

31983L0514

24.10.1983.

SLUŽBENI LIST EUROPSKIH ZAJEDNICA

L 291/9

## TREĆA DIREKTIVA KOMISIJE

od 27. rujna 1983.

**o usklađivanju zakonodavstava država članica u odnosu na metode analize potrebne za provjeru sastava kozmetičkih proizvoda**

(83/514/EEZ)

KOMISIJA EUROPSKIH ZAJEDNICA,

DONIJELA JE OVU DIREKTIVU:

uzimajući u obzir Ugovor o osnivanju Europske ekonomske zajednice,

## Članak 1.

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

uzimajući u obzir Direktivu Vijeća 76/768/EEZ od 27. srpnja 1976. o usklađivanju zakonodavstava država članica u odnosu na kozmetičke proizvode <sup>(1)</sup>, kako je zadnje izmijenjena Direktivom 83/341/EEZ <sup>(2)</sup>, a posebno njezin članak 8. stavak 1.,

— određivanje diklorometana i 1,1,1-triklorometana,

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

— identifikacija i određivanje kinolin-8-ola i bis(8-hidroksikinolinij) sulfata,

budući da sve metode analize moraju biti postavljene što je moguće prije; budući da su u svrhu postizanja toga cilja već poduzeta dva koraka kroz definiciju određenih metoda u direktivama Komisije 80/1335/EEZ <sup>(3)</sup> i 82/434/EEZ <sup>(4)</sup>, treći korak se sastoji od definiranja metoda za određivanje diklorometana i 1,1,1-trikloroetana, identifikaciju i određivanje kinolin-8-ola i bis(8-hidroksikinolinij) sulfata, određivanje amonijaka, identifikaciju i određivanje nitrometana, identifikaciju i određivanje merkaptooctene kiseline u sredstvima za kovrčanje i ravnjanje kose i proizvoda za depilaciju, identifikaciju i određivanje heksaklorofena (INN), tiona tozilkloramid natrija (INN), određivanje ukupnog fluora u kremama za zube, identifikaciju i određivanje organoživinih spojeva, određivanje alkalijskih i zemnoalkalijskih sulfida;

— određivanje amonijaka,

— identifikacija i određivanje nitrometana,

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

— identifikacija i određivanje merkaptooctene kiseline u proizvodima za kovrčanje i ravnjanje kose i u proizvodima za depilaciju,

— identifikacija i određivanje heksaklorofena (INN),

— određivanje tozilkloramid natrija (INN),

— određivanje ukupnog fluora u kremama za zube,

<sup>(1)</sup> SL L 262, 27.9.1976., str. 169.

<sup>(2)</sup> SL L 188, 13.7.1983., str. 15.

<sup>(3)</sup> SL L 383, 31.12.1980., str. 27.

<sup>(4)</sup> SL L 185, 30.6.1982., str. 1.

— identifikacija i određivanje organoživinih spojeva,

— određivanje alkalijskih i zemnoalkalijskih sulfida,

*Članak 3.*

provode u skladu s metodama opisanima u ovom Prilogu.

Ova je Direktiva upućena državama članicama.

Sastavljeno u Bruxellesu 27. rujna 1983.

*Članak 2.*

Države članice donose zakone i druge propise potrebne za usklađivanje s ovom Direktivom najkasnije do 31. prosinca 1984. One o tome odmah obavješćuju Komisiju.

*Za Komisiju*  
Frans ANDRIESEN  
*Član Komisije*

## PRILOG

## ODREĐIVANJE DIKLORMETANA I 1,1,1-TRIKLORETANA

1. PODRUČJE PRIMJENE  
Ova metoda opisuje određivanje diklormetana (metilen klorida) i 1,1,1-trikloroetana (metil kloroforma) u svim kozmetičkim proizvodima koji vjerojatno sadrže ta otapala.
2. DEFINICIJA  
Sadržaj diklormetana i 1,1,1-trikloroetana u uzorku, određena u skladu s ovom metodom izražava se kao maseni udio.
3. NAČELO  
Ova metoda rabi plinsku kromatografiju s kloroformom kao unutarnji standard.
4. REAGENSI  
Svi reagensi moraju biti analitičke čistoće (p.a.)
  - 4.1. Kloroform ( $\text{CHCl}_3$ ).
  - 4.2. Ugljikov tetraklorid ( $\text{CCl}_4$ ).
  - 4.3. Diklormetan ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).
  - 4.4. 1,1,1-trikloroetan ( $\text{CH}_3\text{CCl}_3$ ).
  - 4.5. Aceton.
  - 4.6. Dušik.
5. APARATURA
  - 5.1. Uobičajena laboratorijska aparatura.
  - 5.2. Plinski kromatograf s detektorom toplinske provodnosti
  - 5.3. Prijenosna boca, 50 do 100 ml (vidjeti metoda uzorkovanja 5.3.)<sup>(1)</sup>
  - 5.4. Tlačno plinska šprica, 25 ili 50  $\mu\text{l}$  (vidjeti metodu uzorkovanja 5.4.2.2.)<sup>(1)</sup>
6. POSTUPAK
  - 6.1. Uzorak koji nije pod tlakom: točno se važe u začepjenoj Erlenmeyer tikvici. Doda se točno vagana količina kloroforma (4.1.) kao unutarnjeg standarda, ekvivalentna pretpostavljenoj količini diklormetana i 1,1,1-trikloroetana u uzorku. Temeljito se miješa.

<sup>(1)</sup> SL L 383, 31.12.1980., str. 27.

- 6.2. Uzorak pod tlakom: rabi se metoda uzorkovanja opisana u poglavlju o uzorkovanju, ali sa sljedećim izmjenama:
- 6.2.1. Nakon prenošenja uzorka u prijenosnu bocu (5.3.), doda se u bocu volumen kloroforma (4.1.) kao unutarnjeg standarda, ekvivalentan pretpostavljenoj količini diklormetana i/ili 1,1,1-triklorešana u uzorku. Temeljito se miješa. Ventil se ispere s 0,5 ml ugljikova tetraklorida (4.2.). Nakon sušenja iz razlike se točno izračuna masa unutarnjeg standarda.
- 6.2.2. Nakon što se šprica napuni uzorkom, njena mlaznica se očisti dušikom (4.6.) tako da se prije ubrizgavanja u kromatograf uklone svi ostaci.
- 6.2.3. Nakon svakog uzimanja uzorka, ventil i prijenosne boce moraju se isprati nekoliko puta acetonom (4.5.) (pomoću šprice) i temeljito osušiti dušikom (4.6.)
- 6.2.4. Za svaku analizu mjerenja se provode uporabom dvije različite prijenosne boce, uz pet mjerenja po boci.

## 7. KROMATOGRAFSKI UVJETI

### 7.1. **Predkolona**

Cijev: nehrđajući čelik

Duljina: 300 mm

Promjer: 3 ili 6 mm.

Punilo: isti materijal koji se rabi za punjenje analitičke kolone.

### 7.2. **Kolona**

Stacionarna faza je izrađena od Halcomid M 18 na kromosorb. Kolona mora omogućiti rezoluciju, R, jednaku ili bolju od 1,5, gdje je

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

gdje je:

$r_1$  i  $r_2$  = retencijsko vrijeme dvaju vrhova u minutama

$w_1$  i  $w_2$  = širina istih vrhova na polovici visine u milimetrima

$d'$  = brzina dijagrama (papira) u milimetrima u minuti

### 7.3. Primjer kolona i rezultata:

Kolona	I	II
Materijal:	cijev od nehrđajućeg čelika	cijev od nehrđajućeg čelika
Duljina:	350 cm	400 cm
Promjer:	3 mm	6 mm
Potpora:		
kromosorb	WAW	WAW-DMCS-HP
frita:	od 100 do 120 mesh	od 60 do 80 mesh
Stacionarna faza:	Halcomid M 1810 %	Halcomid M 1820 %

Temperaturni uvjeti mogu varirati kao funkcija aparata. U primjerima je bilo kako slijedi:

Kolona:	I	II
Temperature:		
Kolona:	65 °C	75 °C
Injektor:	150 °C	125 °C
Detektor:	150 °C	200 °C
Nosivi plin:		
Protok helija:	45 ml/min.	60 ml/min.
Tlak:	2,5 bara	2 bara
Ubrizgani volumen:	15 µl	15 µl

## 8. SMJESA ZA UTVRĐIVANJE FAKTORA ODZIVA

U Erlenmeyerovoj tikvici se pripremi sljedeća točno odvagana smjesa:

Diklorometan (4.3.), 30 %-tni (m/m).

1,1,1-trikloroetan (4.4.), 35 %-tni (m/m).

Kloroform (4.1.), 35 %-tni (m/m).

## 9. IZRAČUN

9.1. **Računa se faktor odziva tvari „p” u odnosu na tvar „a”, odabranu kao unutarnji standard**

Neka je prva tvar „p”, gdje je:

$k_p$  = njezin faktor odziva,

$m_p$  = njezina masa u smjesi,

$A_p$  = površina njezinog vrha.

Neka je druga tvar „a”, gdje je:

$k_a$  = njezin faktor odziva (jednak jedinici),

$M_a$  = njezina masa u smjesi,

$A_a$  = površina njezina vrha,

Tada je:

$$k_p = \frac{m_p \times A_a}{M_a \times A_p}$$

Kao primjer dobiveni su sljedeći faktori odziva (za kloroform:  $k = 1$ ):

Diklorometan  $k_1 = 0,78 \pm 0,03$

1,1,1-trikloroetan  $k_1 = 1,00 \pm 0,03$

9.2. **Izračuna se maseni udio (% m/m) diklorometana i 1,1,1-trikloroetana prisutnih u uzorku koji treba analizirati**

Neka je:

$m_a$  = masa (u gramima) dodanog kloroforma,

$M_s$  = masa (u gramima) uzorka koji treba analizirati

$A_a$  = površina vrha kloroforma,

$A_1$  = površina vrha diklorometana,

$A_2$  = površina vrha 1,1,1-trikloroetana,

Tada je:

$$\%(m/m) \text{ CH}_2\text{Cl}_2 = \frac{m_p \times A_1 \times k_1 \times 100}{A_a \times M_s}$$

$$\%(m/m) \text{ CH}_3\text{CCl}_3 = \frac{m_p \times A_2 \times k_2 \times 100}{A_a \times M_s}$$

10. PONOVLJIVOST <sup>(1)</sup>

Za sadržaj diklorometana i/ili 1,1,1-trikloroetana od 25 % (m/m), apsolutna vrijednost razlike u rezultatima između dva usporedna određivanja provedena na istom uzorku ne treba biti veća od 2,5 % (m/m).

<sup>(1)</sup> ISO 5725.

**IDENTIFIKACIJA I ODREĐIVANJE KINOLIN-8-OLA I BIS(8-HIDROSIKINOLINIJ) SULFATA**

1. **PODRUČJE PRIMJENE**  
Ova metoda opisuje identifikaciju i kvantitativno određivanje kinolin-8-ola i njegova sulfata.
2. **DEFINICIJA**  
Sadržaj kinolin-8-ola i bis(hidroksikinolin) sulfata u uzorku, određen ovom metodom, izražava se kao maseni udio kinolin-8-ola.
3. **NAČELO**
  - 3.1. **Identifikacija**  
Identifikacija se provodi tankoslojnom kromatografijom.
  - 3.2. **Određivanje**  
Određivanje se provodi spektrofotometrijom kompleksa dobivenog Fehlingovom otopinom, na 410 nm.
4. **REAGENSI**  
Svi reagensi moraju biti analitičke čistoće (p.a.).
  - 4.1. Kinolin-8-ol
  - 4.2. Benzen. S obzirom na njegovu otrovnost, pri radu s benzenom potrebna je velika pozornost.
  - 4.3. Kloroform.
  - 4.4. Vodena otopina natrijeva hidroksida, 50 % (m/m).
  - 4.5. Bakrov sulfat pentahidrat.
  - 4.6. Kalijev natrijev tartarat.
  - 4.7. M klorovodična kiselina.
  - 4.8. 0,5 M sumporna kiselina.
  - 4.9. M otopina natrijeva hidroksida.
  - 4.10. Etanol.
  - 4.11. Butan-1-ol.
  - 4.12. Ledena octena kiselina.

- 4.13. 0,1 klorovodična kiselina
- 4.14. „Celit 545” ili ekvivalent.
- 4.15. **Standardne otopine**
- 4.15.1. Odvaži se 100 mg kinolin-8-ola (4.1.) u odmjernu tikvicu od 100 ml. Otopi se u malo sumporne kiseline (4.8.). Dopuni se sumpornom kiselinom do oznake (4.8.).
- 4.15.2. Odvaži se 100 mg kinolin-8-ola u odmjernu tikvicu od 100 ml. Otopi se u etanolu (4.10.). Nadopuni se do oznake etanolom (4.10.) i promiješa.
- 4.16. **Fehlingova otopina**
- Otopina A
- Odvaži se 7 g bakrova sulfata pentahidrata (4.5.) u odmjernu tikvicu od 100 ml. Otopi se u malo vode. Nadopuni se vodom do oznake i promiješa.
- Otopina B
- Odvaži se 35 g kalijeva natrijeva tartarata (4.6.) u odmjernu tikvicu od 100 ml. Otopi se u 50 ml vode. Doda se 20 ml natrijeva hidroksida (4.4.). Nadopuni se do oznake vodom i promiješa. Neposredno prije uporabe, u odmjernu tikvicu od 100 ml otpipetira se 10 ml otopine A i 10 ml otopine B. Nadopuni se do oznake i promiješa.
- 4.17. **Otopala za eluciju za tankoslojnu kromatografiju**
- I : Butan-1-ol (4.11.)/octena kiselina (4.12.)/voda (80: 20:20; v/v/v).
- II : Kloroform (4.13.)/octena kiselina (4.12.) (95: 5; v/v).
- 4.18. 2,6-dikloro-4-(kloroimino)cikloheksa-2,5-dienon, 1 % (m/v) otopina u etanolu (4.10).
- 4.19. Natrijev karbonat, 1 %-tna (m/v) otopina u vodi.
- 4.20. Etanol (4.10.), 30 %-tna (v/v) otopina u vodi.
- 4.21. Dinatrijev dihidrogen etilendiamintetraacetat, 5 %-tna (m/v) otopina u vodi.
- 4.22. **Puferska otopina, pH 7**
- U odmjernu tikvicu od litre odvaži se 27 g natrijeva bezvodnog dihidrogenortofosfata i 70 g dikalijeva hidrogenortofosfata trihidrata. Nadopuni se do oznake vodom.
- 4.23. **Priprava ploča za tankoslojnu kromatografiju**
- Već gotove ploče za tankoslojnu kromatografiju debljine 0,25 mm (npr. Merck Kieselge 60 ili ekvivalent). Prije uporabe poprska se s 10 ml reagensa (4.21.) i suši na 80 °C.
5. APARATURA
- 5.1. Tikvica s okruglim dnom i ubrušenim vratom od 100 ml.
- 5.2. Odmjerne tikvice.
- 5.3. Graduirane pipete, 10 i 5 ml.

- 5.4. Trbušaste pipete, 20, 15, 10 i 5 ml.
- 5.5. Lijeenci za odjeljivanje, 100, 50 i 25 ml.
- 5.6. Naborani filtrirni papir, promjera 90 mm.
- 5.7. Rotavapor
- 5.8. Hladilo za kondenzaciju refluksa s ubrušenim vratom.
- 5.9. Spektrofotometar.
- 5.10. Optičke ćelije s 10 mm duljine puta.
- 5.11. Mješač s vrućom pločom.
- 5.12. Staklena kolona za kromatografiju dimenzija: 160 mm dugačka, promjera 8 mm, fritana sa staklenom vunom na nižem kraju i adapter za primjenu tlaka na gornjem kraju.
6. POSTUPAK
- 6.1. **Identifikacija**
- 6.1.1. *Tekući uzorci*
- 6.1.1.1. pH obroka uzorka za testiranje podešen je na 7,5 i 10  $\mu$ l se kapne na početnu liniju prethodno obrađene silika gel tankoslojne ploče (4.23.).
- 6.1.1.2. 10 i 30  $\mu$ l standardne otopine (4.15.2.) kapne se na još dvije točke početne linije, nakon čega se ploča razvija u jednom od dva eluenta (4.17.).
- 6.1.1.3. Kada fronta otapala dosegne 150 mm, ploča se suši na 110 °C (15 minuta). Pod UV svjetiljkom (366 nm) mrlje kinolin-8-ola fluoresciraju žuto.
- 6.1.1.4. Ploča se poprskava otopinom natrijeva karbonata (4.19.). Osuši se i poprskava otopinom 2,6-dikloro-4-(kloroimino)cikloheksa-2,5-dienona (4.18.). Kinolin-8-ol postaje vidljiv kao plava mrlja.
- 6.1.2. *Čvrsti uzorci ili kreme*
- 6.1.2.1. Dispergira se 1 g uzorka u 5 ml puferne otopine (4.22.). Nakon toga se prenese s 10 ml kloroforma (4.3.) u lijevak za odjeljivanje i tresu se. Nakon odvajanja sloja kloroforma, vodeni sloj se ekstrahira još dva puta kloroformom (4.3.). Spojeni i filtrirani ekstrakti kloroforma isparavaju se gotovo do suha u tikvici s okruglim dnom od 100 ml (5.1.) na rotavaporu (5.7.). Ostatak se otopi u 2 ml kloroforma (4.3.) i kapne se 10 i 30  $\mu$ l dobivene otopine na silika gel tankoslojnu ploču (4.23.) u skladu s metodom opisanom u 6.1.1.1.
- 6.1.2.2. Na ploču se nanese 10 i 30  $\mu$ l standardne otopine (4.15.2.) i nastavi se postupak kao što je opisano u 6.1.1.2. do 6.1.1.4.
- 6.2. **Određivanje**
- 6.2.1. *Tekući uzorci*
- 6.2.1.1. Odvage se 5 g uzorka u tikvicu s okruglim dnom od 100 ml. Doda se 1 ml otopine sumporne kiseline (4.8.) i smjesa se isparava gotovo do suha pod sniženim tlakom na 50 °C.



- 6.2.1.2. Taj ostatak se otopi u 20 ml vruće vode. Prenese se u odmjernu tikvicu od 100 ml. Ispere se tri puta s 20 ml vode. Nadopuni se vodom do oznake i promiješa.
- 6.2.1.3. Otpipetira se 5 ml te otopine u lijevak za odjeljivanje od 50 ml (5.5.). Doda se 10 ml Fehlingove otopine (4.16.). Dobiveni kinolin-8-ol bakrov kompleks (oksin bakar (ISO)) ekstrahira se tri puta s 8 ml kloroforma (4.3.).
- 6.2.1.4. Slojevi kloroforma se sakupe i filtriraju u odmjernu tikvicu od 25 ml (5.2.). Tikvica se nadopuni do oznake kloroformom (4.3.) i tresse. Mjeri se optička gustoća žute otopine prema kloroformu na 410 nm.
- 6.2.2. Čvrsti uzorci ili kreme
- 6.2.2.1. U tikvicu s okruglim dnom (4.1.) odvaži se 0,500 g uzorka. Doda se 30 ml benzena (4.2.) i 20 ml klorovodične kiseline (4.7.). Sadržaj tikvice vrije pod refluksom 30 minuta, uz miješanje.
- 6.2.2.2. Sadržaj tikvice se prenese u lijevak za odjeljivanje od 100 ml (5.5.). Ispere se s 5 ml 1 N HCl (4.7.). Vodena faza se prenese u tikvicu s okruglim dnom (5.1.) te se benzenska faza ispere s 5 ml klorovodične kiseline (4.7.).
- 6.2.2.3. U slučaju emulzija koje ometaju daljnju obradu, pomiješa se 0,500 g uzorka s 2 g Celita 545 (4.14.) da nastane tekući prašak. Smjesa se u malim obrocima prenese u staklenu kolonu za kromatografiju (5.12.).

Nakon svakog dodatka se kolona protrese, kako se uzorak ne bi sakupljao samo na vrhu. Čim je cijela smjesa prenesena u kolonu, eluira se klorovodičnom kiselinom (4.13.) tako da se u približno u 10 minuta dobije 10 ml eluata (ako je potrebno, elucija se može provoditi pod blagim tlakom dušika). Tijekom elucije mora se osigurati da iznad punila kolone bude uvijek nešto klorovodične kiseline. Prvih 10 ml eluata se dalje obrađuje kako je opisano u 6.2.2.4.

- 6.2.2.4. Sakupljena vodena faza (6.2.2.2.) ili eluat (6.2.2.3.) isparavaju se gotovo do suhoga u rotavaporu pod sniženim tlakom.
- 6.2.2.5. Ostatak se otopi u 6 ml otopine natrijeva hidroksida (4.9.). Doda se 20 ml Fehlingove otopine (4.16.) i sadržaj tikvice se prenese u lijevak za odjeljivanje od 50 ml (5.5.). Tikvica se ispere s 8 ml kloroforma (4.3.). Protresa se i faza kloroforma se filtrira u odmjernu tikvicu od 50 ml (5.2.).
- 6.2.2.6. Ekstrakcija se ponovi tri puta s 8 ml kloroforma (4.3.). Faze kloroforma se filtriraju i sakupe u tikvicu od 50 ml. Nadopuni se do oznake kloroformom (4.3.) i potresa. Mjeri se optička gustoća žute otopine prema kloroformu (4.3.) na 410 nm.

## 7. STANDARDNA KRIVULJA

U četiri tikvice s okruglim dnom od 100 ml (5.1.), od kojih svaka sadrži 3 ml 30 %-tnog vodenog etanola (4.20.), otpipetira se standardne otopine (4.15.1.) u obrocima od 5, 10, 15 i 20 ml, što odgovara 5, 10, 15 i 20 mg kinolin-8-ola. Postupak se nastavi kako je opisano u 6.2.1.

## 8. IZRAČUN

### 8.1. Tekući uzorci,

$$\text{Sadržaj kinolin-8-ola (u \% (m/m))} = \frac{a}{m} \times 100$$

gdje je:

a = miligrami kinolin-8-ola na standardnoj krivulji (7),

m = masa (u miligramima) dijela uzorka za testiranje (6.2.1.1.).

8.2. **Čvrsti uzorci ili kreme**

$$\text{Sadržaj kinolin-8-ola (u \% (m/m))} = \frac{2a}{m} \times 100$$

gdje je:

a = miligrami kinoli-8-ola na standardnoj krivulji (7),

m = masa (u miligramima) dijela uzorka za testiranje (6.2.2.1.).

9. **PONOVLJIVOST <sup>(1)</sup>**

Za sadržaj od oko 0,3 % kinolin-8-ola apsolutna vrijednost razlike u rezultatima između dva usporedna određivanja provedena na istom uzorku ne treba biti veća od 0,02 %.

**ODREĐIVANJE AMONIJAKA**1. **PODRUČJE PRIMJENE**

Ova metoda opisuje određivanje slobodnog amonijaka u kozmetičkim proizvodima.

2. **DEFINICIJA**

Sadržaj amonijaka u uzorku, određen u skladu s ovom metodom izražava se kao maseni udio amonijaka.

3. **NAČELO**

Otopina barijeva klorida doda se dijelu uzorka za testiranje kozmetičkog proizvoda, razrijeđenom u vodenom mediju metanola. Bilo koji talog koji može nastati odfiltrira se ili odcentrifugira. Tim se postupkom tijekom destilacije s vodenom parom izbjegne gubitak amonijaka iz određenih amonijevih soli kao što je karbonat ili hidrogenkarbonat ili spojeva masnih kiselina, s izuzetkom amonijeva acetata.

Amonijak se destilira vodenom parom iz filtrata ili otopine iznad taloga (supernatanta) i određuje se potencijometrijskom ili drugom titracijom.

4. **REAGENSI**

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

4.1. **Metanol.**4.2. **Otopina barijeva klorida dihidrata, 25 %-tna (m/v).**4.3. **Otopina ortoborne kiseline, 4 % (m/v).**4.4. **Standardna otopina sumporne kiseline 0,25 M.**4.5. **Tekućina protiv pjenjenja.**4.6. **Standardna otopina natrijeva hidroksida 0,5 M.**4.7. **Indikator, ako je potreban: pomiješa se 5 ml 0,1 %-tne (m/v) otopine metil crvenog u etanolu s 2 ml 0,1 %-tne (m/v) otopine metil plavog u vodi.**

<sup>(1)</sup> ISO 5725.

5. APARATURA
- 5.1. Uobičajena laboratorijska aparatura.
- 5.2. Centrifuga sa začepljenim bočicama od 100 ml.
- 5.3. Aparatura za destilaciju vodenom parom.
- 5.4. Potencijometar.
- 5.5. Indikatorska staklena elektroda i kalomelova referentna elektroda.
6. POSTUPAK
- 6.1. U odmjernu tikvicu od 100 ml odvažuje se masa uzorka (m) koja odgovara masi od najviše 150 mg amonijaka.
- 6.2. Doda se 10 ml vode, 10 ml metanola (4.1.) i 10 ml otopine barijeva klorida (4.2.). Nadopuni se do 100 ml metanolom (4.1.).
- 6.3. Promiješa se i ostavi preko noći u hladnjaku (5 °C).
- 6.4. Nakon toga se filtrira ili centrifugira još uvijek hladna otopina u zatvorenim kivetama 10 minuta, tako da se dobije čisti filtrat ili sloj otopine iznad taloga (supernatant).
- 6.5. Otpipetira se 40 ml te čiste otopine u aparaturu za destilaciju vodenom parom (5.3.) i ako je potrebno 0,5 ml tekućine protiv pjenjenja (4.5.).
- 6.6. Destilira se i sakupi 200 ml destilata u čašu od 250 ml, koja sadrži 10 ml standardne sumporne kiseline (4.4.) i 0,1 ml indikatora (4.7.).
- 6.7. Višak kiseline titrira se standardnom otopinom natrijeva hidroksida (4.6.).
- 6.8. *Napomena:* Za potenciometrijsku titraciju sakupi se 200 ml destilata u čašu od 250 ml koja sadrži 25 ml otopine ortoborne kiseline (4.3.) i titrira se standardnom sumpornom kiselinom (4.4.), te se zapisuje krivulja neutralizacije.
7. IZRAČUN
- 7.1. ***U slučaju titracije suviška kiseline***
- Neka je:
- $V_1$  = volumen (u mililitrima) utrošene otopine natrijeva hidroksida (4.6.),
- $M_1$  = njegov stvarni molaritet (4.6.)
- $M_2$  = stvarni faktor molariteta otopine sumporne kiseline (4.4.),
- m = masa (umiligramima) obroka uzetog za testiranje (6.1.),
- tada je:

$$\text{amonijak \% (m/m)} = \frac{(20 M_2 - V_1 M_1) \times 17 \times 100}{0,4 m} = \frac{(20 M_2 - V_1 M_1) \times 4\,250}{m}$$

7.2. **Račun u slučaju potenciometrijske titracije**

Neka je:

$V_2$  = volumen (u mililitrima) utrošene otopine sumporne kiseline (4.4.),

$M_2$  = njezin stvarni molaritet (4.4.),

$m$  = masa (u miligramima) dijela uzorka uzetog za testiranje,

tada je:

$$\text{amonijak \% (m/m)} = \frac{V_2 \times M_2 \times 17 \times 100}{0,4 m} = \frac{4\,250 V_2 \times M_2}{m}$$

8. PONOVLJIVOST <sup>(1)</sup>

Za sadržaj amonijaka od oko 6 % apsolutna vrijednost razlike u rezultatima između dva usporedna mjerenja provedena na istom uzorku ne treba biti veća od 0,6 %.

**IDENTIFIKACIJA I ODREĐIVANJE NITROMETANA**

## 1. PODRUČJE PRIMJENE

Ova metoda je pogodna za identifikaciju i određivanje nitrometana do oko 0,3 % u kozmetičkim proizvodima koji se nalaze u aerosolnim raspršivačima.

## 2. DEFINICIJA

Sadržaj nitrometana u uzorku, određen u skladu s ovom metodom izražen je kao maseni udio nitrometana u ukupnom sadržaju aerosolnog raspršivača.

## 3. NAČELO

Nitrometan se identificira reakcijom obojenja. Nitrometan se određuje plinskom kromatografijom nakon dodatka unutarnjeg standarda.

## 4. IDENTIFIKACIJA

4.1. **Reagensi**

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

## 4.1.1. Otopina natrijeva hidroksida 0,5 M

4.1.2. *Folin reagens*

Otopi se 0,1 g natrijeva 3,4,-dihidro-3,4-dioksonaftalen-1-sulfonata u vodi i razrijedi se na 100 ml.

4.2. **Postupak**

U 1 ml uzorka doda se 10 ml 4.1.1. i 1 ml 4.1.2. Ljubičasto obojenje ukazuje na prisutnost nitrometana.

## 5. ODREĐIVANJE

5.1. **Reagensi**

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

<sup>(1)</sup> ISO 5725.

- 5.1.1. Kloroform (unutarnji standard 1).
- 5.1.2. 2,4-dimetilheptan (unutarnji standard 2).
- 5.1.3. Etanol, 95 %-tni.
- 5.1.4. Nitrometan.
- 5.1.5. *Referentna otopina kloroforma.*  
U tariranu odmjernu tikvicu od 25 ml stavi se oko 650 mg kloroforma (5.1.1.). Točno se ponovo izvaže tikvica s uzorkom. Nadopuni se do 25 ml s 95 %-tnim etanolom (5.1.3.). Važe se i računa maseni udio kloroforma u toj otopini.
- 5.1.6. *Referentna otopina 2,4-dimetilheptana*  
Postupa se kao i za referentnu otopinu kloroforma, ali se u odmjernu tikvicu od 25 ml važe 270 mg 2,4-dimetilheptana (5.1.2.).
- 5.2. **Aparatura**
- 5.2.1. Plinski kromatograf s plameno-ionizacijskim detektorom.
- 5.2.2. Aparatura za uzorkovanje aerosola (prijenosna boca, spojnici za mikrošpricu itd.), kao što je opisano u Poglavlju II. Priloga Direktivi Komisije 80/1335/EEZ od 22. prosinca 1980. <sup>(1)</sup>.
- 5.2.3. Uobičajena laboratorijska aparatura.
- 5.3. **Postupak**
- 5.3.1. *Priprema uzorka*  
U tariranu prijenosnu bocu od 100 ml, očišćenu i evakuiranu u skladu s postupkom opisanim u 5.4. u poglavlju II. gore spomenute direktive, stavi se 5 ml jedne od unutarnjih standardnih otopina (5.1.5. ili 5.1.6.). Uporabi se staklena šprica od 10 ili 20 ml, bez igle, prilagođena prijenosnom dijelu tehnikom opisanom u stavku 5. poglavlja II. gore spomenute direktive Komisije. Ponovo se važe da se odredi unesena količina otopine. Primjenom iste tehnike, prenese se u istu bocu oko 50 g sadržaja uzorka iz aerosolnog raspršivača. Ponovno se važe da se odredi količina prenesenog uzorka. Dobro se promiješa.  
  
Pomoću mikrošprice (5.2.2.) pet puta se ubrizga oko 10 µl sadržaja iz boce.
- 5.3.2. *Priprema standarda*  
U odmjernu tikvicu od 50 ml točno se odvaže oko 500 mg nitrometana (5.1.4.) i 500 mg kloroforma (5.1.1.) ili 210 mg 2,4-dimetilpentana (5.1.2.). Nadopuni se 95 %-tnim etanolom (5.1.3.). Dobro se promiješa. Stavi se 5 ml te otopine u odmjernu tikvicu od 20 ml. Nadopuni se na puni volumen 95 %-tnim etanolom (5.1.3.).  
  
Pomoću mikrošprice (5.2.2.) pet puta se ubrizga oko 10 µl sadržaja iz tikvice.
- 5.3.3. *Uvjeti plinske kromatografije*
- 5.3.3.1. **K o l o n a**  
Sastoji se od dva dijela, prvi sadrži kao punilo didecil ftalat na Gas Chrom Q, drugi sadrži kao punilo Ucon

<sup>(1)</sup> SL L 383, 31.12.1980., str. 27.

50 HB 280X na Gas Chrom Q. Pripremljena spojena kolona mora postići razlučivanje „R” jednako ili bolje od 1,5, gdje je:

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

Neka je:

$r_1$  i  $r_2$  = retencijsko vrijeme (u minutama)

$W_1$  i  $W_2$  = širina vrha na polovini njegove visine (u milimetrima)

$d'$  = brzina dijagrama (papira) (u milimetrima po minuti).

Primjer kolone koja zadovoljava traženu razlučivanje:

Kolona A:

Materijal: nehrđajući čelik.

Duljina 1,5 m

Promjer: 3 mm.

Punilo: 20 %-tni didecil ftalat na Gas Chrom Q (umreženje 100 do 120 (mesh))

Kolona B:

Materijal: nehrđajući čelik.

Duljina 1,5 m.

Promjer: 3 mm.

Punilo: 20 %-tni Ucon 50 HB 280X na Gas Chrom Q (umreženje 100 do 120 (mesh)).

#### 5.3.3.2. Detektor

Pogodna podešena vrijednost osjetljivosti elektrometra plameno ionizacijskog detektora je  $8 \times 10^{-10}$  A.

#### 5.3.3.3. Temperaturni uvjeti

Kao pogodno određeno je sljedeće:

Injektor: 150 °C,

Detektor: 150 °C,

Kolona: između 50 i 80 °C što ovisi o koloni i aparaturi

#### 5.3.3.4. Pogodni uvjeti dobave plina:

Nosivi plin: dušik.

Tlak: 2,1 bar.

Protok: 40 ml/min.

Detektor: kako je propisao proizvođač detektora.

## 6. IZRAČUN

### 6.1. **Faktor odziva nitrometana, izračunat s obzirom na uporabljeni unutarnji standard**

Ako „n” predstavlja nitrometan:

Neka je:

$k_n$  = njegov faktor odziva,

$m'_n$  = njegova masa (u gramima) u smjesi,

$S'_n$  = površina njegova vrha.

Ako „c” predstavlja unutarnji standard, kloroform ili 2,4-dimetilheptan:

Neka je:

$m'_c$  = njegova masa (u gramima) u smjesi,

$S'_c$  = površina njegova vrha,

tada je:

$$k_r = \frac{m'_n}{m'_c} \times \frac{S'_c}{S'_n}$$

( $k_n$  je funkcija aparature).

### 6.2. **Koncentracija nitrometana u uzorku**

Ako „n” predstavlja nitrometan:

Neka je:

$k_n$  = njegov faktor odziva,

$S_n$  = površina njegova vrha.

Ako „c” predstavlja unutarnji standard, kloroform ili 2,4-dimetilheptan:

Neka je:

$m_c$  = njegova masa (u gramima) u smjesi,

$S_c$  = površina njegova vrha,

$M$  = masa (u gramima) prenesenog aerosola,

Tada je maseni udio (% (m/m)) nitrometana u uzorku:

$$\frac{m_c}{M} \times \frac{k_n \times S_n}{S_c} \times 100$$

#### 7. PONOVLJIVOST <sup>(1)</sup>

Za sadržaj nitrometana od oko 0,3 % (m/m) apsolutna vrijednost razlike u rezultatima između dva usporedna mjerenja provedena na istom uzorku ne treba biti veća od 0,03 % (m/m)

### IDENTIFIKACIJA I ODREĐIVANJE MERKAPTOOCTENE KISELINE U PROIZVODIMA ZA KOVRČANJE I RAVNANJE KOSE I PROIZVODIMA ZA DEPILACIJU

#### 1. PODRUČJE PRIMJENE

Ova metoda opisuje identifikaciju i određivanje merkaptooctene kiseline u proizvodima za kovrčanje i ravnanje kose i proizvodima za depilaciju kojima mogu biti prisutni drugi reducirani.

#### 2. DEFINICIJA

Sadržaj merkaptooctene kiseline u uzorku, određen u skladu s ovom metodom se izražava kao maseni udio merkaptooctene kiseline.

#### 3. NAČELO

Merkaptooctena kiselina se identificira pomoću testova obojenja i tankoslojnom kromatografijom i određuje se jodometrijski ili plinskom kromatografijom.

#### 4. IDENTIFIKACIJA

##### 4.1. **Identifikacija pomoću testova obojenja.**

##### 4.1.1. *Reagensi*

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

##### 4.1.1.1. Olovov diacetatni papir.

##### 4.1.1.2. Otopina klorovodične kiseline (jedan volumni dio koncentrirane klorovodične kiseline plus jedan volumni dio vode).

##### 4.1.2. *Postupak*

##### 4.1.2.1. Identifikacija merkaptooctene kiseline pomoću reakcije obojenja s olovovim diacetatom

Stavi se kap uzorka koji treba analizirati na olovov diacetatni papir (4.1.1.1.). Ako se pojavi intenzivno žuto obojenje, merkaptooctena kiselina je vjerojatno prisutna u uzorku.

Osjetljivost: 0,5 %.

##### 4.1.2.2. Karakterizacija anorganskih sulfida nastajanjem sumporovodika zakiseljavanjem

U epruvetu za testiranje stavi se nekoliko miligrama uzorka koji treba proučiti. Doda se 2 ml destilirane

<sup>(1)</sup> ISO 5725.

vode i 1 ml klorovodične kiseline (4.1.1.2.). Razvija se sumporovodik, prepoznatljiv po svojem mirisu, a na olovovu diacetatnom papiru (4.1.1.1.) nastaje crni talog olovova sulfida.

Osjetljivost: 50 ppm.

- 4.1.2.3. Karakterizacija sulfita nastajanjem sumporova dioksida zakiseljavanjem  
Postupa se kao u 4.1.2.2. Otopina se dovede do vrenja. Sumporov dioksid se prepoznaje po njegovu mirisu i svojem reducirajućem djelovanju, npr. na permanganat ione.

#### 4.2. **Identifikacija tankoslojnom kromatografijom**

##### 4.2.1. *Reagensi*

Svi reagensi, osim tamo gdje je drukčije određeno, trebaju biti analitičke čistoće (p.a.).

- 4.2.1.1. Merkaptooctena kiselina (tioglikolna kiselina), najmanje 98 %-tne čistoće, određeno jodometrijski.
- 4.2.1.2. 2,2'-ditiodioctena kiselina, najmanje 99 %-tne čistoće, određeno jodometrijski
- 4.2.1.3. 2-merkaptopropionska kiselina (tiolaktionska kiselina), najmanje 95 %-tne čistoće, određeno jodometrijski.
- 4.2.1.4. 3-merkaptopropionska kiselina, najmanje 98 %-tne čistoće, određeno jodometrijski.
- 4.2.1.5. 3-merkaptopropan-1,2-diol (1-tioglicerol), najmanje 98 %-tne čistoće, određeno jodometrijski.
- 4.2.1.6. Tankoslojne ploče, silika gel, već pripremljene, debljine 0,25 mm.
- 4.2.1.7. Tankoslojne ploče, aluminijev oksid, Merck F 254 E ili ekvivalent.
- 4.2.1.8. Klorovodična kiselina, koncentrirana,  $d_4^{20} = 1,19$  g/ml.
- 4.2.1.9. Etil acetat.
- 4.2.1.10. Kloroform.
- 4.2.1.11. Diizopropil eter.
- 4.2.1.12. Ugljikov tetraklorid.
- 4.2.1.13. Ledena octena kiselina.
- 4.2.1.14. Kalijev jodid, 1 %-tna (m/v) otopina u vodi.
- 4.2.1.15. Platinin tetraklorid, 0,1 %-tna (m/v) otopina u vodi.
- 4.2.1.16. *Eluirajuće otopine*
- 4.2.1.16.1. Etil acetat (4.2.1.9.), kloroform (4.2.1.10.), diizopropil eter (4.2.1.11.), octena kiselina (4.2.1.13.) (20:20:10:10, po volumenu).
- 4.2.1.16.2. Kloroform (4.2.1.10.), octena kiselina (4.2.1.13.) (90: 20, po volumenu).
- 4.2.1.17. *Reagensi za detekciju*
- 4.2.1.17.1. Pomiješaju se neposredno prije uporabe jednaki volumeni otopine (4.2.1.14.) i otopine (4.2.1.15.).
- 4.2.1.17.2. Otopina broma, 5 %-tna (m/v):  
Otopi se 5 g broma u 100 ml ugljikova tetraklorida (4.2.1.12.).
- 4.2.1.17.3. Otopina fluorescina, 0,1 %-tna (m/v):  
Otopi se 100 mg fluorescina u 100 ml etanola.
- 4.2.1.17.4. Heksaamonijev heptamolibdat, 10 %-tna (m/v) otopina u vodi.
- 4.2.1.18. *Referentne otopine*
- 4.2.1.18.1. Merkaptooctena kiselina (4.2.1.1.), 0,4 %-tna otopina u vodi.
- 4.2.1.18.2. 2,2'-ditiodi(octena) kiselina (4.2.1.2.), 0,4 %-tna (m/v) otopina u vodi.
- 4.2.1.18.3. 2-merkaptopropionska kiselina (4.2.1.3.), 0,4 %-tna otopina u vodi.
- 4.2.1.18.4. 3-merkaptopropionska kiselina (4.2.1.4.), 0,4 %-tna otopina u vodi.
- 4.2.1.18.5. 3-merkaptopropan-1,2-diol (4.2.1.5.), 0,4 %-tna otopina u vodi.



- 4.2.2. *Aparatura*  
Uobičajena aparatura za tankoslojnu kromatografiju.
- 4.2.3. *Postupak*
- 4.2.3.1. *Obrada uzoraka*  
Zakiseli se s nekoliko kapi klorovodične kiseline (4.2.1.8.) na pH 1 i filtrira, ako je potrebno.  
  
U nekim slučajevima savjetuje se uzorak razrijediti. U tom slučaju zakiseli se klorovodičnom kiselinom prije razrijeđenja.
- 4.2.3.2. *Elucija*  
Na ploču se stavi 1 μl otopine uzorka (4.2.3.1.) i jedna litra svake od pet referentnih otopina (4.2.1.18.). Pažljivo se suši u blagoj struji dušika i ploča eluira s otapalima (4.2.1.16.1. ili 4.2.1.16.2.). Ploča se suši što je brže moguće, kako bi se oksidacija tiola svela na najmanju mjeru.
- 4.2.3.3. *Detekcija*  
Poprska se ploča jednim od tri reagensa (4.2.1.17.1., 4.2.1.17.3. ili 4.2.1.17.4.). Poprska li se ploča reagensom (4.2.1.17.3.), treba se nadalje obraditi s parama broma (npr. u posudi koja sadrži malu čašu reagensa (4.2.1.17.2.)) sve dok mrlje ne postanu vidljive. Detekcija provedena prskanjem reagensom (4.2.1.17.4.) bit će zadovoljavajuća samo ako vrijeme sušenja za tanki sloj nije dulje od 30 minuta.
- 4.2.3.4. *Tumačenje*  
Usporede se R<sub>f</sub> vrijednosti i boje referentnih otopina s onima standardnih. Srednje vrijednosti dolje dobivenih R<sub>f</sub> vrijednosti kao grubi pokazatelj imaju samo usporedbenu vrijednost. One ovise o:  
  
— o stanju aktivacije tankog sloja za vrijeme kromatografiranja,  
  
— o temperaturi kromatografske posude.

**Primjeri R<sub>f</sub> vrijednosti dobivenih na sloju silika gela**

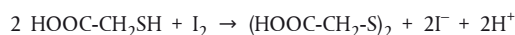
	Otapalo za eluciju	
	4.2.1.16.1.	4.2.1.16.2.
Merkaptooctena kiselina	0,25	0,80
2-merkaptopropionska kiselina	0,40	0,95
2,2'-ditiooctena kiselina	0,00	0,35
3-merkaptopropionska kiselina	0,45	0,95
3-merkaptopropan-1,2-diol	0,45	0,35

5. ODREĐIVANJE (vidjeti napomenu)  
Određivanje treba uvijek započeti jodometrijom.

5.1. **Jodometrija**

5.1.1. *Načelo*

Određivanje se provodi oksidacijom „-SH“ skupine jodom u kiselom mediju prema jednadžbi:



5.1.2. *Reagensi*

Jod, 0,05 M standardna otopina.

Napomena: Određivanje merkaptooctene kiseline mora se provesti na neuporabljenom proizvodu iz svježe otvorenog spremnika, kako bi se izbjegla oksidacija.

5.1.3. *Aparatura*  
Uobičajena laboratorijska oprema.

5.1.4. *Postupak*  
U Erlenmeyerovu tikvicu od 150 ml sa čepom, koja sadrži 50 ml destilirane vode, točno se odvažuje između 0,5 i 1 g uzorka. Doda se 5 ml klorovodične kiseline (4.1.1.2.) (pH otopine oko 0) i titrira otopinom joda (5.1.2.) do pojave žute boje. Ako je potrebno, uporabi se indikator (npr. škrobna otopina ili ugljikov tetraklorid).

5.1.5. *Izračun*  
Sadržaj merkaptocetene kiseline se računa prema formuli:

$$\% (m/m) = \frac{90 \times n \times 100}{1000 \times 10 \times m} = \frac{0,92n}{m},$$

gdje je:

m = masa (u gramima) dijela uzorka za testiranje,

n = volumen utrošene otopine joda (5.1.2.)

5.1.6. *Primjedbe*  
Ako je rezultat, izračunat kao merkaptocetena kiselina, 0,1 % ili još niži od najveće dozvoljene koncentracije, daljnja određivanja nemaju smisla. Ako je rezultat jednak ili veći od najveće dozvoljene koncentracije, a identifikacijom je utvrđeno prisustvo različitih reducensa, potrebno je određivanje dalje nastaviti plinskom kromatografijom.

## 5.2. **Plinska kromatografija**

5.2.1. *Načelo*  
Merkaptocetena kiselina se odvaja taloženjem otopinom kadmijeva diacetata. Nakon metilacije diazometanom, pripremljenim *in situ* ili prije u otopini dietil etera, metil derivat merkaptocetene kiseline se mjeri plinskom/tekućinskom kromatografijom, uz metil oktanoat kao unutarnji standard.

5.2.2. *Reagensi*  
Svi reagensi moraju biti analitičke čistoće (p.a.).

5.2.2.1. Merkaptocetena kiselina, 98 %-tna.

5.2.2.2. Klorovodična kiselina,  $d_4^{20} = 1,19$  g/ml.

5.2.2.3. Metanol.

5.2.2.4. 10 %-tna (m/v) vodena otopina kadmijeva diacetata dihidrata.

5.2.2.5. Metil oktanoat, 2 %-tna (m/v) otopina u metanolu.

5.2.2.6. Otopina acetatnog pufera (pH 5):

Natrijev acetat trihidrat, 77 g.

Octena kiselina (ledena), 27,5 g.

Demineralizirana voda, toliko da konačni volumen bude 1 litra.

5.2.2.7. Klorovodična kiselina, svježe pripremljena, 3 M otopina u metanolu (5.2.2.3.).

5.2.2.8. 1-metil-3-nitro-1-nitrozogvanadin.

5.2.2.9. Natrijev hidroksid, 5 M otopina.

5.2.2.10. Jod, 0,05 M standardna otopina.

- 5.2.2.11. Dietil eter.
- 5.2.2.12. Otopina diazometana pripravljena iz *N*-metil-*N*-nitrozotoluen-4-sulfonamida (Fieser, Reagensi za organske sinteze (Wiley), 1967.)  
Dobivena otopina sadrži oko 1,5 g diazometana u 100 ml dietil etera. Kako je diazometan otrovan i vrlo nestabilan plin, svi pokusi se moraju provesti u digestoru i bez staklene aparature s ubrušenim dijelovima (za tu namjenu postoji posebna oprema).
- 5.2.3. Aparatura
- 5.2.3.1. Uobičajena laboratorijska oprema.
- 5.2.3.2. Aparatura za pripremu diazometana za *in situ* metilaciju (vidjeti Fales, H.M., Jaouni, T.M. and Babashak, J.F., *Analyt. Chem.* 1973., 45, 2302).
- 5.2.3.3. Aparat za daljnju pripravu diazometana (Fieser).
- 5.2.4. Priprema uzorka  
U kivetu za centrifugiranje od 50 ml točno se odvaži dovoljna količina uzorka za koju se pretpostavlja da sadrži od 50 do 70 mg merkaptotene kiseline. Zakiseli se s nekoliko kapi klorovodične kiseline (5.2.2.2.) na pH oko 3.  
  
Doda se 5 ml demineralizirane vode i 10 ml otopine acetatnog pufera (5.2.2.6.).  
  
Provjeri se pH papirom je li pH vrijednost oko 5. Tada se doda 5 ml otopine kadmijeva diacetata (5.2.2.4.).  
  
Pričeka se 10 minuta i zatim centrifugira najmanje 15 minuta pri 4 000 g. Ukloni se bistra otopina iznad taloga (supernatant) koja može sadržavati netopljivu masnoću (u slučaju kremastog proizvoda). Ta se mast ne može pobrkati s tiolima koji se sakupljaju kao kompaktna masa na dnu kivete. U bistru otopinu iznad taloga (supernatant) doda se nekoliko kapi otopine kadmijeva diacetata (5.2.2.4.), kako bi se provjerilo da ne nastaje ikakav talog.  
  
Ako ranijom identifikacijom nisu otkriveni drugi reducensi nego samo tioli, provjeri se jodometrijom da količina tiola u bistroj otopini iznad taloga (supernatantu) nije veća od 6 do 8 % početne količine.  
  
U kivetu za centrifugiranje koja sadrži talog, doda se 10 ml metanola (5.2.2.3.) i talog se lagano dispergira staklenim štapićem. Ponovno se centrifugira najmanje 15 minuta pri 4 000 g. Odlje se bistra tekućina iznad taloga (supernatant) i provjeri da nema tiola.  
  
Talog se još jednom ispere jednakim postupkom.  
  
Rabeći istu kivetu za centrifugiranje, doda se:  
  
— 2 ml metil otopine oktaroata (5.2.2.5.),  
  
— 5 ml klorovodične kiseline u metanolu (5.2.2.7.).  
  
Potpuno se otope tioli (može zaostati nešto netopljive tvari). To je otopina „S”.  
  
U alikvotu te otopine provjeri se jodometrijski da je sadržaj tiola najmanje 90 % od onoga dobivenog u 5.1.
- 5.2.5. Metilacija
- Metilacija se provodi ili pripremom *in situ* (5.2.5.1.) ili prije pripremljenom otopinom diazometana (5.2.5.2.).
- 5.2.5.1. Metilacija *in situ*  
U aparaturu za metilaciju (5.2.3.2.) koja sadrži 1 ml etera (5.2.2.11.) doda se 50 µl otopine „S” i metilira se metodom (5.2.3.2.) s oko 300 mg 1-metil-3-nitro-1-nitrozogvanadina (5.2.2.8.). Nakon 15 minuta (otopina

etera trebala bi biti žuta da indicira suvišak diazometana) prenese se otopina uzorka u bočicu od 2 ml s nepropusnim čepom. Stavi se u hladnjak preko noći. Metiliraju se istodobno dva uzorka.

- 5.2.5.2. **Metilacija s prethodno pripremljenom otopinom diazometana**  
U tikvicu s čepom od 5 ml stavi se 1 ml otopine diazometana (5.2.2.12.) i zatim 50 µl otopine „S”. Ostavi se u hladnjaku preko noći.
- 5.2.6. **Priprema standarda**  
Pripremi se standardna otopina merkaptooctene kiseline (5.2.2.1.) poznate jakosti, koja sadrži 60 mg čiste merkaptooctene kiseline (5.2.2.1.) u 2 ml.  
To je otopina „E”.  
Taloži se, analizira i metilira kako je opisano u 5.2.4. i 5.2.5.
- 5.2.7. **Uvjeti plinske kromatografije**
- 5.2.7.1. **Kolona**  
Materijal: nehrđajući čelik.  
Duljina: 2 m.  
Promjer: 3 mm.
- 5.2.7.2. **Punilo**  
20 %-tni didecil ftalat/kromosorb, WAW umreženja 80 do 100 (mesh).
- 5.2.7.3. **Detektor**  
Plamena ionizacija. Pogodna podešenost osjetljivosti elektrometra plameno ionizacijskog detektora ja  $8 \times 10^{-10}$  A.
- 5.2.7.4. **Dobava plina**  
Nosivi plin: dušik.  
Tlak: 2,2 bara  
Protok: 35 ml/min.  
Pomoćni plin: vodik.  
Tlak: 1,8 bar,  
Protok: 15 ml/min.  
Detektor: Kako je propisao proizvođač detektora.
- 5.2.7.5. **Temperaturni uvjeti**  
Injektor: 200 °C  
Detektor: 200 °C  
Kolona: 90 °C
- 5.2.7.6. **Brzina zapisivanja na dijagram**  
5 mm/min
- 5.2.7.7. **Ubrizgana količina**  
3 µl. Provedu se pet ubrizgavanja.
- 5.2.7.8. **Uvjeti kromatografije su dani kao vodič. Oni dozvoljavaju postizanje razlučivanja „R” jednakog ili boljeg od 1,5, gdje je:**

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

Neka je:

$r_1$  i  $r_2$  = retencijska vremena (u minutama),

$W_1$  i  $W_2$  = širine vrhova na polovini njihove visine (u milimetrima),

$d'$  = brzina dijagrama (papira) (u milimetrima po minuti).

Preporuča se da se kromatografija završi podešavanjem temperature s 90 na 150 °C brzinom od 10 °C po minuti, kako bi se uklonile tvari koje smetaju sljedećim mjerenjima (interferenti).

- 5.2.8. **Račun**
- 5.2.8.1. **Koeficijent proporcionalnosti za merkaptooctenu kiselinu**  
Računa se s obzirom na metil oktanoat na temelju standardne smjese.

Ako „t” predstavlja merkaptocetenu kiselinu:

Neka je:

$k_t$  = njezin faktor odziva,

$m'_t$  = njezina masa (u miligramima) u smjesi,

$S'_t$  = površina njezinoga vrha.

Ako „c” predstavlja metil oktanoat:

Neka je:

$m'_c$  = njegova masa (u miligramima) u smjesi,

$S'_c$  = površina njegovoga vrha,

tada je:

$$k_t = \frac{m'_t}{m'_c} \times \frac{S'_c}{S'_t}$$

Taj koeficijent se mijenja ovisno o upotrebnoj aparaturi.

#### 5.2.8.2. Koncentracija merkaptocetene kiseline prisutne u uzorku

Ako „t” predstavlja merkaptocetenu kiselinu:

Neka je:

$k_t$  = njezin faktor odziva,

$S_t$  = površina njezinog vrha.

Ako „c” predstavlja metiloktanoat:

Neka je:

$m_c$  = njegova masa (u miligramima) u smjesi,

$S_c$  = površina njegova vrha,

$M$  = masa (u miligramima) početnog obroka za testiranje,

tada je % (m/m) merkaptocetene kiseline prisutne u uzorku:

$$\frac{m_c}{M} \times \frac{k_t \times S_t}{S_c} \times 100 .$$

## 6. PONOVLJIVOST <sup>(1)</sup>

Za sadržaj merkaptocetene kiseline od 8 % (m/m) apsolutna vrijednost razlike u rezultatima između dva usporedna mjerenja provedena na istom uzorku ne treba biti veća od 0,8 %.

### IDENTIFIKACIJA I ODREĐIVANJE HEKSAKLOROFENA

#### A. IDENTIFIKACIJA

##### 1. PODRUČJE PRIMJENE

Ta je metoda pogodna za sve kozmetičke proizvode.

##### 2. NAČELO

Heksaklorofen u uzorku se ekstrahira etil acetatom i identificira tankoslojnom kromatografijom.

##### 3. REAGENSI

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

##### 3.1. Sumporna kiselina, 4 M otopina.

##### 3.2. Celi AW.

##### 3.3. Etil acetat.

<sup>(1)</sup> ISO 5725.

- 3.4. Otapalo za eluciju: Benzen koji sadrži 1 % (v/v) ledene octene kiseline.
- 3.5. Tvar za predočenje (bojilo) I:  
  
Rodamin B otopina: otopi se 100 mg rodamina B u smjesi od 150 ml dietil etera, 70 ml apsolutnog etanola i 16 ml vode.
- 3.6. Tvar za predočenje (bojilo) II:  
  
Otopina 2,6-dibromo-4-(kloroimino)cikloheksa-2,5-dienona: otopi se 400 mg 2,6-dibromo-4-(kloroimino)cikloheksa-2,5-dienona u 100 ml metanola (priprema se svježe svaki dan).  
  
Otopina natrijeva karbonata: otopi se 10 g natrijeva karbonata u 100 ml demineralizirane vode.
- 3.7. Referentna otopina:  
  
Heksaklorofen, 0,05 %-tna (m/v) otopina u etil acetatu.
4. APARATURA
- 4.1. Kiesel gel 254 TLC ploče, 200 × 200 mm (ili ekvivalent).
- 4.2. Uobičajena TLC oprema.
- 4.3. Kupelj termostatirana na 26 °C, u koju je uronjena posuda za kromatografiranje.
5. PRIPREMA UZORKA ZA TESTIRANJE
- 5.1. Temeljito se promiješa 1 g homogeniziranog uzorka s 1 g Celita AW (3.2.) i 1 ml sumporne kiseline (3.1.).
- 5.2. Suši se na 100 °C dva sata.
- 5.3. Osušeni ostatak se ohladi i prevede u fini prašak.
- 5.4. Ekstrahira se s dva puta po 10 ml etil acetata (3.3.), nakon svake ekstrakcije centrifugira, slojevi s etil acetatom se spoje.
- 5.5. Isparava se na 60 °C.
- 5.6. Ostatak se otopi u 2 ml etil acetata (3.3.).
6. POSTUPAK
- 6.1. Na TLC ploču (4.1.) stavi se 2 µl otopine uzorka za testiranje (5.6.) i 2 µl referentne otopine (3.7.).
- 6.2. Posuda (4.3.) se zasiti otapalom za eluciju (3.4.).
- 6.3. TLC ploča se stavi u posudu i eluira do 150 mm.
- 6.4. TLC ploča se makne i suši u peći s prozračivanjem na temperaturi od oko 105 °C.
- 6.5. *Predočenje*  
  
Mrlje heksaklorofena na tankoslojnoj ploči predočuju se kako stoji pod 6.5.1. ili 6.5.2.

- 6.5.1 Ploča se jednoliko poprskava sredstvom za predočenje I (3.5.). Nakon 30 minuta ploča se ispita pod UV svjetlom na 254 nm.
- 6.5.2 Ploča se ravnomjerno poprskava otopinom 2,6-dibromo-4-(kloroimino)cikloheksa-2,5-dienona sredstva za predočenje II (3.6.). Nakon toga se ploča poprskava otopinom natrijeva karbonata (3.6.). Nakon 10 minuta sušenja na sobnoj temperaturi, ploča se ispita na dnevnom svjetlu.
7. TUMAČENJE
- 7.1. Sredstvo za predočenje I (3.5.):
- Heksaklorofen se prikaže kao plave mrlje na žutonarančastoj fluorescentnoj pozadini i ima  $R_f$  približno 0,5.
- 7.2. Sredstvo za predočenje II (3.6.):
- Heksaklorofen se prikaže kao nebesko plava do tirkizna mrlja na bijeloj pozadini i ima  $R_f$  približno 0,5.

## B. ODREĐIVANJE

1. PODRUČJE PRIMJENE
- Ta se metoda primjenjuje na sve kozmetičke proizvode.
2. DEFINICIJA
- Sadržaj heksaklorofena u uzorku, određen ovom metodom izražava se kao maseni udio heksaklorofena.
3. NAČELO
- Heksaklorofen se određuje, nakon prevođenja u metil derivate, plinskom kromatografijom s detektorom s hvatanjem elektrona (ECD).
4. REAGENSI
- Svi reagensi moraju biti analitičke čistoće (p.a.).
- 4.1. Etil acetat.
- 4.2. N-metil-Nnitrozo-p-toluensulfonamid (diazald).
- 4.3. Dietil eter.
- 4.4. Metanol.
- 4.5. 2-(2-etoksietoksi)etanol (karbitol).
- 4.6. Mravlja kiselina.
- 4.7. Kalijev hidroksid, 50 %-tna vodena otopina(m/m) (priprema se svaki dan svježa).

- 4.8. Heksan za spektroskopiju.
- 4.9. Bromoklorofen (standard br. 1).
- 4.10. 4,4',6,6'-tetrakloro-2,2'-tiodifenol (standard br. 2).
- 4.11. 2,4,4'-trikloro-2-hidroksi-difenil eter (standard br. 3).
- 4.12. Aceton.
- 4.13. 4 M sumporna kiselina.
- 4.14. Celi AW.
- 4.15. Mravlja kiselina/etil acetat, 10 %-tna (v/v) otopina.
- 4.16. Heksaklorofen.
5. APARATURA
- 5.1. Uobičajeno laboratorijsko stakleno posuđe.
- 5.2. Mini-aparatura za pripremu diazometana (Analyt. Chem., 1973., 45, 2302-2).
- 5.3. Plinski kromatograf opremljen 63 Ni izvorom elektrona za detektor za hvatanje elektrona (ECD).
6. POSTUPAK
- 6.1. **Priprema standardne otopine**
- Standard se odabere tako, da ne interferira niti s jednom pomoćnom tvari koja se nalazi u obroku proizvoda koji treba analizirati. Obično je najpogodniji standard br. 1 (4.9.).
- 6.1.1. U odmjernu tikvicu od 100 ml se točno odvaži oko 50 mg standarda br. 1,2 ili 3 (4.9., 4.10. ili 4.11.) i 50 mg heksaklorofena. Nadopuni se do oznake etil acetatom (4.1.) (otopina A). 10 ml otopine A razrijedi se na 100 ml etil acetatom (4.1.) (otopina B).
- 6.1.2. U odmjernu tikvicu od 100 ml točno se odvaži oko 50 mg standarda 1,2, ili 3 (4.9., 4.10. ili 4.11.) Nadopuni se do oznake etil acetatom (4.1.) (otopina C).
- 6.2. **Priprava uzorka** <sup>(1)</sup>
- Točno se odvaži 1 g homogeniziranog uzorka i temeljito se miješa s 1 ml sumporne kiseline (4.13.), 15 ml acetona (4.12.) i 8 g Celita AW (4.14.). Smjesa se suši 30 minuta na zraku na parnoj kupelji, a zatim se suši sat i pol u peći s prozračivanjem. Ohladi se, ostatak se usitni u fini prah i prenese u staklenu kolonu.

<sup>(1)</sup> Zbog velikog broja vrsta proizvoda koji mogu sadržavati heksaklorofen, važno je prije zapisivanja rezultata najprije provjeriti izdvajanje heksaklorofena iz uzorka tim postupkom. Ako su količine male, uz suglasnost zainteresiranih strana mogu se provesti modifikacije, kao npr. promjena otapala (benzen umjesto etilacetata) itd.



Eluira se etil acetatom (4.1.) i sakupi se 100 ml. Doda se 2 ml otopine unutarnjeg standarda (otopina C) (6.1.2.).

6.3. **Metiliranje uzorka**

Svi reagensi i aparatura se hlade na temperaturi između 0 i 4 °C dva sata. U vanjski odjeljak aparature za diazometan stavi se 1,2 ml otopine dobivene u 6.2. i 0,1 ml metanola (4.4.). U središnji spremnik stavi se oko 200 mg diazalda (4.2.), doda 1 ml karbitola (4.5.) i 1 ml dietil etera (4.3.) i otopi. Sastavi se aparatura, na pola se uroni u kupelj na 0 °C i u središnji spremnik se špricom unese oko 1 ml ohlađene otopine kalijeve hidroksida (4.7.). Osigura se da se žuta boja nastala nastajanjem diazometana ne izgubi. Ako se žuta boja izgubi, metilacija se ponovi s daljnjih 200 mg diazalda (4.2.) <sup>(1)</sup>.

Aparatura se makne iz kupelji nakon 15 minuta i ostavi zatvorena na temperaturi okoliša 12 sati. Aparatura se otvori, suvišak diazometana izreagira dodatkom nekoliko kapi 10 %-tne (v/v) otopine mravlje kiseline u etil acetatu (4.15.), te se organska otopina prenese u standardnu tikvicu od 25 ml. Nadopuni se do oznake heksanom (4.8.).

1,5 µl te otopine ubrizga se u kromatograf.

6.4. **Metilacija standarda**

Svi reagensi i aparatura hlade se na temperaturi između 0 i 4 °C dva sata. U vanjski odjeljak aparature za diazometan unese se:

0,2 ml otopine B (6.1.1.),

1 ml etil acetata (4.1.),

0,1 ml metanola (4.4.).

Nastavi se s metilacijom kako je opisano u 6.3. 1,5 µl dobivene otopine ubrizga se u kromatograf.

7. PLINSKA KROMATOGRAFIJA

Kolona mora postići razlučivanje „R” jednako ili bolje od 1,5, gdje je

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

Neka je:

$r_1$  i  $r_2$  = retencijska vremena (u minutama),

$W_1$  i  $W_2$  = širine vrhova na polovini njihove visine (u milimetrima),

$d'$  = brzina dijagrama (papira) (u milimetrima po minuti).

Pogodni su sljedeći kromatografski uvjeti:

Kolona: nehrđajući čelik.

Duljina 1,7 m.

Promjer: 3 mm.

Potporna:

kromosorb: WAW

analiza sita: umreženje 80 do 100 (mesh).

Stacionarna faza: 10 % OV 17.

Temperature:

kolona: 280 °C,

injektor: 280 °C,

detektor: 280 °C.

Nosivi plin: dušik bez kisika.

Tlak: 2,3 bara.

Protok: 30 ml/min.

<sup>(1)</sup> Žuta boja koja se ne gubi ukazuje na suvišak diazometana, koji je neophodan za potpunu metilaciju uzorka.

## 8. IZRAČUN

8.1. **Koeficijent proporcionalnosti heksaklorofena**

Računa se s obzirom na odabrani standard u odnosu na standardnu smjesu.

Neka je:

$h$  = heksaklorofen,

$k_h$  = njegov koeficijent proporcionalnosti,

$m'_h$  = njegova masa (u gramima) u smjesi,

$A'_h$  = površina njegovoga vrha,

$s$  = odabrani standard,

$m'_s$  = njegova masa (u gramima) u smjesi,

$A'_s$  = površina njegovoga vrha,

tada je:

$$k_h = \frac{m'_h}{m'_s} \times \frac{A'_s}{A'_h}$$

8.2. **Količina heksaklorofena u uzorku**

Neka je:

$h$  = heksaklorofen,

$k_h$  = njegov koeficijent proporcionalnosti,

$A_h$  = površina njegovoga vrha,

$s$  = odabrani standard,

$m_s$  = njegova masa (u gramima) u smjesi,

$A_s$  = površina njegovoga vrha,

$M$  = masa (u gramima) uzetog uzorka,

tada je % (m/m) heksaklorofena u uzorku:

$$\frac{m_s \times k_h \times A_h \times 100}{M \times A_s}$$

9. PONOVLJIVOST <sup>(1)</sup>

Za sadržaj heksaklorofena od 0,1 % (m/m) apsolutna vrijednost razlike u rezultatima između dva usporedna mjerenja provedena na istom uzorku ne treba biti veća od 0,005 % (m/m)

**KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE TOZILKLORAMID NATRIJA (INN) (KLORAMIN-T)**

## 1. PODRUČJE PRIMJENE

Ova metoda se odnosi na kvantitativno određivanje tozilkloramid natrija (kloramin-T) u kozmetičkim proizvodima, tankoslojnom kromatografijom.

<sup>(1)</sup> ISO 5725.

2. DEFINICIJA  
Sadržaj kloramina-T u uzorku, određen ovom metodom, izražava se kao maseni udio (m/m).
3. NAČELO  
Kloramin-T potpuno hidrolizira u 4-toluensulfonamid vrenjem s klorovodičnom kiselinom.  
Količina 4-toluensulfonamida koji nastane određuje se foto-denzitometrijski tankoslojnom kromatografijom.
4. REAGENSI  
Svi reagensi moraju biti analitičke čistoće (p.a.).
  - 4.1. Tozilkloramid natrij (kloramin-T).
  - 4.2. Standardna otopina 4-toluensulfonamida: 50 mg 4-toluensulfonamida u 100 ml etanola (4.5).
  - 4.3. Klorovodična kiselina 37 %-tna (m/m),  $d_4^{20} = 1,18$  g/ml.
  - 4.4. Dietil eter.
  - 4.5. Etanol, 96 %-tni (v/v).
  - 4.6. **Otapalo za razvijanje**
    - 4.6.1. 1-butanol/etanol (4.5.)/voda (40: 4: 9; v/v/v), ili
    - 4.6.2. Kloroform/aceton (6: 4; v/v).
  - 4.7. Već pripremljene ploče za tankoslojnu kromatografiju, silika gel 60, bez fluorescentnog indikatora.
  - 4.8. Kalijev permanganat.
  - 4.9. Klorovodična kiselina, 15 %-tna (m/m).
  - 4.10. Reagens za prskanje: 2-toluidin, 1 %-tna (m/v) otopina u etanolu (4.5).
5. APARATURA
  - 5.1. Normalna laboratorijska aparatura.
  - 5.2. Uobičajena oprema za tankoslojnu kromatografiju.
  - 5.3. Fotodenzitometar.

6. POSTUPAK
- 6.1. **Hidroliza**
- U tikvicu s okruglim dnom od 50 ml točno se odvažuje približno 1 g uzorka (m). Doda se 5 ml vode i 5 ml klorovodične kiseline (4.3.) i pusti da vrije jedan sat uz refluks. Vruća suspenzija se odmah prenese pomoću vode u građuiranu tikvicu od 50 ml. Pusti se da se ohladi i nadopuni do oznake vodom. Centrifugira se najmanje pri 3 000 okretaja u minuti pet minuta te se bistra tekućina iznad taloga (supernatant) filtrira.
- 6.2. **Ekstrakcija**
- 6.2.1. Uzme se 30 ml filtrata i ekstrahira se tri puta s 15 ml dietil etera (4.4.). Ako je potrebno, eterske faze se posuše i sakupe u građuiranu tikvicu od 50 ml. Nadopuni se dietil eterom (4.4.).
- 6.2.2. Uzme se 25 ml osušenog eterskog ekstrakta i uparava do suhoga u struji dušika. Ostatak se ponovno otopi u 1 ml etanola (4.5.).
- 6.3. **Tankoslojna kromatografija**
- 6.3.1. Na ploču za tankoslojnu kromatografiju (4.7.) kapne se 20 µl etanolnog ostatka (6.2.).
- Istodobno i na jednaki način nanese se 8, 12, 16 i 20 µl standardne otopine 4-toluensulfonamida (4.2.).
- 6.3.2. Nakon toga se razvija u otapalu za razvijanje (4.6.1. ili 4.6.2.) približno 150 mm.
- 6.3.3. Nakon potpunog isparavanja otapala za razvijanje, ploča se stavi dvije do tri minute u atmosferu klornih para, koje se razviju ulijevanjem oko 100 ml klorovodične kiseline (4.9.) na oko 2 g kalijeva permanganata (4.8.) u zatvorenoj posudi. Suvišak klora ukloni se s ploče zagrijavanjem na 100 °C pet minuta. Nakon toga ploča se popraska reagensom (4.10.).
- 6.4. **Mjerenje**
- Nakon približno jednog sata, mjere se ljubičaste mrlje pomoću foto-denzitometra na 525 nm.
- 6.5. **Crtanje kalibracijskih krivulja**
- Nacrtaju se najveće vrijednosti visine vrha dobivene za četiri mrlje 4-toluensulfonamida prema odgovarajućim količinama 4-toluensulfonamida (tj. 4, 6, 8, 10 µg 4-toluensulfonamida po mrlji).
7. NAPOMENA
- Metoda se može provjeriti uporabom 0,1 ili 0,2 %-tnim (m/v) kloraminom-T (4.1.), obrađenim na jednaki način kao i uzorak (6).
8. IZRAČUN
- Sadržaj kloramina-T u uzorku, izražen kao maseni udio, računa se kako slijedi;

$$\% \text{ (m/m) tosilcloramidã de sodiu} = \frac{1,33 \times a}{60 \times m}$$

gdje je:

$1,33$  = faktor konverzije za 4-4-toluensulfonamid – kloramin-T,

$a$  = količina (u  $\mu\text{g}$ ) 4-toluensulfonamida u uzorku, očitana iz kalibracijskih krivulja,

$m$  = masa (u gramima) uzetog uzorka.

9. PONOVLJIVOST <sup>(1)</sup>

Za sadržaj kloramina-T od oko 0,2 % (m/m) apsolutna vrijednost razlike u rezultatima između dva uspo- redna mjerenja provedena na istom uzorku ne treba biti veća od 0,03 % (m/m).

### ODREĐIVANJE UKUPNOG FLUORA U PASTAMA ZA ZUBE

1. PODRUČJE PRIMJENE

Ova je metoda osmišljena za određivanje ukupnog fluora u pastama za zube. Pogodna je za količine koje nisu veće od 0,25 %.

2. DEFINICIJA

Sadržaj fluora u uzorku, određen tom metodom izražava se kao maseni udio.

3. NAČELO

Određivanje se provodi plinskom kromatografijom. Fluor se iz spojeva koji ga sadrže prevodi u trietilfluorosilan (TEFS) izravnom reakcijom s klorotriethylsilanom (TECS) u kiseloj otopini i istodobno se ekstrahira ksilenom koji sadrži cikloheksan kao unutarnji standard.

4. REAGENSI

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

4.1. Natrijev fluorid, osušen na 120 °C do stalne odvage.

4.2. Voda, dva puta destilirana ili jednake kakvoće.

4.3. Klorovodična kiselina,  $d_4^{20} = 1,19$  g/ml.

4.4. Cikloheksan (CH).

4.5. Ksilen koji na kromatogramu nema vrhove prije vrha otapala, kada se kromatografira pod jednakim uvjetima kao i uzorak (6.1.) Ako je potrebno, pročisti se destilacijom (5.8.).

<sup>(1)</sup> ISO 5725.

- 4.6. Klorotrietilsilan (TECS Merck ili ekvivalent).
- 4.7. **Standardna otopina fluora**
- 4.7.1. Ishodišna otopina, 0,250 mg F/ml. Odvaži se točno 138,1 mg natrijeva fluorida (4.1.) i otopi u vodi (4.2.). Otopina se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 250 ml (5.5.) Razrijedi se do oznake vodom (4.2.) i promiješa.
- 4.7.2. Razrijeđena ishodišna otopina, 0,050 mg F/ml. Pipetom od 20 ml se prenese 20 ml ishodišne otopine (4.7.1.) u odmjernu tikvicu od 100 ml (5.5.). Razrijedi se do oznake vodom i promiješa.
- 4.8. **Otopina unutarnjeg standarda**
- Promiješa se 1 ml cikloheksana (4.4.) i 5 ml ksilena (4.5.).
- 4.9. **Klorotrietilsilan/otopina unutarnjeg standarda**
- U odmjernu tikvicu od 10 ml, pipetom (5.7.) se prenese 0,6 ml TECS (4.6.) i 0,12 ml otopine unutarnjeg standarda (4.8.). Razrijedi se do oznake ksilenom (4.5.) i promiješa. Priprema se svježe svaki dan.
- 4.10. Perklorna kiselina, 70 %-tna (m/v).
- 4.11. Perklorna kiselina, 20 %-tna (m/v) u vodi (4.2.).
5. APARATURA
- 5.1. Standardna laboratorijska oprema.
- 5.2. Plinski kromatograf s plameno-ionizirajućim detektorom.
- 5.3. Vortex miješalo ili ekvivalent.
- 5.4. Bühler, tresilica, tip SMB<sub>1</sub> ili ekvivalent.
- 5.5. Odmjerne tikvice, 100 i 250 ml, izrađene od polipropilena.
- 5.6. Staklene kivete za centrifugiranje; 20 ml s teflonskim kapicama na zavrtnj, Sovirel tip 611-56 ili ekvivalent. Kivete i kapice sa zavrtnjem se očiste višesatnim namakanjem u perklornoj kiselini (4.11.), zatim se pet puta uzastopno isperu vodom (4.2.) i konačno suše na 100 °C.
- 5.7. Pipete koje mogu pipetirati od 50 do 200 µl, s raspoloživim plastičnim vrhovima (koji se mogu mijenjati).
- 5.8. Aparatura za destilaciju, opremljena s trikugličnom Schneider kolonom ili ekvivalentnom Vigreux kolonom.

6. POSTUPAK
- 6.1. **Analiza uzorka**
- 6.1.1. Odabere se neotvorena tuba paste za zube, te se otvori. Cjelokupni sadržaj se prenese u plastični spremnik, temeljito promiješa i skladišti tako da se ne pokvari.
- 6.1.2. Odvaže se 150 mg (m) uzorka u kivetu za centrifugiranje (5.6.), doda se 5 ml vode (4.2.) i homogenizira (5.3.).
- 6.1.3. Doda se 1 ml ksilena (4.5.).
- 6.1.4. Doda se kap po kap 5 ml klorovodične kiseline (4.3.) i homogenizira (5.3.).
- 6.1.5. U kivetu za centrifugiranje (5.6.) doda se pipetom 0,5 ml klorotrietilsilana/otopine unutarnjeg standarda (4.9.)
- 6.1.6. Kiveta se zatvori kapicom sa zavrtanjem (5.6.) i temeljito miješa 45 minuta na tresilici (5.4.) podešenoj na 150 potresaja u minuti.
- 6.1.7. Centrifugira se 10 minuta takvom brzinom, da se dobije jasno odvajanje faza, otklopi se kiveta, izvuče se organski sloj i u kolonu plinskog kromatografa (5.2.) se ubrizga 3 µl organske faze.

*Napomena:*

Za eluciju svih komponenti potrebno je oko 20 minuta.

- 6.1.8. Ponovi se ubrizganje, izračuna se prosječna površina vrha (ATEFS/ACH) i iz kalibracijskog grafa (6.3.) se očita odgovarajuća količina fluora (u miligramima ( $m_1$ ))
- 6.1.9. Izračuna se sadržaj ukupnog fluora u uzorku (kao maseni udio fluora) kao što je prikazano u odjeljku 7.

6.2. **Kromatografski uvjeti**

- 6.2.1. Kolona: nehrđajući čelik.

Duljina: 1,8 m

Promjer: 3 mm.

Potporna: Gaschrom Q umreženje 80 do 100 (mesh).

Stacionarna faza: silikonsko ulje DC 200 ili ekvivalent, 20 %. Kolona se kondicionira preko noći na 100 °C (protok nosivog plina 25 ml dušika u minuti) i ponavlja se svake noći. Nakon svakog četvrtog ili petog ubrizgavanja kolona se rekondicionira grijanjem na 100 °C u trajanju od 30 minuta.

Temperature:

kolona: 70 °C,

injektor: 150 °C,

detektor: 250 °C.

Protok nosivog plina: 35 ml dušika u minuti.

6.3. **Kalibracijski graf**

- 6.3.1. Pipetom se stavi u niz od šest kiveta za centrifugiranje (5.6.), 0, 1, 2, 3, 4 i 5 ml razrijeđene standardne otopine fluorida (4.7.2.). U svakoj kiveti volumen se nadopuni vodom na 5 ml (4.2.).

- 6.3.2. Nastavi se kao je opisano pod 6.1.3.do, uključujući 6.1.6.
- 6.3.3. U kolonu plinskog kromatografa (5.2.) ubrizga se 3 µl organske faze.
- 6.3.4. Ubrižgavanje se ponovi i izračuna se prosječna vrijednost omjera vrhova (ATEFS/ACH).
- 6.3.5. Nacrta se kalibracijski graf koji pokazuje odnos mase fluora (u miligramima) u standardnim otopinama (6.3.1.) i omjera površine vrha (ATEFS/ACH) izmjerenog pod 6.3.4. Kroz točke se povuče najbolji pravac izračunat regresijskom analizom.

## 7. IZRAČUN

Koncentracija ukupnog sadržaja fluora u uzorku (kao maseni udio fluora) (% (m/m) F) je:

$$\% F = \frac{m_1}{m} \times 100 \%,$$

gdje je:

m = dio uzorka (u miligramima) (6.1.2.),

m<sub>1</sub> = količina F (u miligramima) odčitana iz kalibracijskog grafa (6.1.8.).

## 8. PONOVLJIVOST <sup>(1)</sup>

Za sadržaj fluora od oko 0,15 % (m/m) apsolutna vrijednost razlike u rezultatima između dva usporedna mjerenja provedena na istom uzorku ne treba biti veća od 0,012 % (m/m).

## IDENTIFIKACIJA I ODREĐIVANJE ORGANOŽIVINIH SPOJEVA

### PODRUČJE PRIMJENE

Dolje opisana metoda može se uporabiti za identifikaciju i određivanje organoživinih derivata koji se rabe kao konzervansi u kozmetičkim proizvodima za oči. Primjenjiva je na tiomerzal (INN) (natrijev 2-(etilmerkuriotio)benzoat) i fenilživu i njene soli.

## A. IDENTIFIKACIJA

### 1. NAČELO

Organoživini spojevi su kompleksirani s 1,5-difenil-3-tiokarbazonom. Nakon ekstrakcije ditizonata ugljikovim tetrakloridom, provede se silika gel tankoslojna kromatografija. Mrlje ditizonata pokazuju se kao narančasta boja.

### 2. REAGENSI

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

#### 2.1. Sumporna kiselina 25 %-tna (v/v).

<sup>(1)</sup> ISO 5725.



- 2.2. 1,5-difenil-3-tiokarbazon (ditizon): 0,8 mg u 100 ml ugljikova tetraklorida (2.4.).
- 2.3. Dušik.
- 2.4. Ugljikov tetraklorid.
- 2.5. Otopalo za razvijanje: heksan/acetone, 90: 10 (v/v).
- 2.6. Standardna otopina, 0,001 % u vodi:  
natrijeva 2-(etilmerkuriotio) benzoata,  
etilživinog klorida ili metilživinog klorida,  
fenilživin nitrat ili fenilživin acetat,  
živin diklorid ili živin diacetat.
- 2.7. Već pripravljene silika gel ploče (npr. Merck 5721 ili ekvivalent).
- 2.8. Natrijev klorid.
3. APARATURA
  - 3.1. Normalna laboratorijska oprema.
  - 3.2. Normalna TLC aparatura.
  - 3.3. Filtar za odvajanje faza.
4. POSTUPAK
  - 4.1. **Ekstrakcija**
    - 4.1.1. Razrijedi se 1 g uzorka u kiveti za centrifugiranje titracijom s 20 ml destilirane vode. Nakon što se postigne najbolja dispergiranost, zagrijava se na 60 °C u vodenoj kupelji. Doda se 4 g natrijeva klorida (2.8.). Protresa se. Pusti se ohladiti.
    - 4.1.2. Kako bi se veći dio čvrstog oblika odvojio od tekućine, centrifugira se najmanje 20 minuta pri 4 500 okretaja u minuti. Filtrira se u lijevak za odjeljivanje i doda 0,25 ml otopine sumporne kiseline (2.1.).
    - 4.1.3. Ekstrahira se nekoliko puta s 2 ili 3 ml otopine ditizona (2.2.), sve dok posljednja organska faza ne ostane zelena.
    - 4.1.4. Svaka organska faza se filtrira kroz filter za odvajanje faza (3.3.).
    - 4.1.5. Ispari se do suha u struji dušika (2.3.).
    - 4.1.6. Otopi se s 0,5 ml ugljikova tetraklorida (2.4.). Ta otopina se primijeni odmah kako je navedeno u 4.2.1.

4.2. **Separacija i identifikacija**

- 4.2.1. 50 µl otopine ugljikova tetraklorida, dobivene u 4.1.6. stavi se odmah na silika gel ploču (2.7.). Istodobno se 10 ml standardne otopine (2.6.) obradi kao u 4.1. te se 50 µl otopine dobivene u 4.1.6. stavi na istu ploču.
- 4.2.2. Ploča se stavi u otapalo (2.5.) i ostavi da fronta dosegne 150 mm. Organoživini spojevi se prikazuju kao obojene mrlje postojeće boje, pod uvjetom da je ploča pokrivena staklenom pločom odmah nakon što otapalo ispari.

Dobivene su, npr., sljedeće R<sub>f</sub> vrijednosti:

	R <sub>f</sub>	Boja
Tiomerzal	0,33	narančasta
Etilživin klorid	0,29	narančasta
Metilživin klorid	0,29	narančasta
Fenilživine soli	0,21	narančasta
Živine(II) soli	0,10	narančasta
Živin diacetat	0,10	narančasta
1,5,-difetil-3-tiokarbazon	0,09	ružičasta

**B. ODREĐIVANJE**

## 1. DEFINICIJA

Sadržaj organoživinih spojeva određen ovom metodom se izražava kao maseni udio (m/m) žive u uzorku.

## 2. NAČELO

Metoda se zasniva na mjerenju količine ukupne prisutne žive. Zbog toga je neophodno sa sigurnošću utvrditi da nema anorganske žive i da se identificiraju organoživini derivati koje uzorak sadrži. Nakon mineralizacije, oslobođena živa se mjeri bezplamenskom atomskom apsorpcijom.

## 3. REAGENSI

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

3.1. Koncentrirana dušična kiselina,  $d_4^{20} = 1,41$  g/ml.

3.2. Koncentrirana sumporna kiselina,  $d_4^{20} = 1,84$  g/ml.

3.3. Redestilirana voda.

3.4. Kalijev permanganat, 7 %-tna (m/v) otopina.

3.5. Hidroksilamonijev klorid, 1,5 %-tna (m/v) otopina.

3.6. Dikalijev peroksidisulfat, 5 %-tna (m/v) otopina.

- 3.7. Kositrov diklorid, 10 %-tna (m/v) otopina.
- 3.8. Koncentrirana klorovodična kiselina,  $d_4^{20} = 1,18$  g/ml.
- 3.9. S paladijevim dikloridom impregnirana staklena vuna, 1 % (m/m).
4. APARATURA
- 4.1. Normalna laboratorijska oprema.
- 4.2. Aparatura za bezplamenu atomsku apsorpciju za određivanje žive (tehnika hladnom parom). Duljina puta ćelije najmanje 100 mm.
5. POSTUPAK
- Podzmu se sve potrebne mjere opreza za analizu tragova žive.
- 5.1. **Razgradnja**
- 5.1.1. Odvaže se točno 150 mg uzorka (m). Doda se 10 ml dušične kiseline (3.1.) i pusti da se raščinja tri sata u nepropusno začepjenoj tikvici u vodenoj kupelji na 55 °C, uz protresanje u pravilnim razmacima. Istodobno se provede slijepa proba na reagensima.
- 5.1.2. Nakon hlađenja doda se 10 ml sumporne kiseline (3.2.) i vrati se u vodenu kupelj na 55 °C na 30 minuta.
- 5.1.3. Tikvica se stavi u ledenu kupelj i pažljivo se doda 20 ml vode (3.3.).
- 5.1.4. Doda se 2 ml alikvota 7 %-tne otopine kalijeva permanganata (3.4.), dok otopina ne zadrži boju. Vrati se u vodenu kupelj na 55 °C daljnjih 15 minuta.
- 5.1.5. Doda se 4 ml otopine dikalijeva peroksidisulfata (3.6.). Nastavlja se zagrijavati u vodenoj kupelji na 55 °C u trajanju od 30 minuta.
- 5.1.6. Pusti se da se ohladi te se sadržaj tikvice prenese u odmjernu tikvicu od 100 ml. Tikvica se ispere s 5 ml hidroksilamonijeva klorida (3.5.) i nakon toga se ispere četiri puta s 10 ml vode (3.3.). Otopina bi trebala biti potpuno bezbojna. Nadopuni se vodom (3.3.) do oznake.
- 5.2. **Određivanje**
- 5.2.1. Stavi se 10 ml otopine za testiranje (5.1.6.) u staklenu posudu za određivanje žive hladnom parom (4.2.). Razrijedi se sa 100 ml vode (3.3.), s 5 ml sumporne kiseline (3.2.) i s 5 ml otopine kositrova diklorida (3.7.). Nakon svakog dodatka se promiješa. Pričeka se 30 sekundi da se sva živa iz ionskog oblika reducirira u metalno stanje te se očita (n).
- 5.2.2. Stavi se nešto staklene vune impregnirane paladijevim dikloridom (3.9.) između posude za redukciju žive i protočne ćelije instrumenta (4.2.). Ponovi se 5.2.1. i zapiše očitavanje. Ako očitavanje nije jednako nuli, znači da mineralizacija nije potpuna i analiza se mora ponoviti.

## 6. IZRAČUN

Neka je:

$m$  = masa (u miligramima) uzorka za testiranje.

$n$  = količina žive (u  $\mu\text{g}$ ), očitana na instrumentu.

Maseni udio žive, izražene kao živa, računa se prema sljedećoj formuli:

$$\% \text{ mercur} = \frac{n}{m} .$$

## 7. NAPOMENE

- 7.1. Da se poboljša mineralizacija, može biti neophodno započeti određivanje razrijeđenjem uzorka.
- 7.2. Ako se sumnja da se živa apsorbira na supstrat, treba provesti kvantitativno određivanje metodom standardnog dodatka.

8. PONOVLJIVOST <sup>(1)</sup>

Ako su koncentracije žive 0,007 %, apsolutna vrijednost razlike u rezultatima između dva usporedna mjerenja provedena na istom uzorku ne treba biti veća od 0,00035 %.

**ODREĐIVANJE ALKALIJSKIH I ZEMNOALKALIJSKIH SULFIDA**

## 1. PODRUČJE PRIMJENE

Ova metoda opisuje određivanje sulfida prisutnih u kozmetičkim proizvodima. Prisutnost tiola ili drugih reducensa (uključujući sulfite) ne smeta.

## 2. DEFINICIJA

Koncentracija sulfida, određena ovom metodom izražava se kao maseni udio sumpora.

## 3. NAČELO

Nakon zakiseljavanja medija, sumporovodik se uvodi strujom dušika i fiksira u obliku kadmijeva sulfida. Kadmijev sulfid se filtrira i ispere te zatim određuje jodometrijski.

## 4. REAGENSI

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

<sup>(1)</sup> ISO 5725.

- 4.1. Koncentrirana klorovodična kiselina,  $d_4^{20} = 1,19$  g/ml.
- 4.2. Natrijev tiosulfat, 0,1 M standardna otopina.
- 4.3. Jod, 0,05 M standardna otopina.
- 4.4. Dinatrijev sulfid.
- 4.5. Kadmijev diacetat.
- 4.6. Koncentrirani amonijak,  $d_4^{20} = 0,90$  g/ml.
- 4.7. Amonijakalna otopina kadmijeva diacetata: u približno 50 ml vode se otopi 10 g kadmijeva diacetata (4.5.). Doda se amonijak (4.6.) dok se talog ne otopi (približno 20 ml). Do oznake od 100 ml nadopuni se vodom.
- 4.8. Dušik.
- 4.9. Otopina amonijaka M.
5. APARATURA
- 5.1. Uobičajena laboratorijska oprema.
- 5.2. Tikvica okruglog dna od 100 ml s tri standardna vrata od ubrušenog stakla.
- 5.3. Dvije Erlenmeyer tikvice s vratovima od ubrušenog stakla, opremljene napravom koja sadrži potopljenu cjevčicu i postranu izlaznu cjevčicu za ispuštanje plina koji se uvodi.
- 5.4. Lijevak s dugim vratom.
6. POSTUPAK
- 6.1. **Pretvorba sulfida**
- 6.1.1. Uzme se još neotvoren uzorak. U tikvicu s okruglim dnom (5.2.) točno se odvaži masa (m) (izražena u gramima) proizvoda, koja sadrži najviše 30 mg sulfidnih iona. Doda se 60 ml vode i dvije kapi sredstva protiv pjenjenja.
- 6.1.2. U svaku od dvije Erlenmeyerove tikvice (5.3.) prenese se 50 ml otopine (4.7.)
- 6.1.3. Lijevak za dokapavanje, potopljena cjevčica i izlazna cjevčica spoje se na tikvicu s okruglim dnom (5.2.). Izlazna cjevčica spoji se na Erlenmeyerove tikvice (5.3.), međusobno povezane PVC cjevčicom.

*Napomena:* Aparatura za pretvorbu mora proći sljedeći test na nepropusnost: simulirajući uvjete testiranja, zamijeni se uzorak koji treba odrediti s 10 ml sulfidne otopine (pripremljene iz 4.4.) koja sadrži „X mg” sulfida (određenih jodometrijski). Neka je „Y” broj miligrama sulfida određen na kraju tog postupka. Razlika između količine „X” i količine „Y” ne smije biti veća od 3 %.

- 6.1.4. Kako bi se iz tikvice s okruglim dnom (5.2.) istjerao zrak, propuhuje se kroz tikvicu 15 minuta dušik (4.8.) brzinom od dva mjehurića u sekundi.
- 6.1.5. Tikvica s okruglim dnom zagrije se na  $85 \pm 5$  °C.
- 6.1.6. Prekine se struja dušika (4.8.) i doda se kap po kap 40 ml klorovodične kiseline (4.1.).
- 6.1.7. Kada je gotovo sva kiselina dodana, ponovno se uključi dovod dušika (4.8.) i na vratu se ostavi minimalna količina tekućine da se spriječi izlaženje sumporovodika.
- 6.1.8. Grijanje se prekine nakon 30 minuta. Pusti se da se tikvica (5.2.) ohladi i nastavi se propuhivanje dušika (4.8.) kroz tikvicu još najmanje sat i pol.

## 6.2. **Titracija**

- 6.2.1. Kadmijev sulfid se filtrira kroz lijevak s dugim vratom (5.4.).
- 6.2.2. Erlenmeyerove tikvice (5.3.) se najprije isperu otopinom amonijaka (4.9.) koji se izlijeva na filter. Nakon toga se ispire destiliranom vodom koja se uporabi za ispiranje taloga koji je zaostao na filteru.
- 6.2.3. Pranje taloga završi se sa 100 ml vode.
- 6.2.4. Filtrirni papir se stavi u prvu Erlenmeyerovu tikvicu koja je sadržavala talog. Doda se 25 ml ( $n_1$ ) otopine joda (4.3.), približno 20 ml klorovodične kiseline (4.1.) i 50 ml destilirane vode.
- 6.2.5. Suvišak joda odredi se otopinom natrijeva tiosulfata ( $n_2$ ) (4.2.).

## 7. IZRAČUN

Sadržaj sulfida u uzorku, izražen kao maseni udio sumpora, računa se prema sljedećoj formuli:

$$\% \text{ sumpora} = \frac{32(n_1 x_1 - n_2 x_2)}{20 m},$$

gdje je:

$n_1$  = volumen utrošene (u mililitrima) standardne otopine joda (4.3.),

$x_1$  = molaritet te otopine,

$n_2$  = volumen (u mililitrima) standardne otopine natrijeva tiosulfata (4.2.),

$x_2$  = molaritet te otopine,

$m$  = masa (u gramima) uzorka za testiranje.

## 8. PONOVLJIVOST <sup>(1)</sup>

Za sadržaj sulfida od oko 2 % (m/m), apsolutna vrijednost razlike u rezultatima između dva usporedna mjerenja provedena na istom uzorku ne treba biti veća od 0,2 % (m/m).

<sup>(1)</sup> ISO 5725.