

31985L0490

L 295/30

SLUŽBENI LIST EUROPSKIH ZAJEDNICA

7.11.1985.

**ČETVRTA DIREKTIVA KOMISIJE****od 11. listopada 1985.****o usklađivanju zakonodavstava država članica u odnosu na metode analize potrebne za provjeru sastava kozmetičkih proizvoda**

(85/490/EEZ)

KOMISIJA EUROPSKIH ZAJEDNICA,

uzimajući u obzir Ugovor o osnivanju Europske ekonomske zajednice,

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 85/391/EEZ <sup>(2)</sup>, a posebno njezin članak 8. stavak 1.,

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,

budući da sve potrebne metode analize moraju biti ustanovljene što je moguće prije; budući da su u svrhu postizanja toga cilja već poduzeta tri koraka definiranjem određenih metoda u Direktivi Komisije 80/1335/EEZ <sup>(3)</sup>, 82/434/EEZ <sup>(4)</sup> i 83/514/EEZ <sup>(5)</sup>, četvrti korak se sastoji od definiranja metoda za identifikaciju i određivanje glicerol 1-(4-aminobenzoata), određivanje klorobutanola, identifikaciju i određivanje kinina, identifikaciju i određivanje anorganskih sulfita i hidrogensulfita, identifikaciju i određivanje klorata alkalijskih metala i identifikaciju i određivanje natrijeva jodata,

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

DONIJELA JE OVU DIREKTIVU:

*Članak 1.*

Države članice poduzimaju sve potrebne mjere kako bi osigurale da se tijekom službenog testiranja kozmetičkih proizvoda:

- identifikacija i određivanje glicerol 1-(4-aminobenzoata),
  - određivanje klorobutanola,
  - identifikacija i određivanje kinina,
  - identifikacija i određivanje anorganskih sulfita i hidrogensulfita,
  - identifikacija i određivanje klorata alkalijskih metala, i
  - identifikacija i određivanje natrijeva jodata
- provode u skladu s metodama opisanim u Prilogu.

*Članak 2.*

Države članice donose zakone i druge propise potrebne za usklađivanje s ovom Direktivom najkasnije do 31. prosinca 1986.

One o tome odmah obavješćuju Komisiju.

*Članak 3.*

Ova je Direktiva upućena državama članicama.

Sastavljeno u Bruxellesu 11. listopada 1985.

Za Komisiju  
Stanley CLINTON-DAVIS  
Član Komisije

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

<sup>(2)</sup> SL L 224, 22.8.1985., str. 40.

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

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

<sup>(5)</sup> SL L 291, 24.10.1983., str. 9.

## PRILOG

## IDENTIFIKACIJA I ODREĐIVANJE GLICEROL 1-(4-AMINOBEZOATA)

## A. IDENTIFIKACIJA

1. CILJ I PODRUČJE PRIMJENE  
Ovom metodom se otkriva alfa-monogliceril 4-aminobenzoat glicerol 1-(4-aminobenzoat). Otkriva se također etil 4-aminobenzoat (benzokain INN), koji može biti prisutan kao nečistoća.
2. NAČELO  
Identifikacija se provodi tankoslojnom kromatografijom na silika gelu s fluorescentnim indikatorom i otkrivanjem slobodne primarne aminoskupine jer na ploči nastaje diazo boja.
3. REAGENSI  
Svi reagensi moraju biti analitičke čistoće (p.a.).
  - 3.1. Smjesa otapala: cikloheksan/propan-2-ol/stabilizirani diklorometan 48/64/9 (v/v/v).
  - 3.2. Otapalo za razvijanje: petrolej eter (40-60)/benzen/acetan/otopina amonijeva hidroksida (najmanje 25 %-tni  $\text{NH}_3$ ): 35/35/35/1 (v/v/v/v).
  - 3.3. Otopina za razvijanje: (a) natrijev nitrit: 1 g u 100 mL 1 M klorovodične kiseline (pripremljeno neposredno prije uporabe);  
(b) 2-naftol: 0,2 g u 100 mL 1 M kalijeva hidroksida.
  - 3.4. Standardne otopine:  
alfa-monogliceril 4-aminobenzoat: 0,05 g u 100 mL miješanog otapala 3.1.;  
etil 4-aminobenzoat: 0,05 g u 100 mL miješanog otapala 3.1.
  - 3.5. Silika gel 60 F254, ploče debljine 0,25 mm, 200 × 200 mm.
4. APARATURA
  - 4.1. Normalna aparatura za tankoslojnu kromatografiju.
  - 4.2. Ultrazvučni vibrator.
  - 4.3. Millipor filtar 0,5  $\mu\text{m}$  ili ekvivalent.
5. POSTUPAK
  - 5.1. **Priprema uzorka**  
U graduiranu tikvicu od 10 mL sa čepom, odvaži se 1,5 g proizvoda koji treba analizirati. Nadopuni se do oznake otapalom 3.1. Začepi se i ostavi jedan sat na sobnoj temperaturi u ultrazvučnom vibratoru (4.2.). Filtrira se kroz Millipor filtar (4.3.) te se filtrat uporabi za kromatografiju.
  - 5.2. **Tankoslojna kromatografija**  
Na ploču (3.5.) se stavi 10  $\mu\text{L}$  otopine uzorka (5.1.) i svake od standardnih otopina (3.4.).  
Kromatogram se razvija do visine 150 mm u posudi prethodno zasićenoj otapalom 3.2. Pusti se da se ploča osuši na temperaturi okoliša.
  - 5.3. **Razvijanje**
    - 5.3.1. Ploča se promatra pod UV svjetlom 254 nm.
    - 5.3.2. Potpuno osušena ploča se popraska otopinom 3.3. (a).  
Pusti se da se suši 1 minutu na sobnoj temperaturi i odmah se popraska otopinom 3.3. (b).  
Ploča se suši u peći na 60 °C. Pojave se mrlje narančaste boje. Alfa-monogliceril 4-aminobenzoat:  $R_F$  0,07; etil 4-aminobenzoat:  $R_F$  0,55.

## B. ODREĐIVANJE

## 1. CILJ I PODRUČJE PRIMJENE

Ova metoda određuje alfa monogliceril 4-aminobenzoat. Također određuje i etil 4-aminobenzoat. Ne može odrediti više od 5 % (m/m) alfa monogliceril 4-aminobenzoata i 1 % (m/m) etil 4-aminobenzoata.

## 2. DEFINICIJA

Sadržaj alfa monogliceril 4-aminobenzoata i etil 4-aminobenzoata mjeren ovom metodom izražava se kao maseni udio (% m/m) u proizvodu.

## 3. NAČELO

Proizvod koji se treba analizirati pripremi se u obliku suspenzije u metanolu i nakon odgovarajuće obrade uzorka određuje se tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC).

## 4. REAGENSI

Svi reagensi moraju biti analitičke čistoće (p.a.) i prikladni za HPLC kada je primjerena.

## 4.1. Metanol.

4.2. Kalijev dihidrogenfosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ).4.3. Cinkov diacetat ( $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ).4.4. Octena kiselina ( $d_{4}^{20} = 1,05$ ).4.5. Tetrakalijev heksacianoferrat ( $\text{K}_4(\text{Fe}(\text{CN})_6) \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ).

## 4.6. Etil 4-hidroksibenzoat.

## 4.7. Alfa monogliceril 4-aminobenzoat.

## 4.8. Etil 4-aminobenzoat.

## 4.9. Otopina fosfatnog pufera (0,02 M): otopi se 2,72 g kalijeva dihidrogenfosfata (4.2.) u jednoj litri vode.

## 4.10. Eluent: otopina fosfatnog pufera (4.9.)/metanol (4.1.) 61/39 (v/v).

Sastav mobilne faze se može mijenjati tako da se postigne faktor razlučivanja  $R \geq 1,5$ .

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

gdje je:

$R_1$  i  $R_2$  = retencijsko vrijeme vrhova u minutama,

$W_1$  i  $W_2$  = širina vrhova na polovini njihove visine, u milimetrima,

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

## 4.11. Ishodišna otopina alfa-monogliceril 4-aminobenzoata: odvaži se točno oko 40 mg alfa-monogliceril 4-aminobenzoata i unese u graduiranu tikvicu od 100 mL. Otopi se u 40 mL metanola (4.1.). Nadopuni se do oznake puferskom otopinom (4.9.) i promiješa.

## 4.12. Ishodišna otopina etil 4-aminobenzoata: odvaži se točno oko 40 mg etil 4-aminobenzoata i unese u graduiranu tikvicu od 100 mL. Otopi se u 40 mL metanola (4.1.), nadopuni se do oznake puferskom otopinom (4.9.) i promiješa.

## 4.13. Unutarnja standardna otopina: odvaži se točno oko 50 mg etil 4-hidroksibenzoata (4.6.), prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL, otopi u 40 mL metanola (4.1.), nadopuni do oznake puferskom otopinom (4.9.) i promiješa.

## 4.14. Standardne otopine: pripremi se četiri standardne otopine otapanjem u 100 mL eluenta (4.10.) prema sljedećoj tablici:

| Standardna otopina | Alfa-monogliceril 4-aminobenzoat |            | Etil 4-aminobenzoat             |            | Etil 4-hidroksibenzoat          |            |
|--------------------|----------------------------------|------------|---------------------------------|------------|---------------------------------|------------|
|                    | ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (*)  | mL (4.11.) | ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (*) | mL (4.12.) | ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (*) | mL (4.13.) |
| I                  | 8                                | 2          | 8                               | 2          | 50                              | 10         |
| II                 | 16                               | 4          | 12                              | 3          | 50                              | 10         |
| III                | 24                               | 6          | 16                              | 4          | 50                              | 10         |
| IV                 | 40                               | 10         | 20                              | 5          | 50                              | 10         |

(\*) Ove vrijednosti su navedene kao pokazatelj i odgovaraju točnim masama 4.11., 4.12. i 4.13.

*Napomena:* Otopine mogu biti pripremljene na drugačiji način.

- 4.15. Otopina Carrez I: u vodi se otopi 26,5 g tetrakalijeva heksacianoferata (4.5.) i nadopuni na 250 mL.
- 4.16. Otopina Carrez II: u vodi se otopi 54,9 g cinkova diacetata (4.3.) i 7,5 mL octene kiseline (4.4.) te nadopuni na 250 mL.
- 4.17. Merck Lichrosorb RP-18 ili ekvivalent, prosječnom veličinom čestica od 5 $\mu$ m.
5. APARATURA
- 5.1. Uobičajena laboratorijska oprema.
- 5.2. Oprema za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti s UV detektorom promjenjivih valnih duljina i termostatiranom komorom podešenom na 45 °C.
- 5.3. Kolona od nehrđajućeg čelika: duljina 250 mm; unutarnji promjer:4,6 mm; punilo: Lichrosorb RP-18 (4.17.)
- 5.4. Ultrazvučna kupelj.
6. POSTUPAK
- 6.1. **Priprema uzorka**
- 6.1.1. U čašu od 100 mL točno se odvaži oko 1 g uzorka i doda se 10 mL metanola (4.1.).
- 6.1.2. Čaša se stavi na 20 minuta u ultrazvučnu kupelj (5.4.) da nastane suspenzija. Tako dobivena suspenzija prenese se kvantitativno u odmjernu tikvicu od 100 mL s najviše 75 mL eluenta (4.10.).
- Redom se doda 1 mL otopine Carrez I (4.15.) i 1 mL otopine Carrez II (4.16.) i nakon svakog dodatka miješa. Dopuni se do oznake eluentom (4.10.), ponovno promiješa i filtrira kroz naborani filtrirni papir.
- 6.1.3. U odmjernu tikvicu od 50 mL pipetom se prenese 30 mL filtrata dobivenog u 6.1.2. i 5 mL otopine unutarnjeg standarda (4.13.). Nadopuni se do oznake eluentom (4.10.) i promiješa. Tako dobivena otopina se uporabi za kromatografsku analizu, opisanu u 6.2.
- 6.2. **Kromatografija**
- 6.2.1. Brzina protoka mobilne faze (4.10.) podesi se na 1,2 mL/min, a temperatura kolone na 45 °C.
- 6.2.2. Detektor (5.2.) se namjesti na 274 nm.
- 6.2.3. U kromatograf se mikrošpicom ubrizga najmanje dva puta 20  $\mu$ L otopine (6.1.3.) i mjere se površine vrhova.
- 6.3. **Kalibracijska krivulja**
- 6.3.1. Ubrizga se 20  $\mu$ L svake od standardnih otopina (4.14.) i mjeri se površina vrha.
- 6.3.2. Za svaku koncentraciju se računa omjer između površina vrhova alfa-monogliceril 4-aminobenzoata i površina vrhova unutarnjeg standarda. Taj se omjer nanese kao apscisa, a kao ordinata se nanese odgovarajuće mase.
- 6.3.3. Na jednaki način postupak se nastavi za etil 4-hidroksibenzoat.
7. RAČUN
- 7.1. Iz kalibracijske krivulje dobivene u 6.3. očitaju se maseni omjeri (RP<sub>1</sub>, RP<sub>2</sub>) koji odgovaraju omjerima između površina vrhova izračunatih u 6.2.3., gdje je:

$$RP_1 = \text{masa alfa-monogliceril 4-aminobenzoata/masa etil 4-hidroksibenzoata,}$$

$$RP_2 = \text{masa etil 4-aminobenzoata/masa etil 4-hidroksibenzoata.}$$

- 7.2. Iz tako dobivenih masenih omjera računa se sadržaj alfa-monogliceril 4-aminobenzoata i etil 4-aminobenzoata kao maseni udio (% m/m) pomoću formule:

$$R_p \text{ \% (m/m) alfa-monogliceril 4-aminobenzoata} = RP1 \times \frac{q}{6p}$$

$$R_p \text{ \% (m/m) etil 4-aminobenzoata} = RP2 \times \frac{q}{6p}$$

q = količina etil 4-hidroksibenzoata (unutarnji standard), odvagana, u miligramima, u 4.12.,

p = količina uzorka, odvagana u gramima u 6.1.1.

8. PONOVLJIVOST <sup>(1)</sup>
- 8.1. Za sadržaj od 5 % (m/m) alfa-monogliceril 4-aminobenzoata, razlika u rezultatima između dva usporedna određivanja provedena na istom uzorku ne treba biti veća od 0,25 %.
- 8.2. Za sadržaj od 1 % (m/m) etil 4-aminobenzoata, razlika u rezultatima između dva usporedna određivanja provedena na istom uzorku ne treba biti veća od 0,10 %.
9. NAPOMENE
- 9.1. Prije provođenja analize potrebno je provjeriti je li uzorak sadrži tvari koje bi se mogle preklapati s vrhom unutarnjeg standarda (etil 4-aminobenzoata) na kromatogramu.
- 9.2. Kako bi se provjerilo da nema nikakve interferencije, ponovi se određivanje mijenjanjem omjera metanola u mobilnoj fazi za relativno 10 %.

#### ODREĐIVANJE KLOROBUTANOLA

1. CILJ I PODRUČJE PRIMJENE
- Ova metoda je pogodna za određivanje klorobutanola (INN) do najveće koncentracije od 0,5 % (m/m) u bilo kojem kozmetičkom proizvodu, osim aerosolova.
2. DEFINICIJA
- Sadržaj klorobutanola, mjereno ovom metodom izražava se kao maseni udio (% m/m) u proizvodu.
3. NAČELO
- Nakon odgovarajuće obrade proizvoda koji se treba analizirati, određivanje se provodi plinskom kromatografijom uz 2,2,2-trikloroetanol kao unutarnji standard.
4. REAGENSI
- Svi reagensi trebaju biti analitičke čistoće (p.a.).
- 4.1. Klorobutanol (1,1,1-trikloro-2-metilpropan-2-ol).
- 4.2. 2,2,2-trikloroetanol.
- 4.3. Apsolutni etanol.
- 4.4. Standardna otopina klorobutanola: 0,025 g u 100 mL etanola (4.3.) (m/v).
- 4.5. Standardna otopina 2,2,2-trikloroetanol: 4 mg u 100 mL etanola (4.3.) (m/v).
5. APARATURA
- 5.1. Normalna laboratorijska oprema.
- 5.2. Plinski kromatograf s elektronskim detektorom, Ni 63.
6. POSTUPAK
- 6.1. **Priprema uzorka**
- Odvaži se točno između 0,1 i 0,3 g (p g) uzorka. Stavi se u odmjernu tikvicu. Otopi se u etanolu (4.3.), doda 1 mL otopine unutarnjeg standarda (4.5.) i nadopuni do oznake etanolom (4.3.).

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

## 6.2. Uvjeti plinske kromatografije

6.2.1. Uvjeti postupka moraju biti takvi da se postigne faktor razlučivanja  $R \geq 1,5$ .

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

gdje je:

$R_1$  i  $R_2$  = retencijsko vrijeme vrhova u minutama,

$W_1$  i  $W_2$  = širina vrhova na polovini njihove visine, u milimetrima,

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

6.2.2. Kao primjer, traženo razlučivanje može se postići sljedećim uvjetima postupka:

| Kolona           | I  | II   |
|------------------|--|--|
| Materijal        | Staklo   | Nehrđajući čelik   |
| Duljina          | 1,80 m   | 3 m  |
| Promjer          | 3 mm   | 3 mm   |
| Stacionarna faza | 10 % Carbowax 20 M TPA na Gaschrom Q umreženja 80-100 (mesh) | 5 % OV 17 na Chromosorb WAW DMCS umreženja 80-100 (mesh) |
| Kondicioniranje  | 2 do 3 dana na 190 °C  |  |
| Temperatura:     |  |  |
| — injektor       | 200 °C   | 150 °C   |
| — kolona         | 150 °C   | 100 °C   |
| — detektor       | 200 °C   | 150 °C   |
| Nosivi plin      | Dušik  | Argon/metan (95/5 v/v)                                   |
| Brzina protoka   | 35 mL/min  | 35 mL/min  |

## 6.3. Standardna krivulja

U odmjernu tikvicu od 100 mL doda se 1 mL standardne otopine (4.5.) i 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 i 0,6 mL otopine 4.4., nadopuni se do oznake etanolom (4.3.) i promiješa. U skladu s uvjetima postupka opisanim u 6.2.2., u kromatograf se ubrizga 1 µL svake od tih otopina i konstruira kalibracijska krivulja tako da se kao apscisa nanese omjer mase klorobutanola i 2,2,2-trikloroetanolu a kao ordinata omjer odgovarajućih površina vrhova.

6.4. Ubrizga se 1 µL otopine dobivene u 6.1. i postupak se nastavi u skladu s uvjetima opisanim u 6.2.2.

## 7. RAČUN

7.1. Iz standardne krivulje (6.3.) se izračuna količina „a” izražena kao µg klorobutanola, u otopini 6.1.

7.2. Sadržaj klorobutanola u uzorku se računa prema formuli:

$$\% \text{ klorobutanola (m/m)} = \frac{a \times 10^2}{p \times 10^6} = \frac{a}{p \times 10^4}$$

## 8. PONOVLJIVOST (!)

Za sadržaj klorobutanola od 0,5 % (m/m) razlika u rezultatima između dva usporedna određivanja provedena na istom uzorku ne treba biti veća od 0,01 %.

*Napomena:*

Ako je rezultat jednak ili veći od najveće dozvoljene koncentracije, potrebno je provjeriti ima li interferenata.

(!) ISO 5725

## IDENTIFIKACIJA I ODREĐIVANJE KININA

## A. IDENTIFIKACIJA

1. CILJ I PODRUČJE PRIMJENE  
Ta metoda je namijenjena otkrivanju prisutnosti kinina u šamponima i losionima za kosu.
2. NAČELO  
Identifikacija se provodi tankoslojnom kromatografijom na silika gelu. Kinin se otkriva njegovom plavom fluorescencijom u kiselim uvjetima na 360 nm.  
Kao daljnji dokaz, fluorescencija se može ukloniti bromovim parama, a pare amonijaka će uzrokovati pojavu žučkaste fluorescencije.
3. REAGENSI  
Svi reagensi moraju biti analitičke čistoće (p.a.).
  - 3.1. Silika gel ploče, bez fluorescentnih indikatora, debljine 0,25 mm, 200 × 200 mm.
  - 3.2. Otopalo za razvijanje: toluen/dietileter/diklorometan/dietilamin 20/20/20/8 (v/v/v/v).
  - 3.3. Metanol.
  - 3.4. Sumporna kiselina (96 %-tna;  $d \frac{20}{4} = 1,84$ ).
  - 3.5. Dietil eter.
  - 3.6. Sredstvo za razvijanje: U rashlađeni spremnik koji sadrži 95 mL dietil etera (3.5.) pažljivo se doda 5 mL sumporne kiseline (3.4.).
  - 3.7. Brom.
  - 3.8. Otopina amonijeva hidroksida (28 %-tna;  $d \frac{20}{4} = 0,90$ ).
  - 3.9. Bezvodni kinin.
  - 3.10. Standardna otopina: u odmjernu tikvicu od 100 mL odvaži se točno oko 100,0 mg bezvodnog kinina (3.9.) i otopi u 100 mL metanola (3.3.).
4. APARATURA
  - 4.1. Normalna oprema za tankoslojnu kromatografiju.
  - 4.2. Ultrazvučna kupelj.
  - 4.3. Millipore filter, FH 0,5  $\mu$ m ili ekvivalent s primjerenom opremom za filtraciju.
5. POSTUPAK
  - 5.1. **Priprema uzorka**  
U odmjernu tikvicu od 100 mL točno se odvaži količina uzorka koja bi mogla sadržavati približno 100 mg kinina, otopi se i nadopuni do oznake metanolom (3.3.).  
Tikvica se začepi i ostavi jedan sat na sobnoj temperaturi u ultrazvučnom vibratoru (4.2.). Filtrira se (4.3.) i filtrat se uporabi za kromatografiju.
  - 5.2. **Tankoslojna kromatografija**  
1,0  $\mu$ L standardne otopine (3.10.) i otopine uzorka (5.1.) stavi se na silika gel ploču (3.1.). Kromatogram se razvija do udaljenosti od 150 mm otapalom 3.2., u posudi prethodno zasićenoj otapalom (3.2.).
  - 5.3. **Razvijanje**
    - 5.3.1. Ploča se suši na sobnoj temperaturi.
    - 5.3.2.1. Poprska se reagensom 3.6.
    - 5.3.3. Ploča se ostavi sušiti jedan sat na sobnoj temperaturi.
    - 5.3.4. Promatra se pod svjetlom UV svjetiljke podešene na valnu duljinu od 360 nm. Kinin se javlja kao fluorescentna, intenzivno plava mrlja.  
Kao primjer, doljnja tablica prikazuje  $R_f$  vrijednosti glavnih alkaloida, srodnih kininu, kada se razvija otapalom 3.2.

| Alkaloid     | $R_f$ |
|--------------|-------|
| Kinin        | 0,20  |
| Kinidin      | 0,29  |
| Kinhonin     | 0,33  |
| Kinhonidin   | 0,27  |
| Hidrokinidin | 0,17  |

- 5.3.5. Za daljnju potvrdu prisutnosti kinina, ploča se izloži približno jedan sat parama broma (3.7.). Fluorescencija nestaje. Kada se ista ploča izloži parama amonijaka (3.8.), ponovno se pojave mrlje smeđe boje. Kada se ploča ponovno ispita pod UV svjetlom na 360 nm, opaža se žućkasta fluorescencija.

Granica detekcije: 0,1 µg kinina.

#### B. ODREĐIVANJE

##### 1. CILJ I PODRUČJE PRIMJENE

Ova metoda opisuje određivanje kinina. Može se uporabiti za određivanje najveće dozvoljene koncentracije od 0,5 % (m/m) u šamponima i 0,2 % u losionima za kosu.

##### 2. DEFINICIJA

Sadržaj kinina određen ovom metodom izražava se kao maseni udio (% m/m) u proizvodu.

##### 3. NAČELO

Nakon odgovarajuće obrade proizvoda koji treba analizirati, određivanje se provodi tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC).

##### 4. REAGENSI

Svi reagensi moraju biti analitičke čistoće (p.a.) i prikladni za HPLC.

##### 4.1. Acetonitril.

##### 4.2. Kalijev dihidrogenortofosfat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).

##### 4.3. Ortofosforna kiselina (85 %-tna; $d \frac{20}{4} = 1,7$ ).

##### 4.4. Tetrametilamonijev bromid.

##### 4.5. Bezvodni kinin.

##### 4.6. Metanol.

##### 4.7. Otopina ortofosforne kiseline (0,1 M): U odmjernu tikvicu od 1000 mL odvaže se 11,53 g ortofosforne kiseline (4.3.) i otopi u 1 000 mL vode.

##### 4.8. Otopina dihidrogenortofosfata (0,1 M): U odmjernu tikvicu od 1000 mL odvaže se 13,60 g kalijeva dihidrogenortofosfata i otopi se u 1 000 mL vode.

##### 4.9. Otopina tetrametilamonijeva bromida: U odmjernu tikvicu od 1000 mL odvaže se 15,40 g tetrametilamonijeva bromida (4.4.) i otopi u 1 000 mL vode.

##### 4.10. Eluent: ortofosforna kiselina (4.7.)/kalijev dihidrogenortofosfat (4.8.)/tetrametilamonijev bromid (4.9.)/voda/acetoneitril (4.1.) 10/50/100/340/90 (v/v/v/v/v).

Sastav te mobilne faze se može mijenjati, kako bi se postigao faktor razlučivanja R 1,5.

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

gdje je:

R<sub>1</sub> i R<sub>2</sub> = retencijsko vrijeme vrhova u minutama,

W<sub>1</sub> i W<sub>2</sub> = širina vrhova na polovini njihove visine, u milimetrima,

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

##### 4.11. Silika obrađena oktadecisilanom, 10 µm.

##### 4.12. Standardna otopina: U skupinu odmjernih tikvica od 100 mL točno se odvaže približno 5,0, 10,0, 15,0 i 20,0 mg bezvodnog kinina. Do oznake se nadopuni metanolom (4.6.) i sadržaj se potresa dok se kinin ne otopi. Svaki uzorak se filtrira kroz 0,5-mikrometarski filter.

##### 5. APARATURA

##### 5.1. uobičajena laboratorijska oprema.

##### 5.2. Ultrazvučna kupelj.

##### 5.3. Oprema za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti s detektorom promjenjivih valnih duljina.

##### 5.4. Kolona: duljina 250 mm; unutarnji promjer: 4,6 mm; punilo: silika (4.11.).

##### 5.5. Millipore filter FH 0,5 mm ili ekvivalent, s prikladnom aparaturom za filtriranje.



6. POSTUPAK
- 6.1. **Priprema uzorka**
- U odmjernu tikvicu od 100 mL odvaže se točno približno ona količina uzorka koja je dovoljna da sadrži 10,0 mg bezvodnog kinina, doda se 20 mL metanola (4.6.) te se tikvica stavi u ultrazvučnu kupelj (5.2.) na 20 minuta. Nadopuni se metanolom (4.6.) do oznake. Otopina se promiješa i odfiltrira se alikvot (5.5.).
- 6.2. **Kromatografija**
- Brzina protoka: 1,0 mL/min.
- Valna duljina detektora (5.3.): 332 nm.
- Volumen koji se ubrizgava: 10 µL filtrirane tekućine (6.1.).
- Mjerenje: površina vrha.
- 6.3. **Kalibracijska krivulja**
- Ubrizga se najmanje tri puta 10,0 µL svake od referentnih otopina (4.12.), mjeri se površina vrhova i računa prosječna površina za svaku koncentraciju.
- Nacrta se kalibracijska krivulja i provjeri da je pravocrtna.
7. RAČUN
- 7.1. Iz kalibracijske krivulje (6.3.) se odredi u µg količina bezvodnog kinina u ubrizganom volumenu (6.2.).
- 7.2. Koncentracija kinina u uzorku, izražena kao maseni udio (% m/m) dobije se sljedećom formulom:
- $$\% \text{ (m/m) bezvodnog kinina} = \frac{B}{A}$$
- gdje je:
- B količina, u mikrogramima, bezvodnog kinina određenog u 10 mikrolitara filtrirane otopine (6.1.).
- A masa uzorka u gramima (6.1.)
8. PONOVLJIVOST <sup>(1)</sup>
- Za sadržaj bezvodnog kinina od 0,5 % (m/m), razlika u rezultatima između dva usporedna određivanja provedena na istom uzorku ne treba biti veća od 0,02 %.
- Za sadržaj bezvodnog kinina od 0,2 % (m/m), razlika u rezultatima između dva usporedna određivanja provedena na istom uzorku ne treba biti veća od 0,01 %.

## IDENTIFIKACIJA I ODREĐIVANJE ANORGANSKIH SULFITA I HIDROGEN SULFITA

### CILJ I PODRUČJE PRIMJENE

Ova metoda opisuje identifikaciju i određivanje anorganskih sulfita i hidrogensulfita u kozmetičkim proizvodima. Ona se može primijeniti samo na proizvode koji imaju vodenu ili alkoholnu fazu i za koncentracije do 0,2 % sumpornog dioksida.

#### A. IDENTIFIKACIJA

1. NAČELO
- Uzorak se zagrijava u klorovodičnoj kiselini, a sumporni dioksid se identificira bilo svojim mirisom, bilo djelovanjem na indikatorski papir.
2. REAGENSI
- Svi reagensi moraju biti analitičke čistoće (p.a.).
- 2.1. Klorovodična kiselina (4 M).
- 2.2. Škrobni papir s kalijevim jodatom ili drugo pogodno sredstvo.
3. APARATURA
- 3.1. Normalna laboratorijska oprema.
- 3.2. Tikvica (25 mL) s kratkim kondenzatorom povratnoga toka.
4. POSTUPAK
- 4.1. Oko 2,5 g uzorka stavi se u tikvicu (3.2.) s 10 mL klorovodične kiseline (2.1.).
- 4.2. Promiješa se i zagrijava do vrenja.
- 4.3. Testira se na razvijanje sumporova dioksida ili mirisom ili indikatorskim papirom (2.2.).

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

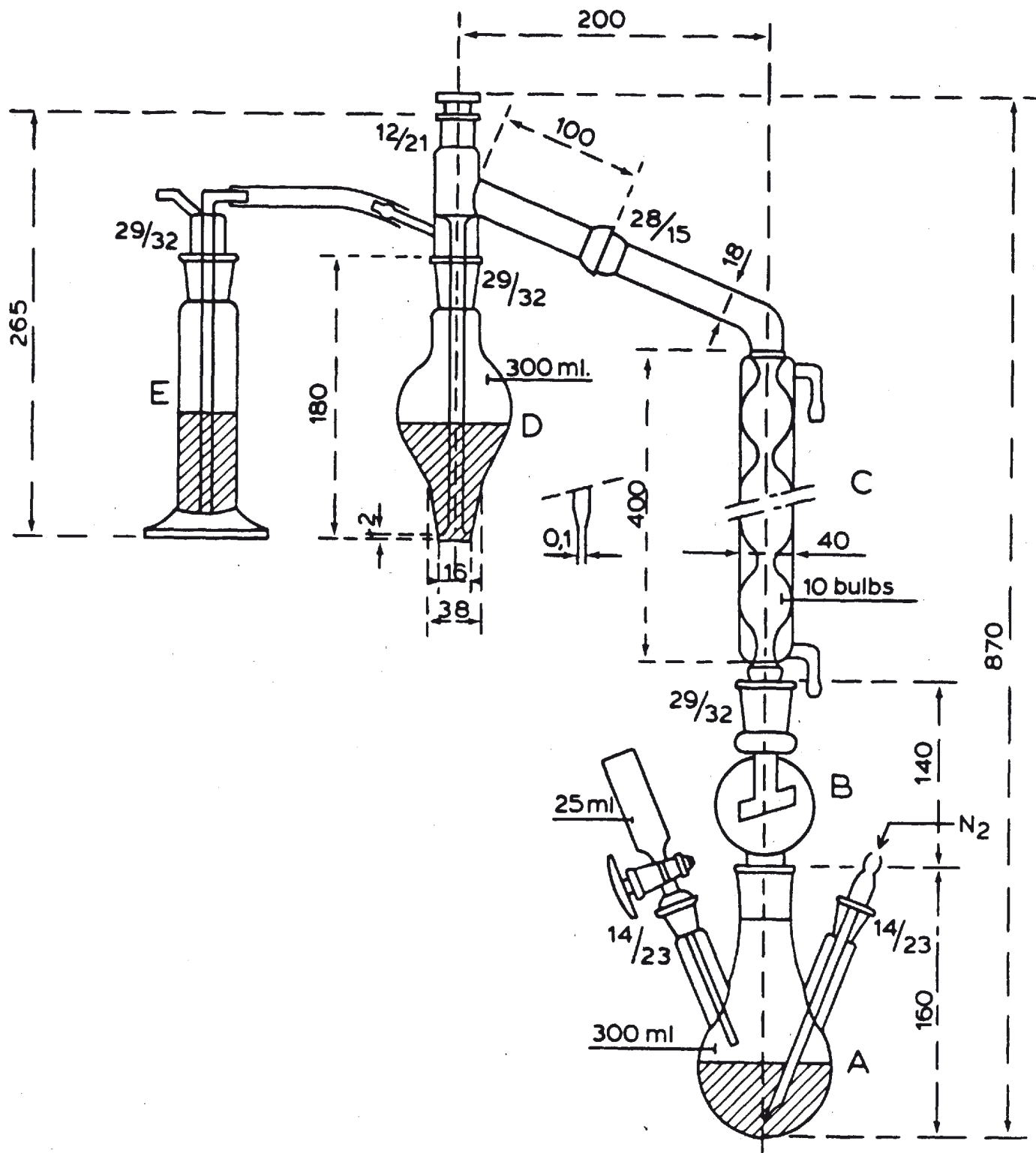
## B. ODREĐIVANJE

1. DEFINICIJA  
Sadržaj sulfita ili hidrogensulfita u uzorku određen ovom metodom izražava se kao maseni udio sumporova dioksida.
2. NAČELO  
Nakon zakiseljavanja uzorka, oslobođeni sumporov dioksid se destilira u otopinu vodikova peroksida. Nastala sumporna kiselina se titrira standardiziranom otopinom natrijeva hidroksida.
3. REAGENSI  
Svi reagensi moraju biti analitičke čistoće.
  - 3.1. Vodikov peroksid 0,2 % (m/v). Priprema se svaki dan svježi.
  - 3.2. Ortofosforna kiselina ( $d_{4}^{25} = 1,75$ ).
  - 3.3. Metanol.
  - 3.4. Natrijev hidroksid (0,01 M) standardizirana otopina.
  - 3.5. Dušik.
  - 3.6. Indikator: smjesa 1 : 1 (v/v) metil crvenog (0,03 % m/v u etanolu) i metilen plavog (0,05 % m/v u etanolu). Otopina se filtrira.
4. APARATURA
  - 4.1. Normalna laboratorijska oprema.
  - 4.2. Aparat za destilaciju (vidjeti sliku).
5. POSTUPAK
  - 5.1. U tikvicu za destilaciju A (vidjeti sliku) odvaži se točno oko 2,5 g uzorka.
  - 5.2. Doda se 60 mL vode i 50 mL metanola (3.3.) i promiješa se.
  - 5.3. U destilacijski dio za primanje D (vidjeti sliku) stavi se 10 mL vodikova peroksida (3.1.), 60 mL vode i nekoliko kapi indikatora (3.6.). Doda se nekoliko kapi natrijeva hidroksida (3.4.) dok indikator ne poprimi zelenu boju.
  - 5.4. Postupak 5.3. se ponovi za bocu za ispiranje E (vidjeti sliku).
  - 5.5. Sastavi se aparatura i podesi protok dušika (3.5.) na oko 60 mjehurića u minuti.
  - 5.6. Iz lijevka se otoči u tikvicu za destilaciju A 15 mL ortofosforne kiseline (3.2.).
  - 5.7. Brzo se zagrije do vrenja i pusti se lagano ključati ukupno 30 minuta.
  - 5.8. Otklopi se destilacijski dio za primanje D. Cijev se ispere i zatim titrira otopinom natrijeva hidroksida (3.4.) do promjene boje indikatora u zelenu (3.6.).
6. RAČUN  
Maseni udio sulfita ili hidrogensulfita u uzorku računa se jednadžbom:
 
$$\% \text{ m/m sumpornog dioksida} = \frac{3,2MV}{m}$$
 gdje je  
 M = molarna koncentracija otopine natrijeva hidroksida (3.4.),  
 V = volumen natrijeva hidroksida (3.4.) utrošen za titraciju (5.8.), u mililitrima,  
 m = masa uzorka (5.1.) u gramima.
7. PONOVLJIVOST (1)  
Za sadržaj sumporova dioksida od 0,2 %, razlika u rezultatima između dva usporedna određivanja provedena na istom uzorku ne treba biti veća od 0,006 %.

(1) ISO 5725

## Aparat za destilaciju sumporova dioksida prema Tanneru

Sve dimenzije su u mm



## IDENTIFIKACIJA I ODREĐIVANJE Klorata Alkalijskih Metala

## CILJ I PODRUČJE PRIMJENE

Ova metoda opisuje identifikaciju i određivanje klorata u pastama za zube i drugim kozmetičkim proizvodima.

## A. IDENTIFIKACIJA

1. NAČELO  
Klorati se odvajaju od drugih halata tankoslojnom kromatografijom i identificiraju se oksidacijom jodida u jod.
2. REAGENSI  
Svi reagensi moraju biti analitičke čistoće (p.a.).
  - 2.1. Referentne otopine: vodene otopine kalijeva klorata, bromata i jodata (0,2 % m/v), svježe pripremljene.
  - 2.2. Otopalo za razvijanje: otopina amonijaka (28 % m/v)/acetona/butanol (60/130/30 v/v/v).
  - 2.3. Kalijev jodid, vodena otopina (5 % m/v).
  - 2.4. Otopina škroba (1 do 5 % m/v).
  - 2.5. Klorovodična kiselina (1 M).
  - 2.6. Za uporabu pripremljene celulozne tankoslojne ploče (0,25 mm).
3. APARATURA  
Normalna oprema za tankoslojnu kromatografiju.
4. POSTUPAK
  - 4.1. Oko 1 g uzorka ekstrahira se vodom, filtrira i razrijedi na oko 25 mL.
  - 4.2. Na ploču (2.6.) se stavi 2 µL otopine (4.1.) i po 2 µL alikvota svake od tri referentne otopine (2.1.).
  - 4.3. Ploča se stavi u posudu i razvija se s otapalom 2.2. do otprilike tri četvrtine duljine ploče (2.6.).
  - 4.4. Ploča se izvadi iz posude i pusti se da otapalo ispari. (Napomena: To može trajati do dva sata.)
  - 4.5. Ploča se poprskala kalijevim jodidom (2.3.) i pusti da se suši oko pet minuta.
  - 4.6. Ploča se poprskala otopinom škroba (2.4.) i pusti da se suši oko pet minuta.
  - 4.7. Ploča se poprskala klorovodičnom kiselinom (2.5.).
5. PROCJENA  
Ako su klorati prisutni, pojavit će se nakon pola sata plave mrlje (moguće smeđe) s  $R_f$  vrijednošću približno 0,7 do 0,8.

| Halati  | $R_f$      |
|---------|------------|
| Jodati  | 0 do 0,2   |
| Bromati | 0,5 do 0,6 |
| Klorati | 0,7 do 0,8 |

Treba napomenuti da bromati i jodati odmah daju reakciju. Treba paziti da se ne zamijene mrlje bromata i klorata.

## B. ODREĐIVANJE

## 1. DEFINICIJA

Sadržaj klorata u uzorku, određen ovom metodom izražava se kao maseni udio klorata.

## 2. NAČELO

Klorat se reducira cinkovim prahom u kiselim uvjetima. Nastali klorid se mjeri potenciometrijskom titracijom pomoću otopine srebrova nitrata. Istovrsno određivanje prije redukcije dozvoljava moguću prisutnost klorida.

## 3. REAGENSI

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

## 3.1. Octena kiselina, 80 %-tna (m/m).

## 3.2. Cinkov prah.

## 3.3. Standardna otopina srebrova nitrata (0,1 M).

## 4. APARATURA

## 4.1. Normalna laboratorijska oprema.

## 4.2. Potencijometar opremljen srebrenom indikatorskom elektrodom.

## 5. POSTUPAK

5.1. **Priprema uzorka**

U kivetu za centrifugiranje odvaži se točno količina „m”, približno jednaka 2 g. Doda se 15 mL octene kiseline (3.1.) i pažljivo miješa. Čeka se 30 minuta te se centrifugira 15 minuta pri 2 000 okr./min. Bistra otopina iznad taloga (supernatant) se prenese u odmjernu tikvicu od 50 mL. Centrifugiranje se ponovi dva puta dodatkom 15 mL octene kiseline (3.1.) ostatku. Otopine koje sadrže klorat sakupe se u jednu odmjernu tikvicu. Dopuni se do oznake octenom kiselinom (3.1.).

5.2. **Redukcija klorata**

Uzme se 20 mL otopine 5.1. i doda se 0,6 g cinkova praha (3.2.). Zagrije se do vrenja u tikvici s kondenzacijskom cijevi. Nakon 30 minuta ključanja, hladi se i filtrira. Tikvica se ispere vodom. Filtrira se te se filtrat spoji s vodom za ispiranje.

5.3. **Određivanje klorida**

Titrira se 20 mL otopine 5.2. srebrovim nitratom (3.3.) uporabom potencijometra (4.2.). Na jednaki način titrira se 20 mL otopine 5.1. srebrovim nitratom (3.3.).

*Napomena:* Ako proizvod sadrži derivate broma i joda koji nakon redukcije mogu dati bromide i jodide, titracijska krivulja će imati nekoliko točaka infleksije. U tom slučaju je volumen titrirane otopine (3.3.) koji odgovara kloridu razlika između posljednje i pretposljednje točke infleksije.

## 6. RAČUN

Sadržaj klorata u uzorku (% m/m) se računa prema formuli:

$$\text{Klorat (ClO}_3^-) \% \text{ m/m} = \frac{20,9 (V - V') M}{m},$$

gdje je:

V = volumen u mililitrima otopine srebrova nitrata (3.3.), utrošen za titraciju otopine 5.2.,

V' = volumen u mililitrima otopine srebrova nitrata (3.3.), utrošen za titraciju 20 mL otopine 5.1.,

M = molaritet standardne otopine srebrova nitrata (3.3.),

m = masa uzorka u gramima.

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

Za sadržaj klorata od 3 do 5 % m/m, razlika u rezultatima između dva usporedna određivanja provedena na istom uzorku ne treba biti veća od 0,07 % m/m.

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

**IDENTIFIKACIJA I ODREĐIVANJE NATRIJEVA JODATA****CILJ I PODRUČJE PRIMJENE**

Metoda opisuje postupak za identificiranje i određivanje ispirka kozmetičkih proizvoda koji sadrže natrijev jodat.

**A. IDENTIFIKACIJA**

1. **NAČELO**

Natrijev jodat se odvaja od ostalih halata tankoslojnom kromatografijom te se identificira oksidacijom jodida u jod.
2. **REAGENSI**

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

  - 2.1. Referentne otopine. Vodene otopine kalijeva klorata, bromata i jodata (0,01 % m/v), svježe pripravljene.
  - 2.2. Otapalo za razvijanje.

Otopina amonijaka (28 % m/v)/aceton/butanol (60/130/30 v/v/v).
  - 2.3. Vodena otopina kalijeva jodida (5 % m/v).
  - 2.4. Otopina škroba (1 do 5 % m/v).
  - 2.5. Klorovodična kiselina (1 M).
3. **APARATURA**
  - 3.1. Za uporabu pripravljene celulozne tankoslojne ploče (0,25 mm).
  - 3.2. Normalna oprema za tankoslojnu kromatografiju.
4. **POSTUPAK**
  - 4.1. Oko 1 g uzorka se ekstrahira s vodom, filtrira i razrijedi na oko 10 mL.
  - 4.2. Na početnu liniju ploče (3.1.) stavi se 2 µL te otopine i po 2 µL alikvota svake od tri referentne otopine (2.1.).
  - 4.3. Ploča se stavi u posudu i razvija se s otapalom (2.2.) do otprilike tri četvrtine duljine ploče.
  - 4.4. Ploča se makne iz posude i pusti se da otapalo ispari na temperaturi okoliša (napomena: to može trajati dva sata).
  - 4.5. Ploča se popraska kalijevim jodidom (2.3.) i pusti da se suši oko pet minuta.
  - 4.6. Ploča se popraska škrobom (2.4.) i pusti da se suši oko pet minuta.
  - 4.7. Konačno se ploča popraska klorovodičnom kiselinom (2.5.).
5. **PROCJENA**

Ako je prisutan jodat, odmah se pojave plave mrlje (boja može biti smeđa ili može postati smeđa stajanjem) s  $R_F$  vrijednosti približno 0 do 0,2.

Treba napomenuti da bromati odmah daju reakciju s  $R_F$  vrijednostima približno 0,5 do 0,6 a klorati nakon oko 30 minuta s  $R_F$  vrijednostima od 0,7 do 0,8.

**B. ODREĐIVANJE**

1. **DEFINICIJA**

Sadržaj natrijeva jodata određen ovom metodom se izražava kao maseni udio natrijeva jodata.
2. **NAČELO**

Natrijev jodat se otopi u vodi i određuje tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti, pri čemu se uporabi u nizu kolona C 18 s reverznom fazom i kolona s anionskim izmjenjivačem.

3. REAGENSI
- Svi reagensi moraju biti analitičke čistoće (p.a.) i posebno pogodne za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC).
- 3.1. Klorovodična kiselina (4 M).
- 3.2. Vodena otopina natrijeva sulfita, 5 %-tna m/v.
- 3.3. Ishodišna otopina natrijeva jodata.
- Pripremi se ishodišna otopina koja sadrži 50 mg natrijeva jodata na 100 mL vode.
- 3.4. Kalijev dihidrogenortofosfat.
- 3.5. Dinatrijev hidrogenortofosfat · 2 H<sub>2</sub>O.
- 3.6. HPLC mobilna faza: otopi se 3,88 g kalijeva dihidrogenortofosfata (3.4.) i 1,19 g dinatrijeva hidrogenortofosfata · 2 H<sub>2</sub>O (3.5.) u 1 litri vode.
- pH dobivene otopine je 6,2.
- 3.7. Univerzalni indikatorski papir, pH 1-11.
4. APARATURA
- 4.1. Uobičajena laboratorijska aparatura.
- 4.2. Kružni filtrirni papir, promjera 110 mm, Schleicher i Schüll No 575, ili ekvivalent.
- 4.3. Kromatograf za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti s detektorom promjenjivih valnih duljina.
- 4.4. Kolone: duljina: 120 mm; unutarnji promjer: 4,6 mm; broj: dvije spojene u seriju; prva kolona – Nucleosil<sup>®</sup> 5 C 18 ili ekvivalent; druga kolona – Vydac<sup>™</sup>-301-SB ili ekvivalent.
5. POSTUPAK
- 5.1. **Priprema uzorka**
- 5.1.1. *Tekući uzorci (šamponi)*
- U građuiranu epruvetu sa staklenim čepom ili u odmjernu tikvicu od 10 mL odvaži se točno obrok za testiranje, što iznosi približno 1,0 g uzorka.
- Nadopuni se do oznake vodom i miješa.
- Ako je potrebno, otopina se filtrira.
- Količina jodata u otopini se odredi s HPLC, kako je opisano u odjeljku 5.2.
- 5.1.2. *Čvrsti uzorci (sapun)*
- Dio uzorka se fino razdjeli i točno se odvaži obrok za testiranje od približno 1,0 g u odmjerni valjak (cilindar) od 100 mL sa staklenim čepom. Nadopuni se vodom do 50 mL i snažno se protresa jednu minutu. Centrifugira se i filtrira kroz filtrirni papir (4.1.) ili se smjesa pusti stajati najmanje jednu noć.
- Želatinasta otopina se snažno protresa i filtrira kroz filtrirni papir (4.1.).
- Količina jodata u filtratu odredi se pomoću HPLC, kako je opisano u odjeljku 5.2.
- 5.2. **Kromatografija**
- Brzina protoka: 1 mL/min.
- Valna duljina detektora (4.2.): 210 nm.
- Ubrizgani volumen: 10 µL.
- Mjerenje: površina vrha.
- 5.3. **Kalibracija**
- Otpipetira se 1,0, 2,0, 5,0, 10,0 i 20,0 mL ishodišne otopine natrijeva jodata (3.3.) u odmjernu tikvicu od 50 mL. Nadopuni se do oznake i promiješa.
- Tako dobivene otopine sadrže 0,01, 0,02, 0,05, 0,10 i 0,20 mg natrijeva jodata po mililitru.
- Obrok od 10 µL svake od standardnih otopina jodata ubrizga se u tekućinski kromatograf (4.2.) i dobije se kromatogram. Odredi se površina vrha jodata i nactra krivulja koja prikazuje odnos površine vrha prema koncentraciji natrijeva jodata.

## 6. RAČUN

Sadržaj natrijeva jodata računa se kao maseni udio prema formuli:

$$\% \text{ (m/m) natrijeva jodata} = \frac{Vc}{10 m},$$

gdje je:

m = masa u gramima obroka za testiranje (5.1.),

V = ukupni volumen otopine uzorka, u mililitrima, dobiven kako je opisano u 5.1.,

c = koncentracija, u miligramima po mililitru natrijeva jodata, dobivena iz kalibracijske krivulje (5.3.).

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

Za sadržaj natrijeva jodata od 0,1 % (m/m), razlika u rezultatima između dva usporedna određivanja provedena na istom uzorku ne smije biti veća od 0,002 %.

## 8. DOKAZIVANJE

## 8.1. Načelo

U zakiseljenoj otopini kozmetičkog proizvoda, jodat ( $\text{IO}_3^-$ ) se reducira u jodid ( $\text{I}^-$ ) sulfitom i tako nastala otopina se ispituje pomoću HPLC. Ako vrh s retencijskim vremenom koje odgovara retencijskom vremenu jodata nakon obrade sa sulfitom nestane, izvorni vrh se najvjerojatnije može pripisati jodatu.

## 8.2. Postupak

U Erlenmeyerovu tikvicu se otpipetira obrok otopine uzorka od 5 mL, dobiven kako je opisano u odjeljku 5.1.

pH otopine se podesi klorovodičnom kiselinom (3.1.) na 3 ili niže; univerzalni indikatorski papir (3.7.).

Doda se tri kapi otopine natrijeva sulfita (3.2.) i promiješa.

Obrok od 10  $\mu\text{L}$  otopine ubrizga se u tekućinski kromatograf (4.2.).

Taj kromatogram se uspoređi s kromatogramom dobivenim kako je opisano u stavku 5. za isti uzorak.

---

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