. N, O-bis-(trimetilsilil)trifluoroacetamid (BSTFA)

4.9.2. heksametildisilazan (HMDS)

4.9.3. trimetilklorosilan (TMCS)

5. APARATURA

5.1. Uobičajena oprema za plinsku kromatografiju

5.2. Stakleno posuđe

6. POSTUPAK

6.1. **Priprema uzorka**

6.1.1. U čašu od 150 ml odvaži se točno dio proizvoda za testiranje (m grama), koji sadrži približno 20 do 50 mg rezorcinola.

6.1.2. Zakiseli se klorovodičnom kiselinom dok smjesa ne postane kisela (potrebno je oko 2 do 4 ml), doda se 10 ml (40 mg DHT) otopine unutarnjeg standarda (4.7.) i miješa. Etanolom (4.3.) se prenese u odmjernu tikvicu od 100 ml, nadopuni etanolom do oznake i miješa.

6.1.3. Kao neprekinuta linija duljine oko 8 cm, nanese se 250 μ L otopine (6.1.2.) na deaktiviranu ploču silike (4.4.). Pazi se da linija bude što tanja.

6.1.4. Na istu ploču nanese se na jednaki način (6.1.3.) 250 μ L standardne smjese (4.8.).

6.1.5. Na dvije točke početne linije nanese se 5 μ L svake od otopina 4.6. i 4.7. da se olakša lokaliziranje nakon razvijanja ploče.

6.1.6. Ploča se razvija u (nezasićenoj) posudi napunjenoj otapalom za razvijanje 4.5. dok fronta otapala ne dosegne liniju udaljenu 12 cm od početne linije; to obično traje oko 45 minuta. Ploča se suši na zraku te se pod kratkovalnim UV svjetlom (254 nm) lokalizira rezorcinol/DHT-područje. Oba spoja imaju približno jednake R_f vrijednosti. Olovkom se označe pojasevi na 2 mm udaljenosti od vanjske tamne granične linije pojaseva. Maknu se ta područja i sakupi se adsorbent svakog pojasa u bočicu od 10 ml.

6.1.7. Ekstrahira se adsorbent koji sadrži uzorak i adsorbent koji sadrži standardnu smjesu na sljedeći način:

Doda se 2 ml metanola (4.2.) i ekstrahira jedan sat uz neprekidno miješanje. Smjesa se filtrira i ekstrakcija se ponovi s 2 ml metanola još 15 minuta.

6.1.8. Ekstrakti se spoje i ispari se otapalo tijekom noći u vakuum eksikatoru napunjenom prikladnim sredstvom za sušenje. Ne zagrijava se.

6.1.9. Ostaci se siliraju (6.1.8.) ili kako je opisano u 6.1.9.1. ili u 6.1.9.2.

6.1.9.1. Mikrošpicom se doda 200 μ L BSTFA (4.9.1.) i smjesa se ostavi u zatvorenoj posudi na sobnoj temperaturi 12 sati.

6.1.9.2. Mikrošpicom se doda uzastopno 200 μ L HMDS (4.9.2.) i 100 μ L TMCS (4.9.3.) te se smjesa grije u zatvorenoj posudi 30 minuta na 60 °C. Smjesa se ohladi.

6.2. **Plinska kromatografija**

6.2.1. *Kromatografski uvjeti*

Kolona mora omogućiti rezoluciju, R, jednaku ili bolju od 1,5, gdje je

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

gdje je:

r_1 i r_2 = retencijsko vrijeme dvaju vrhova u minutama,

w_1 i w_2 = širina istih vrhova na polovini visine u mm,

d' = brzina dijagrama (papira) u mm u minuti

Uvjeti za kolonsku i plinsku kromatografiju:

Materijal za kolonu:	nehrđajući čelik
duljina:	200 cm
unutarnji promjer:	~ 3 mm
punilo:	10 % OV-17 na Chromosorbu WAW 100 do 120 mesh

Plameno-ionizacijski detektor

Temperature:	
kolona:	185 °C (izotermično)
detektor:	250 °C
injekcijski ulaz:	250 °C
Nosivi plin:	dušik
protok:	45 ml/min.

Za pravila protoka vodika i zraka slijede se upute proizvođača.

- 6.2.2. U plinski kromatograf uštrca se 1 do 3 µL otopina dobivenih pod 6.1.9. Provede se pet uštrcaja za svaku otopinu (6.1.9.), izmjere se površine ispod vrhova, izračuna prosječna vrijednost i izračuna omjer površine vrhova; $S = \text{površina vrha rezorcinola} / \text{površina vrha DHT}$.

7. RAČUN

Koncentracija rezorcinola u uzorku, izražena kao maseni udio, dana je izrazom:

$$\% \text{ rezorcinol} = \frac{4}{M} \times \frac{S_{\text{uzorka}}}{S_{\text{standardne smjese}}}$$

gdje je:

M	= dio uzorka za testiranje u gramima (6.1.1),
S_{uzorka}	= srednja vrijednost površine vrha s obzirom na 6.2.2 za otopinu uzorka,
$S_{\text{standardne smjese}}$	= srednja vrijednost površine vrha s obzirom na 6.2.2 za standardnu smjesu.

8. PONOVLJIVOST ⁽¹⁾

Za sadržaj rezorcinola od oko 0,5 % apsolutna vrijednost razlike u rezultatima između dva usporedna određivanja provedena na istom uzorku ne treba biti veća od 0.025 %.

VI. ODREĐIVANJE METANOLA U ODNOSU NA ETANOL ILI PROPAN-2-OL

1. SVRHA I CILJ

Ova metoda opisuje plinsko kromatografsku analizu metanola u svim vrstama kozmetičkih proizvoda (uključujući aerosole).

Mogu se odrediti relativne količine od 0 do 10 %.

2. DEFINICIJA

Sadržaj metanola određen ovom metodom izražava se kao postotak masenog udjela metanola u odnosu na etanol ili propan-2-ol.

3. NAČELO

Određivanje se provodi plinskom kromatografijom.

⁽¹⁾ Vidjeti ISO 5725.

4. REAGENSI
- Rabe se reagensi analitičke čistoće (p.a.).
- 4.1. Metanol
- 4.2. Apsolutni etanol
- 4.3. Propan-2-ol
- 4.4. Kloroform, oslobođen alkohola ispiranjem vodom
5. APARATURA
- 5.1. Plinski kromatograf
- s katarometarskim detektorom za aerosolne uzorke,
- s plameno-ionizacijskim detektorom za neaerosolne uzorke.
- 5.2. Odmjerne tikvice, 100 ml
- 5.3. Pipete, 1 ml, 20 mL 0 do 1 ml
- 5.4. Mikrošprice 0 do 100 µL i 0 do 5 µL
- i (samo za aerosolne uzorke) posebne plinsko nepropusne šprice s klizajućim ventilom (vidjeti postupak uzorkovanja, Slika 5 ⁽¹⁾)
6. POSTUPAK
- 6.1. **Priprema uzorka**
- 6.1.1. Aerosolni proizvodi se uzorkuju u skladu s Poglavljem II. Priloga Direktivi Komisije 80/1335/EEZ od 22. prosinca 1980. ⁽⁵⁾ i tada se analiziraju plinskom kromatografijom pod uvjetima 6.2.1.
- 6.1.2. Neaerosolni proizvodi uzorkovani u skladu s gore spomenutim Poglavljem II se razrijede vodom do razine od 1 do 2 % etanola ili propan-2-ola i tada analiziraju plinskom kromatografijom pod uvjetima 6.2.2.
- 6.2. **Plinska kromatografija**
- 6.2.1. Za aerosolne uzorke rabi se katarometarski detektor.
- 6.2.1.1. Kolona se napuni s 10 % Hallcomid M18 na Chromosorb WAW umreženja 100 do 200 (mesh).
- 6.2.1.2. Kolona mora omogućiti rezoluciju, R, jednaku ili bolju od 1,5, gdje je
- $$R = 2 \frac{d'r_2 - d'r_1}{w_1 + w_2}$$
- gdje je:
- r_1 i r_2 = retencijsko vrijeme dvaju vrhova u minutama,
- w_1 i w_2 = širina istih vrhova na polovini visine u mm,
- d' = brzina dijagrama (papira) u mm u minuti
- 6.2.1.3. Sljedeći uvjeti omogućuju tu rezoluciju:
- | | |
|------------------------------|------------------|
| Materijal za kolonu: | nehrđajući čelik |
| duljina: | 3,5 m |
| unutarnji promjer: | 3 mm |
| struja u mostiću katahometra | 150 mA |

⁽¹⁾ SL L 383, 31.12.1980., str. 27.

Nosivi plin:	helij
tlak:	2,5 bara
protok:	45 ml/min
Temperature:	
injekcijski ulaz:	150 °C
detektor:	150 °C
peć kolone:	65 °C

Mjerenje površine vrhova se može poboljšati elektronskom integracijom.

6.2.2. Za neaerosolne uzorke:

6.2.2.1. Kolona se napuni Chromosorbom 105 Porapak QS i uporabi se plameno-ionizacijski detektor.

6.2.2.2. Kolona mora omogućiti rezoluciju, R, jednaku ili bolju od 1,5, gdje je

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

gdje je:

r_1 i r_2 = retencijsko vrijeme dvaju vrhova u minutama,

w_1 i w_2 = širina istih vrhova na polovini visine u mm,

d' = brzina dijagrama (papira) u mm u minuti

6.2.2.3. Sljedeći uvjeti omogućuju tu rezoluciju:

Materijal za kolonu:	nehrđajući čelik
duljina:	2 metra
promjer:	3 mm

osjetljivost elektrometra: 8×10^{-10} A

Plinovi:

nosivi:	dušik
tlak:	2,1 bara
protok:	40 ml/min

Pomoćni plin:

vodik	
tlak:	1,5 bara
protok:	20 ml/min

Temperature:

injekcijski ulaz:	150 °C
detektor:	230 °C
peć kolone:	120 do 130 °C

7. STANDARDNI GRAF

7.1. Za postupak plinske kromatografije 6.2.1. (Hallcomid M18 kolona) rabe se sljedeće standardne smjese. Te smjese se pripremaju odmjeravanjem pipetama, ali se točna količina određuje momentalnim vaganjem pipete ili tikvice nakon svakog dodatka.

Relativna moć (m/m %)	Metanol (ml)	Etanol ili propan-2-ol (ml)	Kloroform, dodan volumenu
približno 2,5 %	0,5	20	100 ml
približno 5,0 %	1,0	20	100 ml
približno 7,5 %	1,5	20	100 ml
približno 10,0 %	2,0	20	100 ml

Ubrizga se 2 do 3 μ L u kromatograf pod uvjetima iz 6.2.1.

Izračuna se omjer površina vrhova (metanol/etanol) ili (metanol/propan-2-ol) svake smjese. Nacrta se standardni graf:

X-os: % metanola u odnosu na etanol ili propan-2-ol,

Y-os: omjer površina vrhova (metanol/etanol) ili (metanol/propan-2-ol).

- 7.2. Za postupak plinske kromatografije 6.2.2. (Porapak QS ili Chromosorb 105) uporabe se sljedeće standardne otopine. Te smjese se pripremaju odmjeravanjem pipetama, ali se točna količina određuje momentalnim vaganjem pipete ili tikvice nakon svakog dodatka.

Relativna koncentracija (m/m %)	Metanol (μ l)	Etanol ili propan-2-ol (ml)	Voda, dodana volumenu
približno 2,5 %	50	2	100 ml
približno 5,0 %	100	2	100 ml
približno 7,5 %	150	2	100 ml
približno 10,0 %	200	2	100 ml

Ubrizga se od 2 do 3 μ L u kromatograf pod uvjetima iz 6.2.2.

Izračuna se omjer površina vrhova (metanol/etanol) ili (metanol/propan-2-ol) svake smjese. Nacrta se standardni graf:

X-os: % metanola u odnosu na etanol ili propan-2-ol,

Y-os: omjer površina vrhova (metanol/etanol) ili (metanol/propan-2-ol).

- 7.3. Standardni graf mora biti pravac.

8. PONOVLJIVOST ⁽¹⁾

Za sadržaj metanola od 5 % u odnosu na etanol ili propan-2-ol razlika u rezultatima između dva usporedna određivanja provedena na istom uzorku ne treba biti veća od 0,25 %.

⁽¹⁾ Vidjeti ISO 5725.