

31982L0434

30.6.1982

URADNI LIST EVROPSKIH SKUPNOSTI

L 185/1

DRUGA DIREKTIVA KOMISIJE**z dne 14. maja 1982****o približevanju zakonodaje držav članic v zvezi z analiznimi metodami, potrebnimi za preverjanje sestave kozmetičnih izdelkov**

(82/434/EGS)

KOMISIJA EVROPSKIH SKUPNOSTI JE

lase in določanje količine metanola v razmerju s količino etanola ali propan-2-ola;

ob upoštevanju Pogodbe o ustanovitvi Evropske gospodarske skupnosti,

ker so ukrepi, ki so predpisani v tej direktivi, v skladu z mnenjem odbora za prilagajanje Direktive 76/768/EGS tehničnemu napredku,

ob upoštevanju Direktive Sveta 76/768/EGS z dne 27. julija 1976 o približevanju zakonodaje držav članic v zvezi s kozmetičnimi izdelki ⁽¹⁾, kakor je bila spremenjena z Direktivo 79/661/EGS ⁽²⁾, in zlasti člena 8(1) direktive,

SPREJELA NASLEDNJO DIREKTIVO:

Člen 1

ker direktiva 76/768/EGS določa uradno preskušanje kozmetičnih izdelkov, da se zagotovi izpolnitev pogojev o sestavi kozmetičnih izdelkov, predpisanih v določbah Skupnosti;

Države članice sprejmejo vse potrebne ukrepe za zagotovitev, da so med uradnim preskušanjem kozmetičnih izdelkov:

— identifikacija oksidantov in določanje količine vodikovega peroksida v kozmetičnih izdelkih za nego las,

ker je vse potrebne analitske metode treba sestaviti čimprej; ker je bil prvi korak k doseganju tega cilja že narejen z definiranjem nekaterih postopkov v Direktivi Komisije 80/1335/EGS ⁽³⁾, je naslednji korak definiranje postopkov za identifikacijo nekaterih oksidantov in za določanje količine vodikovega peroksida v kozmetičnih izdelkih za nego las, identifikacijo in polkvantitativno določanje nekaterih oksidacijskih barvil v barvah za lase, identifikacijo in določanje količine nitritov, identifikacijo in določanje količine prostega formaldehida, določanje količine resorcinola v šamponih in losjonih za

— identifikacija in polkvantitativno določanje količine nekaterih oksidacijskih barvil v barvah za lase,

— identifikacija in določanje količine nitritov,

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

— identifikacija in določanje količine prostega formaldehida,

- določanje količine resorcinola v šamponih in losjonih za lase,
 - določanje količine metanola v razmerju s količino etanola ali propan-2-ola,
- opravljeni v skladu s postopki, ki so opisani v Prilogi.

Člen 2

Države članice sprejmejo zakone in druge predpise, potrebne za uskladitev s to direktivo, najpozneje do 31. decembra 1983.

O tem takoj obvestijo Komisijo.

Člen 3

Ta direktiva je naslovljena na države članice.

V Bruslju, 14. maja 1982

Za Komisijo
Karl-Heinz NARJES
Član Komisije

PRILOGA

I. IDENTIFIKACIJA OKSIDANTOV IN DOLOČANJE KOLIČINE VODIKOVEGA PEROKSIDA V IZDELKIH ZA NEGO LAS

NAMEN IN PODROČJE UPORABE

Jodometrično določanje količine vodikovega peroksida v kozmetičnih izdelkih je mogoče le pri odsotnosti drugih oksidantov, ki tvorijo jod iz jodidov, zato je pred določanjem količine treba odkriti in identificirati vse druge navzoče oksidante. Takšna identifikacija je sestavljena iz dveh stopenj; prva se nanaša na persulfate, bromate in vodikov peroksid, druga pa na barijev peroksid.

A. IDENTIFIKACIJA PERSULFATOV, BROMATOV IN VODIKOVEGA PEROKSIDA

1. PRINCIP

Natrijev persulfat, kalijev persulfat in amonijev persulfat; kalijev bromat, natrijev bromat in vodikov peroksid – ne glede na to, ali izvirajo iz barijevega peroksida ali ne – se identificirajo s papirno kromatografijo, pri kateri se uporabita dve topila za razvijanje.

2. REAGENTI

Vsi reagenti morajo biti analitsko čisti.

2.1 0,5 % (m/v) referenčna vodna raztopina naslednjih spojin:

2.1.1 Natrijev persulfat

2.1.2 Kalijev persulfat

2.1.3 Amonijev persulfat

2.1.4 Kalijev bromat

2.1.5 Natrijev bromat

2.1.6 Vodikov peroksid

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

2.3 Topilo B za razvijanje, benzen – metanol – 3-metil butan-1-ol – voda (34: 38: 18: 10 v prostorninskih deležih)

2.4 Reagent A za detekcijo, 10 % (m/v) vodna raztopina kalijevega jodida

2.5 Reagent B za detekcijo, 1 % (m/v) vodna raztopina škroba

2.6 Reagent C za detekcijo, 10 % (m/m) klorovodikova kislina

2.7 4N klorovodikova kislina

3. APARATURA

3.1 Papir za kromatografijo (whatmanov papir št. 3 in št. 4 ali ekvivalent)

3.2 Mikropipeta, 1 µl

3.3 Standardne stekleničke, 100 ml

3.4 Nagubani filtri

3.5 Priprava za papirno kromatografijo

4. PRIPRAVA VZORCA

4.1 **Izdelki, topni v vodi**

Iz vsakega vzorca se naredita dve raztopini tako, da se 1 g in 5 g izdelka raztopi v po 100 ml vode. Za izvedbo papirne kromatografije, opredeljene v oddelku 5, se uporabi 1 µl vsake od tako pripravljenih raztopin.

4.2 **Izdelki, ki so v vodi slabo topni**

4.2.1 Stehta se 1 g in 5 g vzorca, kar se raztopi v po 50 ml vode, nato se pri obeh do prostornine 100 ml dolije voda in premeša. Obe disperziji se filtrirata skozi nagubani filter (3.4) in za papirno kromatografijo iz oddelka 5 se uporabi po 1 µl vsakega filtrata.

4.2.2 Z raztapljanjem 1 g in 5 g vsakega vzorca v 50 ml vode se ponovno pripravita dve disperziji, nakisani z raztopljeno klorovodikovo kislino (2.7), do prostornine 100 ml se dolije voda in premeša. Disperziji se filtrirata skozi nagubani filter (3.4) in za papirno kromatografijo iz razdelka 5 se uporabi po 1 µl obeh filtratov.

4.3 **Kreme**

Dispergira se 5 g in 20 g vsakega izdelka v po 100 ml vode in dobljene disperzije se uporabijo za papirno kromatografijo iz oddelka 5.

5. METODA

5.1 V dve ločeni posodi za kromatografijo se vnese ustrezna količina topil A (2.2) in B (2.3), da bi se tako opravila papirna kromatografija. Obe posodi za kromatografijo se pustita in se vsaj 24 ur nasičujeta s hlapi topila.

5.2 Po 1 µl raztopine izdelka in referenčne raztopine, ki sta bili pripravljene v skladu z razdelkoma 4 in 2.1, se nanese na vsako startno točko na 40 cm dolgem in 20 cm širokem (3.1) traku kromatografskega papirja (whatman št. 3 ali ekvivalent), ki je lahko tudi drugega ustreznega formata, in se počaka, da raztopina izhlapi.

5.3 Kromatografski trak (5.2) se postavi v posodo za kromatografijo, napolnjeno s topilom A za razvijanje (5.1), in se razvija, dokler črta topila ne napreduje za 35 cm (približno 15 ur).

5.4 Postopek iz oddelkov 5.2 in 5.3 se ponovi s kromatografskim papirjem (whatman št. 4 ali ekvivalent) (3.1) in topilom B za razvijanje. Kromatograf se razvija, dokler črta topila ne napreduje za 35 cm (približno pet ur).

5.5 Po končanem razvijanju se kromatograma odstranita in se osušita na zraku.

5.6 Lise na kromatogramu se prikažejo tako, da se ta naprši z:

5.6.1 reagentom A za detekcijo (2.4), kmalu zatem pa še z reagentom B za detekcijo (2.5). Na kromatogramu se najprej prikažejo lise persulfatov, za njimi pa tudi lise vodikovega peroksida. Lise se označijo s pisalom;

5.6.2 reagentom C za detekcijo (2.6) na kromatogramih, ki so bili dobljeni v skladu z razdelkom 5.6.1; navzočnost bromatov bo na kromatogramu vidna v obliki sivkasto modrih lis.

5.7 Po zgoraj navedenih pogojih, ki se nanašajo na topila A (2.2) in B (2.3) za razvijanje, so R_f-vrednosti referenčnih spojin (2.1) približno enake naslednjim:

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

B. IDENTIFIKACIJA BARIJEVEGA PEROKSIDA

1. PRINCIP

Barijev peroksid se identificira zaradi nastajanja vodikovega peroksida po nakisanju vzorca (A.4.2) in zaradi navzočnosti barijevega iona:

— pri odsotnosti persulfatov (A) z dodajanjem razredčene žveplove kisline delu kisle raztopine vzorca (B.4.1), pri čemer nastane bela oborina barijevega sulfata. Navzočnost barijevih ionov v vzorcu (B.4.1) se znova potrdi s papirno kromatografijo na način, ki je opisan spodaj (B.5),

— kjer sta hkrati navzoča barijev peroksid in persulfat (B.4.2), z razgrajanjem ostanka iz raztopine (B.4.2) v alkalnem mediju; po raztapljanju v klorovodikovi kislini se navzočnost barijevih ionov v raztopini taline (B.4.2.3) potrdi s papirno kromatografijo in/ali z obarjanjem z barijevim sulfatom.

2. REAGENTI

2.1 Metanol

2.2 36-odstotna (m/m) koncentrirana klorovodikova kislina

2.3 6N klorovodikova kislina

2.4 4N žveplove kisline

2.5 Dinatrijeva sol rodizonske kisline

2.6 Barijev klorid ($BaCl_2 \times 2H_2O$)

2.7 Brezvodni natrijev karbonat

2.8 1-odstotna (m/v) vodna raztopina barijevega klorida

2.9 Topilo za razvijanje, sestavljeno iz metanola, koncentrirane klorovodikove kisline (36-odstotna koncentracija) in vode (80: 10: 10 v prostorninskih deležih).

2.10 Reagent za detekcijo, 0,1-odstotna (m/v) vodna raztopina dinatrijeve soli rodizonske kisline, ki se pripravi sveža, tik pred uporabo.

3. PRIPRAVE IN OPREMA

3.1 Mikropipeta, 5 μ l

3.2 Platinasti talilni lončki

3.3 Standardne stekleničke

3.4 Kromatografski papir Schleicher and Schull 2043 b ali ekvivalent. Papir se očisti tako, da se v posodi za kromatografijo (A.3.5), ki vsebuje topilo za razvijanje (B.2.9), razvija čez noč, nato pa se posuši.

3.5 Naguban filtrirni papir

3.6 Običajna priprava za opravljanje papirne kromatografije

4. PRIPRAVA VZORCA

4.1 **Izdelki, v katerih ni persulfatov**

4.1.1 Dispergira se 2 g izdelka v 50 ml vode in se s klorovodikovo kislino (B.2.3.)pH nastavi na približno 1.

4.1.2 Disperzija z vodo se prenese v 100-mililitrsko standardno stekleničko, do oznake se dolije voda in se premeša. Dobljena disperzija se uporabi za papirno kromatografsko analizo iz oddelka 5 in za identifikacijo barija z obarjanjem sulfata.

4.2 Izdelki, v katerih so persulfati

4.2.1 2 g izdelka se dispergira v 100 ml vode in filtrira.

4.2.2 Osušenemu ostanku se doda od 7- do 10-kratna količina natrijevega karbonata (B.2.7), nato se zmeša in mešanica se pol ure tali v platinastem talilnem lončku (B.3.2).

4.2.3 To se ohladi na sobno temperaturo, staljena mešanica se raztopi v 50 ml vode in filtrira (B.3.5).

4.2.4 Ostanek taline se raztopi v klorovodikovi kislini (B.2.3) in dolije se voda do prostornine 100 ml. Raztopina se uporabi za papirno kromatografsko analizo iz oddelka 5 in za identifikacijo barija z obarjanjem sulfata.

5. METODA

5.1 V posodo za papirno kromatografijo se vnese ustrezna količina topila za razvijanje (B.2.9) in posoda se nasičuje s topilom, kar traja vsaj 15 ur.

5.2 Na košček kromatografskega papirja – poprej obdelanega, kakor je bilo opisano v oddelku B.3.4 – se nanese 5 µl vsake od raztopin, ki sta bili pripravljene v skladu z oddelkoma B.4.1.2 in B.4.2.4, in referenčna raztopina B.2.8 na tri startne točke.

5.3 Lise vzorcev in referenčne raztopine se osušijo na zraku. Kromatograf se razvija, dokler se prva črta topila ne dvigne za 30 cm.

5.4 Kromatograf se odstrani iz rezervoarja in se posuši na zraku.

5.5 Lise na kromatografu se prikažejo tako, da se na papir naprši reagent za detekcijo B.2.10. V navzočnosti barija se na kromatogramu pokažejo rdeče lise, katerih R_f-vrednost je približno 0,10.

C. DOLOČANJE KOLIČINE VODIKOVEGA PEROKSIDA

1. PRINCIP

Jodometrično določanje količine vodikovega peroksida temelji na naslednji reakciji:



Prikazana pretvorba poteka počasi, vendar se lahko pospeši z dodatkom amonijevega molibdata. Nastala količina joda se določi s titracijo z natrijevim tiosulfatom in je merilo vsebnosti vodikovega peroksida.

2. OPREDELITEV

Vsebnost vodikovega peroksida se določi po postopku, opisanem spodaj, in se izrazi kot masni odstotek (% m/m) v izdelku.

3. REAGENTI

Vsi reagenti morajo biti analitsko čisti.

3.1 2N žveplova kislina

3.2 Kalijev jodid

3.3 Amonijev molibdat

3.4 0,1N natrijev tiosulfat

- 3.5 10-odstotna (m/v) raztopina kalijevega jodida, ki se pripravi sveža, tik pred uporabo.
- 3.6 20-odstotna (m/v) raztopina amonijevega molibdata
- 3.7 1-odstotna (m/v) raztopina škroba
4. APARATURA
- 4.1 Čaše, 100 ml
- 4.2 Bireta, 50 ml
- 4.3 Standardne stekleničke, 250 ml
- 4.4 Merilni valji, 25 in 100 ml
- 4.5 Pipete z eno oznako, 10 ml
- 4.6 Erlenmajerice, 250 ml
5. METODA
- 5.1 V 100-mililitrsko čašo se odtehta 10 g (m gram) izdelka, ki vsebuje približno 0,6 g vodikovega peroksida. Vsebina z vodo se prenese v 250-mililitrsko standardno stekleničko, do oznake se dolije voda in premeša.
- 5.2 10 ml raztopine vzorca (5.1) se s pipeto po kapljicah prenese v 250-mililitrsko erlenmajerico (4.6) in se po navedenem vrstnem redu doda 100 ml 2N žveplove kisline (3.1), 20 ml raztopine kalijevega jodida (3.5) in tri kapljice raztopine amonijevega molibdata (3.6).
- 5.3 Nastali jod se takoj titrira z 0,1N raztopine natrijevega tiosulfata (3.4) in tik pred dosegom končne točke se doda nekaj mililitrov raztopine škroba (3.7), ki rabi kot indikator. Poraba 0,1N natrijevega tiosulfata (3.4) se zapiše v mililitrih (V).
- 5.4 Po postopku iz odelkov 5.2 in 5.3 se opravi slepo določanje količine tako, da se 10 ml navedene raztopine nadomesti z 10 ml vode. Zapiše se poraba 0,1N natrijevega tiosulfata pri slepem določanju (V_0 ml).
6. IZRAČUN

Vsebnost vodikovega peroksida v izdelku se izračuna kot masni odstotek (% m/m) po naslednji formuli:

$$\begin{aligned} \%H_2O_2 &= \frac{(V - V_0) \times 1,7008 \times 250 \times 100}{m \times 10 \times 1000} \\ &= \frac{(V - V_0) \times 4,252}{m} \end{aligned}$$

pri čemer je je:

m = količina analiziranega izdelka v gramih (5.1),

V_0 = poraba 0,1N tiosulfatne raztopine v mililitrih pri slepem določanju (5.4),

V = poraba 0,1N tiosulfatne raztopine v mililitrih pri titraciji raztopine vzorca (5.3).

7. PONOVLJIVOST (1)

Pri izdelku, ki vsebuje 6 % m/m vodikovega peroksida, razlika med rezultati dveh določanj količine, ki sta bili opravljena vzporedno in na istem vzorcu, ne bi smela presegati absolutne vrednosti 0,2 %.

(1) Glej ISO 5725.

II. IDENTIFIKACIJA IN POLKVANTITATIVNO DOLOČANJE KOLIČINE NEKATERIH OKSIDACIJSKIH BARVIL V BARVAH ZA LASE

1. NAMEN IN PREDMET UPORABE

Ta metoda je ustrezna za identifikacijo in polkvantitativno določanje količine naslednjih spojin v barvilih za lase v obliki kreme ali tekočine:

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

2. PRINCIP

Oksidacijska barvila se iz barv ekstrahirajo pri pH 10 s 96-odstotnim etanolom v obliki kreme ali tekočine in se identificirajo s tankoplastno kromatografijo, ki je bodisi eno- ali dvodimenzionalna.

Za polkvantitativno določanje količine teh spojin se s štirimi sistemi za razvijanje kromatogram vzorcev primerja s kromatogrami referenčnih spojin, ki se izdelajo sočasno in pod pogoji, čimbolj podobnimi pogojem za vzorce.

3. REAGENTI

Vsi reagenti morajo biti analitsko čisti.

- 3.1 Etanol, brezvodni
- 3.2 Aceton
- 3.3 Etanol, 96 % v/v
- 3.4 Raztopina amoniaka, 25 % ($d_4^{20} = 0,91$) = 0,91)

- 3.5 L(+)-askorbinska kislina
- 3.6 Kloroform
- 3.7 Cikloheksan
- 3.8 Dušik, tehnično čist
- 3.9 Toluen
- 3.10 Benzen
- 3.11 n-butanol
- 3.12 Butan-2-ol
- 3.13 Hipofosforna kislina, 50-odstotna v/v raztopina
- 3.14 Diazo reagent. Ali:
- 3-nitro-1-benzendiazonijev naftalenbenzoat (v obliki stabilizirane soli) kakor pri Red 2 JN – Francolor,
 - 2-kloro-4-nitro-1-benzendiazonijev naftalenbenzoat (v obliki stabilizirane soli) kakor pri NNCD reagenta - referenčna št. 74 150 FLUKA,
- ali ekvivalent.
- 3.15 Srebrov nitrat
- 3.16 p-dimetilaminobenzaldehid
- 3.17 2,5-dimetilfenol
- 3.18 Železov klorid heksahidrat
- 3.19 Klorovodikova kislina, 10-odstotna m/v raztopina
- 3.20 **Referenčne spojine**
- Referenčne spojine so tiste, ki so bile prikazane v odstavku 1 „Namen in področje uporabe“. Pri aminskih spojinah mora biti referenčna spojina klorovodikova kislina (mono- ali di-) ali pa prosta baza.
- 3.21 **Referenčne raztopine, 0,5 % (m/v)**
- 0,5-odstotna (m/v) raztopina se pripravi iz vsake referenčne spojine iz oddelka 3.20.
- V standardno 10-mililitrsko stekleničko se odtehta 50 mg ± 1 mg referenčne spojine.
- Doda se 5 ml 96-odstotnega etanola (3.3) in 250 mg askorbinske kisline (3.5).
- Raztopina se naredi alkalna z dodatkom raztopine amoniaka (3.4), s čimer se dobi navidezni pH 10 (preskus z indikatorskim papirjem).
- Do oznake 10 ml se dolije 96-odstotni etanol (3.3) in se premeša.
- Raztopine se morajo hraniti en teden na hladnem in proč od svetlobe.
- V nekaterih primerih lahko po dodatku askorbinske kisline in amoniaka nastane oborina. Pred nadaljevanjem postopka je treba pustiti, da se usede.
- 3.22 **Topila za razvijanje**
- 3.22.1 Aceton – kloroform – toluen (35: 25: 40 v prostorninskih deležih)
- 3.22.2 Kloroform – cikloheksan – absolutni etanol – 25-odstotni amoniak (80: 10: 10: 1 v prostorninskih deležih)
- 3.22.3 Benzen – butan-2-ol – voda (50: 25: 25 v prostorninskih deležih). Dobro se pretrese in po ločevanju faz pri sobni temperaturi (od 20 do 25 °C) se uporabi zgornja faza.
- 3.22.4 n-butanol – kloroform – reagent M (7: 70: 23 v prostorninskih deležih). To se previdno loči pri sobni temperaturi in uporabi se spodnja faza.

Priprava reagenta M

Raztopina amoniaka, 25 % (v/v)	24 prostorninskih enot
Hidrofosforna kislina, 50 % (3,13)	1 prostorninska enota
Voda	75 prostorninskih enot

Opomba

Topila za razvijanje, ki vsebujejo amoniak, se morajo tik pred uporabo dobro pretresti.

3.23 Razpršila za indikacijo**3.23.1 Diazo reagent**

Naredi se 5-procentna (m/v) vodna raztopina izbranega reagenta (3.14). Raztopina mora biti sveže pripravljena tik pred uporabo.

3.23.2 Ehrlichov reagent

V 100 ml 10-odstotne (m/v) vodne raztopine klorovodikove kisline (3.19) se raztopita 2 g p-dimetilamino-benzaldehida (3.16).

3.23.3 2,5-dimetilfenol – železov klorid heksahidrat

Raztopina 1: V 100 ml 96-odstotnega etanola (3.3) se raztopi 1 g dimetilfenola (3.17).

Raztopina 2: V 100 ml 96-odstotnega etanola (3.3) se raztopijo 4 g železovega klorida heksahidrata (3.18).

Pri razvijanju se navedeni raztopini razpršujeta posamično, najprej raztopina 1, nato raztopina 2.

3.23.4 Amoniakalni srebrov nitrat

25-odstotni amoniak (3.4) se doda 5-odstotni (m/v) vodni raztopini srebrovega nitrata (3.15), dokler se oborina ne raztopi do konca. Ta reagent se mora pripraviti tik pred uporabo.

Reagent se ne shranjuje.

4. APARATURA**4.1 Običajna laboratorijska oprema za tankoplastno kromatografijo.**

4.1.1 Plastični ali stekleni pokrov, oblikovan tako, da se med nanašanjem lis in njihovim sušenjem kromatografska plošča lahko obda z dušikom. Varovalna metoda je potrebna zato, ker so nekatera barvila občutljiva za oksidacijo.

4.1.2 Mikrobrizga, 10 µl, katere merilna lestvica je razdeljena na 0,2-mikrolitrske stopnje, z ravno prerezano iglo, ali boljše 50-mikrolitrskim avtomatičnim razdeljevalcem, ki je pritrjen na stojalo za kleščice tako, da se plošča lahko postavi pod dušik.

4.1.3 Tanke plošče iz silikonskega gela, pripravljene za uporabo, debele 0,25 mm, velike 20 x 20 cm (Macherey and Nagel, Silica G-HR, ki so postavljene na plastično podporo ali ekvivalent).

4.2 Centrifuga, 4000 obr./min.

4.3 Epruvete za centrifugiranje, 10 ml, s pokrovčki za privijanje, obdanimi s PTFE, ali ekvivalent.

5. POSTOPEK**5.1 Obravnavanje preskusnih vzorcev**

Zavržejo se prvi 2 do 3 cm kreme, ki se iztisnejo iz tube.

V epruveto za centrifugiranje (4.3), poprej izprano z dušikom, se vnesejo naslednje sestavine: 300 mg askorbinske kisline s 3 g kreme ali 3 g homogenizirane tekočine.

Po kapljicah se dodaja 2-procentni amoniak (3.4), dokler se ne doseže pH-vrednost 10. Do oznake 10 ml se dodaja 96-procentni etanol (3.3).

Homogenizira se pod dušikom (3.8), epruveta se zamaši in nato 10 minut centrifugira pri 4000 obr./min.

Uporabi se supernatantna tekočina.

5.2 Kromatografija

5.2.1 Obarvanje plošč

V dušikovi atmosferi (3.8) se na kromatografsko ploščo (4.1.3) nanese 1 µl vsake od zgoraj navedenih referenčnih raztopin na devet startnih točk, ki so med seboj ločene približno za 1,5 cm vzdolž črte, od roba plošče oddaljene približno 1,5 cm.

Lise referenčnih spojin so urejene, kakor je navedeno:

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

Poleg tega se na točki 10 in 11 nanese TA po 2 µl preskusnih raztopin vzorcev, pripravljenih v skladu z oddelkom 5.1.

Plošča se pusti pod dušikom (3.8), dokler se kromatografija ne konča.

5.2.2 Razvijanje

Plošča se postavi v rezervoar, poprej izpran z dušikom (3.8) in nasičen z enim od štirih topil (3.22), nato pa se pusti, da se razvija pri sobni temperaturi (od 20 do 25 °C) v temi, dokler se črta topila ne premakne za približno 15 cm od startne črte.

Plošča se odstrani in osuši z dušikom (3.8) pri sobni temperaturi.

5.2.3 Razprševanje

Plošča se takoj naprši z eno od štirih raztopin, določenih v 3.23.

5.2.4 Identifikacija

Primerjata se Rf-vrednost in barva, dobljena iz vzorca, s tistima, ki sta bili dobljeni za kromatografirane referenčne spojine.

V tabeli I so primeri Rf-vrednosti in barv, dobljenih za spojine, v odvisnosti od uporabljenih topil in indikatorjev.

Potrditev sumljivih identifikacij se lahko včasih doseže z metodo začinjavanja, tako da se ekstraktu vzorca doda ustrezna referenčna spojina.

5.2.5 Polkvantitativno ocenjevanje

Vizualno se primerja intenzivnost lis za vsako spojino, identificirano v 5.2.4, z ustreznim razponom koncentracij referenčnih spojin.

Če je koncentracija ene ali več spojin, najdenih v vzorcu, prevelika, se ekstrakt vzorca razredči in nato se meritve ponovijo.

TABELA I

Rf-vrednosti in barve, dobljene takoj po pršenju

Referenčna spojina (3.20)	Topila za razvijanje				Razpršila za indikacijo			
	Rf-vrednosti				Rezultantne barve			
	(3.22.1)	(3.22.2)	(3.22.3)	(3.22.4)	Diazo (3.23.1)	Ehrlich (3.23.22)	Dime-tilfenol (3.23.3)	AgNO (3.23.4)
OPD	0,62	0,60	0,30	0,57	bledo rjava	—	—	bledo rjava
MPD	0,40	0,60	0,47	0,48	vijolično-rjava(°)	rumena	bledo rjava	bledo rjava
PPD	0,20	0,50	0,30	0,48	rjava	svetlo rdeča(°)	vijolična	siva
OTD	0,60	0,60	0,53	0,60	rjava(°)	bledo oranžna	bledo rjava	sivkasto rjava
MTD	0,40	0,67	0,45	0,60	rdečkasto rjava(°)	rumena	rjava	črna
PTD	0,33	0,65	0,37	0,70	rjava	oranžna	vijolična(°)	siva
DAP	0,07	—	0	0,05	rjava(°)	oranžna	vijolična	rjava
H	0,50	0,35	0,80	0,20	—	oranžna	vijolična	črna(°)
α-N	0,90	0,80	0,90	0,75	oranžno rjava	—	vijolična(°)	črna
P	0,37	—	0,67	0,05	rjava	zelo bledo vijolična	zelo bledo rjava	rjava(°)
R	0,50	0,37	0,80	0,17	oranžna(°)	bledo vijolična	zelo bledo rjava	bledo rjava

Opomba

1. OPD je prikazan le šibko; da se jasno loči od OTD, se mora topilo uporabiti (3.22.3) ločeno.

2. (°)Označuje najboljšo barvo pri razvijanju.

6. PREISKAVE Z DVODIMENZIONALNO TANKOSLOJNO KROMATOGRAFIJO

Predstavljeni postopek za dvodimenzionalno kromatografijo zahteva uporabo dodatnih standardov in reagentov.

6.1 Dodatne referenčne raztopine in spojine

6.1.1 β-naftol (β-N)

6.1.2 2-aminofenol (OAP)

6.1.3 3-aminofenol (MAP)

6.1.4 4-aminofenol (PAP)

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

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

Prilavi se 0,5-odstotna m/v raztopina iz vsake od dodatnih referenčnih spojin, kakor je opisano v 3.21.

6.2 Dodatna topila za razvijanje

6.2.1 Etilni acetat – cikloheksan – raztopina amoniaka, 25 % (65: 30: 0,5 v prostorninskih deležih)

6.3 Dodatni indikacijski sistemi

V rezervoar za razvijanje za tankoplastno kromatografijo se postavi steklena posoda, dodata se približno 2 g kristaliziranega joda in rezervoar se zapre z ustreznim pokrovom.

6.4 Kromatografija

- 6.4.1 Na absorpcijski strani tanke plošče (4.1.3) se narišeta dve črti, kakor je prikazano na sliki 1.
- 6.4.2 V dušikovi atmosferi (4.1.1) se na startno točko 1, ki je 2 cm od obeh robov (slika 1), nanesejo 1 do 4 μ l ekstrakta (5.1). Količina ekstrakta je odvisna od intenzivnosti lis na kromatogramih 5.2.
- 6.4.3 Na točki 2 in 3 (slika 1) se v enakih količinah nanesejo oksidacijska barvila, ki so bila identificirana ali se zanje predvideva, da so bila identificirana po 5.2 (razdalja med točkama je 1,5 cm). Naneseta se tudi 2 μ l vsake referenčne raztopine - razen DAP, ki se je nanese 6 μ l. Postopek se opravi pod dušikom (6.4.2).
- 6.4.4 Postopek iz 6.4.3 se ponovi na osnovnih točkah 4 in 5 (slika 1) in plošča se pusti pod dušikom do konca kromatografije (razdalja med točkama je 1,5 cm).
- 6.4.5 Kromatografska kad se prepriha z dušikom (3.8) in se napolni z ustrezno količino topila za razvijanje 3.22.2. Plošča (6.4.4) se postavi v kad in se v temi razvija v prvi smeri elucije (slika 1).
Eluira se, dokler črta topila ne doseže črte, zaznamovane na plošči (približno 13 cm).
- 6.4.6 Plošča se odstrani iz kadi in se postavi v kromatografsko kad, ki je bila poprej preprihana z dušikom, da bi se tako izparilo topilo za elucijo, vsaj za 60 minut.
- 6.4.7 Ustrezna količina topila za elucijo (6.2) v epruveti z začrtano merilno lestvico se postavi v kad, preprihana z dušikom (3.8), plošča, ki se zavrti za 90°, se postavi v kad (6.4.6) in opravi se kromatografija v drugi smeri (prav tako v temi), dokler črta topila ne doseže črte, zarisane na absorpcijski strani. Plošča se nato odstrani iz kadi in topilo za elucijo se izpari v zrak.
- 6.4.8 Plošča se za 10 minut postavi v kromatografsko kad z jodovimi hlapi (6.3) in dvosmerni kromatogram se razlaga z Rf- in barvnimi vrednostmi referenčnih spojin, ki se kromatografirajo sočasno (v tabeli II je vodilo za Rf-vrednosti in barve).

Opomba

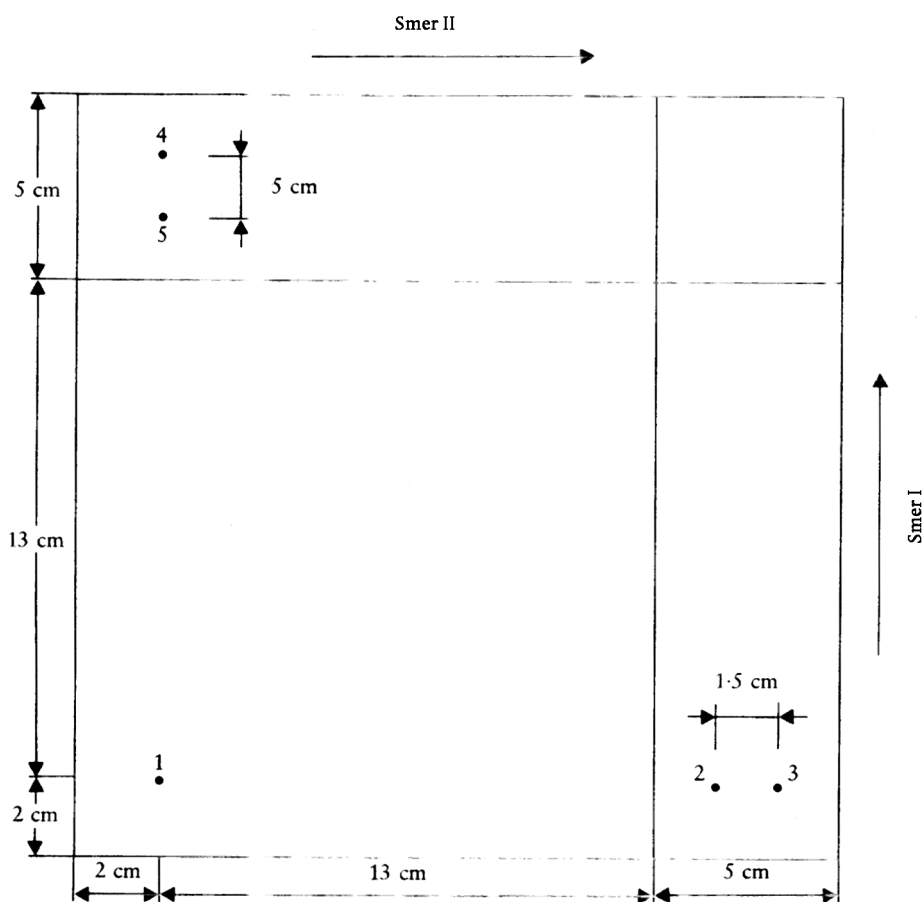
Za doseglo najboljšega obarvanja lis se kromatogram pusti izpostavljen atmosferi približno pol ure po razvijanju.

- 6.4.9. Navzočnost oksidacijskih barvil, ki so bila odkrita v 6.4.8, se lahko nedvomno dokaže s ponavljanjem postopkov, opisanih v 6.4.1 do 6.4.8, in z dodajanjem 1-mikrolitrske referenčne spojine, opredeljene v 6.4.8, na vrh mase ekstrakta, ki je natančno določen v 6.4.2 in je na startni točki 1. Če v primerjavi s kromatogramom, dobljenim v 6.4.8, ni drugih lis, je razlaganje kromatograma 6.4.8 pravilno.

TABELA II
Barva referenčnih spojin po kromatografiji in razvijanju z jodovimi hlapi

Referenčne spojine	Barva po razvijanju z jodovimi hlapi
R	bež
P	rjava
α -N	vijolična
β -N	bledo rjava
H	vijolično-rjava
MPD	rumenkasto rjava
PPD	vijolično-rjava
MTD	temno rjava
PTD	rumenkasto rjava
DAP	temno rjava
OAP	oranžna
MAP	rumenkasto rjava
PAP	vijoličasto-rjava
2-NPPD	rjava
4-NOPD	oranžna

Slika 1



III. IDENTIFIKACIJA IN DOLOČANJE KOLIČINE NITRITA

A. IDENTIFIKACIJA

1. NAMEN IN PODROČJE UPORABE

Metoda je ustrezna za identifikacijo nitrita v kozmetičnih izdelkih, še posebej kremah in pastah.

2. PRINCIP

Navzočnost nitrita se pokaže z nastankom obarvanih derivatov z 2- aminobenzaldehid fenilhidrazonom (nitrin®).

3. REAGENTI

Vsi reagenti morajo biti analitsko čisti.

3.1 Razredčena žveplova kislina: 2 ml koncentrirane žveplove kisline ($(d_4^{20} = 1,84) = 1,84$) se razredčita z 11 ml destilirane vode.

3.2 Razredčena klorovodikova kislina: 1 ml koncentrirane klorovodikove kisline ($(d_4^{20} = 1,19) = 1,19$) se razredči z 11 ml destilirane vode.

3.3 Metanol

3.4 Raztopina 2-aminobenzaldehid fenilhidrazona (nitrin ® reagent) v metanolu.

Odehta se 2,0 g Nitrina® in se kvantitativno prenese v 100-mililitrsko standardno bučko. Po kapljicah se dodajo 4 ml raztopljenе klorovodikove kisline (3.2) in to se pretrese. Do oznake se dopolni z metanolom in premeša, dokler raztopina ne postane popolnoma jasna. Raztopino hraniti v stekleničko iz rjavega stekla (4.3).

4. APARATURA

4.1 Čaše, 50 ml

4.2 Standardne bučke, 100 ml

4.3 Steklenička iz rjavega stekla, 125 ml

4.4 Steklena plošča, 10 x 10 cm

4.5 Plastična lopatica

4.6 Filtrirni papir, 10 x 10 cm

5. POSTOPEK

5.1 Del vzorca, ki naj bi se preiskal, se enakomerno nanese na stekleno ploščo (4.4), tako da površina prevleke ni debelejša od 1 cm.

5.2 Pola filtrirnega papirja (4.6) se namoči v destilirano vodo. Nato se položi na vzorec in pritisne navzdol s plastično lopatico (4.5).

5.3 Počaka se približno eno minuto in nato se na sredino filtrirnega papirja nanese:

— dve kapljici razredčene žveplove kisline (3.1),

— zatem se dodata še dve kapljici Nitrinove ® raztopine (3.4).

5.4 Po pet do 10 sekundah se filtrirni papir odstrani in pregleda na dnevni svetlobi. Navzočnost nitrita se pokaže z rdečkasto škrlatnim obarvanjem.

Če je količina nitrita majhna, se rdečkasto škrlatna barva spremeni v rumeno po pet do 15 sekundah. Ta sprememba barve se pri velikih količinah nitrita pokaže po eni ali dveh minutah.

6. OPOMBA

Intenzivnost rdečkasto škrlatne barve in čas, ki preteče do spremembe te barve v rumeno, lahko pokažeta količino nitrita v vzorcu.

B. DOLOČANJE KOLIČINE

1. NAMEN

V postopku je opisano določanje količine nitrita v kozmetičnih izdelkih.

2. OPREDELITEV

Določanje količine nitrita v vzorcu se v skladu s to metodo izrazi v masnih odstotkih natrijevega nitrita.

3. PRINCIP

Po razredčenju vzorca z vodo in razbistritvi se nitrit zreagira s sulfanilamidom in N-1-naftiletlenamidom, nato pa se izmeri optična gostota nastale barve pri 538 nm.

4. REAGENTI

Vsi reagenti morajo biti analitsko čisti.

4.1 Reagenti za razbistritev: ti reagenti se ne smejo uporabljati več kakor en teden po njihovi pripravi.

4.1.1 Reagent Carrez I:

106 g kalijevega cianoferata (II) $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ se raztopi v destilirani vodi in razredči z vodo do končne prostornine 1 000 ml.

4.1.2 Reagent Carrez II:

219,5 g cinkovega acetata, $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$, in 30 ml led-očetne kisline se raztopi v destilirani vodi in razredči z vodo do končne prostornine 1 000 ml.

4.2 Raztopina natrijevega nitrita:

V 1 000-mililitrski merilni bučki se raztopi 0,500 g natrijevega nitrita v destilirani vodi in razredči z vodo do oznake na bučki. 10,0 ml te raztopine se nato razredči do 500 ml; 1 ml te spojine = 10 mikrogramov $NaNO_2$.

4.3 1N raztopina natrijevega hidroksida

4.4 0,2-odstotna raztopina sulfanilamidnega hidroklorida:

S segrevanjem se raztopi 2,0 g sulfanilamida v 800 ml vode. Raztopina se ohladi in ob mešanju se doda 100 ml koncentrirane klorovodikove kisline. Z vodo se razredči do končne prostornine 1 000 ml.

4.5 5N klorovodikova kislina

4.6 Reagent N-1-naftil:

Ta raztopina se mora pripraviti na dan uporabe. V vodi se raztopi 0,1 g N-1-naftiletlenidiamin dihidroklorida in raztopina se nato razredči z vodo do 100 ml.

5. APARATURA

5.1 Analitska tehtnica

5.2 Merilne bučke, 100, 250, 500 in 1 000 ml

5.3 Polnilne ali merilne pipete

- 5.4 Merilni valj, 1 000 ml
- 5.5 Nagubani filtrirni papirji, brez nitrita, s premerom 15 cm
- 5.6 Vodna kopel
- 5.7 Spektrofotometer s kivetami z 1-centimetrsko dolžino poti
- 5.8 pH-meter
- 5.9 Mikrobireta, 10 ml
- 5.10 Čaše, 250 ml
6. POSTOPEK
- 6.1 Na 0,1 mg natančno se odtehta 0,5 g (m gram) homogeniziranega vzorca in se skupaj z destilirano vodo kvantitativno prenese v 250-mililitrsko čašo (5.10) ter se nato prostornina poveča s toplo destilirano vodo na približno 150 ml. Čaša (5.10) se za pol ure postavi v vodno kopel (5.6) pri 80 °C. Vsebina se medtem občasno pretrese.
- 6.2 Raztopina se ohladi na sobno temperaturo in v navedenem vrstnem zaporedju se ob stalnem mešanju dodata 2 ml reagenta Carrez I (4.1.1) in 2 ml reagenta Carrez II (4.1.2).
- 6.3 Doda se 1N raztopina natrijevega hidroksida (4.3), da se nastavi pH na 8,3. (Uporabi se pH-meter (5.8).) Vsebina se kvantitativno prenese v 250-mililitrsko merilno bučko (5.2) in do oznake se dolije destilirana voda.
- 6.4 Vsebina se zmeša in filtrira skozi nagubani filtrirni papir (5.5).
- 6.5 V 100-mililitrsko merilno bučko (5.2) se odpipetira (5.3) ustrezní alikvot (V ml) čistega filtrata, količina naj ne presegá 25 ml, in se do skupne prostornine 60 ml dolije destilirana voda.
- 6.6 Po mešanju se doda 10,0 ml raztopine sulfanilamidnega hidroklorida (4.4) in nato 6,0 ml 5N klorovodikove kisline (4.5). Premeša se in pusti stati pet minut. Doda se 2,0 ml N-1-naftilnega reagenta (4.6), se premeša in pusti stati tri minute. Z vodo se razredči do oznake in premeša.
- 6.7 Pripravi se slepi preskus tako, da se postopka 6.5 in 6.6 ponovita brez dodajanja N-1-naftilnega reagenta (4.6).
- 6.8 Izmeri se (5.7) optična gostota raztopine, dobljene po 6.6, pri 538 nm in se kot referenca uporabi slepa raztopina (6.7).
- 6.9 Z umeritvenega grafa (6.10) se odčita vsebnost natrijevega nitrita, ki je navedena v mikrogramih na 100 ml raztopine (m_1 mikrogramov) in ustreza optični gostoti, izmerjeni v 6.8.
- 6.10 Pripravi se umeritveni graf za koncentracije 0, 20, 40, 60, 80 in 100 µg natrijevega nitrita na 100 ml tako, da se uporabi 10 µg na ml raztopine natrijevega nitrita (4.2).
7. IZRAČUN

Vsebnost natrijevega nitrita v vzorcu se izračuna v masnih odstotkih po naslednji formuli:

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

pri čemer je:

m = masa vzorca, odvzetega za analizo, v gramih (6.1),

m_1 = količina natrijevega nitrita, v mikrogramih, odkritega v 6.9,

V = število mililitrov filtrata, uporabljenega za meritve (6.5).

8. PONOVLJIVOST ⁽¹⁾

Pri vsebnosti 0,2 % m/m natrijevega nitrita razlika med rezultati dveh določanj količine, ki sta bili vzporedno opravljena na istem vzorcu, ne bi smela presežati absolutne vrednosti 0,005 %.

IV. IDENTIFIKACIJA IN DOLOČANJE KOLIČINE PROSTEGA FORMALDEHIDA

1. NAMEN IN PODROČJE UPORABE

Ta metoda opisuje identifikacijo in določanje količine prostega formaldehida. Uporabna je za vse kozmetične izdelke in sestavljena iz treh delov:

1.1 Identifikacija

1.2 Določanje količine s pentan-2,4-dionsko kolorimetrijo

Ta metoda ni zadostna, če je formaldehid kombiniran ali polimeriziran kakor pri donorjih formaldehida. Če rezultat presega največjo dovoljeno koncentracijo, mora biti uporabljen naslednji postopek.

1.3 Določanje količine z bisulfiti

Pri tej metodi se ne upošteva formaldehid v večini kombiniranih ali polimernih spojin. Kljub temu so določene nekatere nestabilne kombinacije (na primer heksametilenski tetramin). Poleg tega je merjenje alkalnosti v navzočnosti puferske spojine težavno.

2. OPREDELITEV

Količina prostega formaldehida v vzorcu se v skladu z določanjem po tem postopku izrazi kot masni odstotek.

3. PRINCIP

3.1. I. del – Identifikacija

Navzočnost formaldehida v mediju žveplove kisline povzroči spremembo barve Schiffovega reagenta v rožnato ali slezenasto.

3.2. II. del – Določanje količine s pentan-2,4-dionom

Formaldehid reagira s pentan-2,4-dionom v navzočnosti amonijevega acetata in tako sestavlja 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidin. Ta se ekstrahira z butan-1-olom, absorbanca pa se izmeri pri 410 nm.

⁽¹⁾ Glej ISO 5725.

3.3. III. del - Določanje količine z bisulfitom

Formaldehid reagira s sulfitom v kislem mediju pri 0 °C, pri čemer nastane adicijska spojina. Presežek protonov se titrira z natrijevim hidroksidom. Porabljeni protoni oblikujejo podlago za izračun pri določanju količine formaldehida. Slepi preskus brez sulfita omogoča merjenje alkalnosti ali kislosti medija.

4. REAGENTI

Vsi reagenti morajo biti analitsko čisti.

4.1 Led-ocetna kislina**4.2 Brezvodni amonijev acetat****4.3 Butan-1-ol****4.4 Žveplova kislina, približno 2N****4.5 Sveže pripravljena 0,1 M raztopina natrijevega sulfita****4.6 Schiffov reagent; 100 mg fuksina se odmeri v čašo in se raztopi v 75 ml vode pri 80 °C.**

Po ohladitvi se doda 2,5 g natrijevega sulfita heptahidrata ($\text{Na}_2\text{SO}_3 \times 7\text{H}_2\text{O}$) in 1,5 ml koncentrirane klorovodikove kisline ($d_4^{20} = 1,19$) = 1,19). Do 100 ml se dolije voda.

(Po dveh tednih ta reagent ni več primeren za uporabo.)

4.7 Reagent pentan-2,4-dion

V 1 000-mililitrski merilni bučki se raztopi:

150 g amonijevega acetata (4.2),

2 ml pentan-2,4-diona (sveže destilirane pod znižanim tlakom – ne sme kazati absorpcije pri 410 nm),

3 ml led-ocetne kisline (4.1).

Do 1 000 ml se dolije voda (pH raztopine je približno 6,4).

Ta reagent mora biti sveže pripravljen.

4.8 Standardna raztopina žveplove kisline, 0,1N**4.9 Standardna raztopina natrijevega hidroksida, 0,1N****4.10 Raztopina joda, 0,1N****4.11 Natrijev tiosulfat, 0,1N****4.12 Osnovna raztopina formaldehida**

5g od 37- do 40-odstotne raztopine formaldehida se zlije v 1 000-mililitrsko merilno bučko in do prostornine 1 000 ml se doda voda.

Določi se jakost te raztopine po naslednjem postopku: Odstrani se 10,00 ml raztopine; doda 25,00 ml standardne 0,1N raztopine joda (4.10) in 10 ml 1N raztopine natrijevega hidroksida.

Pusti se stati pet minut.

Doda se 11 ml 1N HCl in z raztopino škroba, ki rabi kot indikator, se presežna standardna 0,1N raztopina joda (4.10) titrira s standardno 0,1N raztopino tiosulfata (4.11).

1 ml 0,1N raztopine joda (4.10) je ekvivalenten 1,5 mg formaldehida.

4.13 Referenčna raztopina formaldehida

Odpipetira se 5,00 ml osnovne raztopine (4.12) v 100-mililitrsko merilno bučko in se do 100 ml doda demineralizirana voda.

5,00 ml zgoraj opredeljene raztopine se odkapa v 500-mililitrsko merilno bučko in do 500 ml se doda demineralizirana voda.

1 ml te raztopine vsebuje približno 1 µg formaldehida.

Izračuna se točna količina.

4.14 Raztopina timoftalena, 0,1 g/100 ml 50 % etanola**4.15 Referenčna raztopina reagenta: kakor reagent 4.7, toda brez pentan-2,4-diona****5. APARATURA****5.1 Standardna laboratorijska aparatura****5.2 Filter za ločevanje faz, whatman 1 PS (ali ekvivalent)****5.3 Centrifuga**

- 5.4 Spektrofotometer
- 5.5 Kivete z optično potjo 1 cm
- 5.6 Potenciometer z avtomatičnim zapisovalnikom grafa
- 5.7 Steklene/kalomelne elektrode (priporoča se uporaba posebnih, nizko-temperaturnih elektrod)
6. POSTOPEK
- 6.1 **Identifikacija**
- 6.1.1 2 g preskusnega vzorca se odmerita v 10-mililitrsko čašo.
- 6.1.2 Dodata se dve kapljici 2N žveplene kisline (4.4) in 2 ml Schiffovega reagenta (4.6) (ta reagent mora biti ob uporabi popolnoma brezbarven).
- Preprese se in pusti stati pet minut.
- 6.1.3 Če se v petih minutah opazi rožnato ali slemenasto obarvanje, potem je formaldehid navzoč v presežku 0,01 %, količina pa se določi s postopkom 6.2, po potrebi pa tudi s postopkom 6.3.
- 6.2 **Določanje količine s pentan-2,4-dionsko kolorimetrijo**
- 6.2.1 *Raztopina vzorca*
- 6.2.1.1 V 100-mililitrsko merilno čašo se odtehta 0,001 g (m v gramih) preskusnega vzorca, kar ustreza predvideni količini formaldehida, ki znaša približno 150 mikrogramov.
- 6.2.1.2 Do 100 ml se dolije demineralizirana voda in se premeša.
- 6.2.1.3 V 50-mililitrsko erlenmajerico se doda:
- 10,00 ml raztopine iz 6.2.1.2,
- 5,00 ml reagenta pentan-2,4-dion (4.7),
- demineralizirana voda do končne prostornine 30 ml.
- 6.2.2 *Referenčna raztopina*
- Možne interference zaradi barve ozadja v preskusnem vzorcu se odstranijo z uporabo referenčne raztopine.
- V 50-mililitrsko erlenmajerico se doda:
- 10,00 ml raztopine iz 6.2.1.2,
- 5,00 ml referenčne raztopine reagenta (4.15),
- demineralizirana voda do končne prostornine 30 ml.
- 6.2.3 *Slepa raztopina*
- V 50-mililitrsko erlenmajerico se doda:
- 5,00 ml reagenta pentan-2,4-dion (4.7),
- demineralizirana voda do končne prostornine 30 ml.
- 6.2.4 *Določanje količine*
- 6.2.4.1 Steklениčke iz 6.2.1.3, 6.2.2 in 6.2.3 se preresejo in se nato potopijo v vodno kopel pri 60 °C za natanko 10 minut. Steklениčke naj se v kopeli ali vodi z ledom hladijo dve minuti.

- 6.2.4.2 V 50-mililitrske ločevalne lije, ki že vsebujejo 10,00 ml butan-1-ola (4.3), se prenesejo zgoraj navedene raztopine. Vsaka steklenička se spere s 3 do 5 ml vode in se nato namesti v lije. Mešanica se močno pretresa natančno 30 sekund. Pusti se, da se ločijo posamezne faze.
- 6.2.4.3 V kivete se to potem filtrira skozi filter za ločevanje faz. Centrifugiranje (5 minut pri 5000 obr./min) ni tako praktično in traja dlje.
- 6.2.4.4 Izmeri se optična gostota A_1 pri 410 nm izvlečka iz 6.2.1.3 v primerjavi z ekstraktom referenčne raztopine iz 6.2.2.
- 6.2.4.5 Podobno se izmeri ekstrakt slepe raztopine iz 6.2.3 glede na butan-1-ol (A_2).

Opomba

Vsi navedeni postopki morajo biti opravljeni v 25 minutah od trenutka, ko erlenmajerice postavimo v vodno kopel pri 60 °C.

6.2.5 Umeritvena a krivulja

- 6.2.5.1 V 50-mililitrsko erlenmajerico se vnese:

5,00 ml standardne raztopine (4.13),

5,00 ml reagenta pentan-2,4-dion (4.7),

demineralizirana voda do končne prostornine 30 ml.

- 6.2.5.2 Nadaljuje se po postopku iz oddelka 6.2.4.5, izmeri se optična gostota glede na butan-1-ol (4.3).

- 6.2.5.3 Postopek se ponovi z 10, 15, 20 in 25 ml standardne raztopine.

- 6.2.5.4 Da bi se dobila ničta vrednost, se nadaljuje po postopku iz 6.2.4.5.

- 6.2.5.5 Po odštevanju ničta vrednosti (6.2.4.5) od vsake optične gostote, dobljene v 6.2.5.2 in 6.2.5.3, se izdela umeritvena krivulja. Beerov zakon je veljaven do količine 30 µg formaldehida.

6.3 Določanje količine z bisulfitom

6.3.1 Priprava preskusnega vzorca

6.3.1.1 Za preskus

V čašo, premazano s smolo, se čimbolj natančno 0,001g odtehta količina preskusnega vzorca (m gramov), kar ustreza predvideni količini med 3 in 20 mg formaldehida.

6.3.1.2 Za referenčni preskus

Podobno se stehta tudi referenčni preskusni vzorec (m gramov).

6.3.2 Določanje količine

- 6.3.2.1 V 100-mililitrsko čašo se vnese 50,00 ml 0,1M natrijevega sulfita (4.5) in doda 10,00 ml 0,1N žveplove kisline (4.8). Nato se pretrese.

- 6.3.2.2 Čaša se potopi v mešanico ledu in soli, da se tako vzdržuje temperatura celote pri + 2 °C. Vsebina se odlije v preskusni vzorec 6.3.1.1.

- 6.3.2.3 S potenciometrijo se ob nenehnem stresanju hitro titrira z 0,1N natrijevim hidroksidom (4.9), medtem ko se vzdržuje temperatura med + 2 °C in + 4 °C (nevtralna točka leži med pH 9 in 11). Naj bo V_1 prostornina 0,1N uporabljenega natrijevega hidroksida (4.9).

6.3.3 *Slepi preskus*

Nitrira se dodatno pripravljena raztopina kakor v 6.3.2.1, pod pogoji iz 6.3.2.

Naj bo V_2 prostornina 0,1N uporabljenega natrijevega hidroksida (4.9).

6.3.4 *Referenčni preskus*

Določi se kislost ali bazičnost vzorca s potenciometrično titracijo z 0,1N natrijevim hidroksidom (4.9) ali 0,1N žveplovo kislino (4.8) v preskusnem vzorcu m' . Naj bo v' prostornina uporabljenega 0,1N natrijevega hidroksida ali 0,1N žveplove kisline.

6.3.5 *Opombe*

Pomembno je dosledno opazovanje preskusnih pogojev.

Določanje količine je možno tudi v navzočnosti timolftalena (4.14) kot indikatorja.

7. PREDSTAVITEV REZULTATOV

7.1 **Izračun za kolorimetrično metodo**

7.1.1 Od A_1 se odšteje A_2 in z umeritvene krivulje (6.2.5.5) se odčita količina C_1 formaldehida v preskusni raztopini (6.2.1.3) v mikrogramih.

7.1.2 Izračuna se vsebnost formaldehida v vzorcu v obliki masnih odstotkov (% m/m) po naslednji formuli:

$$\text{količina formaldehida v \%} = \frac{C}{10^3 \times m}$$

7.2 **Izračun za metodo titracije z bisulfitom**

Primerja se prostornina 0,1N natrijevega hidroksida (4.9) ali 0,1N žveplove kisline (4.8), uporabljene pri referenčnem preskusu, z maso m :

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

Pri nevtralnem izdelku je v seveda nič.

7.2.1 Pri kislem izdelku:

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

7.2.2 Pri alkalnem izdelku:

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

7.3 **Opomba**

Če se rezultata obeh metod razlikujeta, se upošteva le nižja vrednost.

8. PONOVLJIVOST ⁽¹⁾

Pri 0,2-odstotni vsebnosti formaldehida razlika med rezultatoma dveh določanj količine, ki sta bili opravljena vzporedno na istem vzorcu, za kolorimetrično metodo ne bi smela presežati 0,005 %, za bisulfitno metodo pa 0,05 %.

⁽¹⁾ Glej ISO 5725.

V. DOLOČANJE KOLIČINE RESORCINOLA V ŠAMPONIH IN LOSJONIH ZA LASE

1. NAMEN IN PODROČJE UPORABE

Ta metoda natančno določa način določanja količine resorcinola s plinsko kromatografijo v šamponih in losjonihi za lase. Postopek je ustrezen za koncentracije od 0,1 do 2,0 masnih odstotkov vzorca.

2. OPREDELITEV

Vsebnost resorcinola v vzorcu se s to metodo določa kot masni odstotek.

3. PRINCIP

Resorcinol in 3,5-dihidroksitoluen (5-metilresorcinol), ki se doda kot interni standard, se ločita od vzorca s tankoplastno kromatografijo. Oba vzorca se ločita s strganjem njunih madežev s tanke plošče in z ekstrakcijo z metanolom. Nazadnje se ekstrahirane spojine posušijo, silirajo in kvantitativno določijo s plinsko kromatografijo.

4. REAGENTI

Vsi reagenti morajo biti analitsko čisti.

4.1 25-odstotna klorovodikova kislina (m/m)

4.2 Metanol

4.3 96-odstotni etanol (v/v)

4.4 Že narejene TLC pole silika gela (plastične ali aluminijaste) s fluorescentnim indikatorjem. Deaktivacija se opravi takole: običajne, že obdane silikonske pole se napršijo z vodo, dokler niso glazirane. Napršene plošče se pustijo posušiti na zraku pri sobni temperaturi, kar traja od ene ure do treh ur.

Opomba

Če se plošče ne deaktivirajo, se lahko pokažejo izgube resorcinola zaradi ireverzibilne adsorpcije na površino silike.

4.5 Topilo za razvijanje; aceton – kloroform – očetna kislina (20: 75: 5 v prostorninskih deležih).

4.6 Standardna raztopina resorcinola; 400 mg resorcinola se raztopi v 100 ml 96-odstotnega etanola (4.3) (1 ml ustreza 4000 µg resorcinola).

4.7 Raztopina internega standarda; 400 mg 3,5-dihidroksitoluena (DHT) se raztopi v 100 ml 96-odstotnega etanola (4.3) (1 ml ustreza 4000 µg DHT).

4.8 Standardna mešanica; 10 ml raztopine 4.6 in 10 ml raztopine 4.7 se zmeša v 100-mililitrski merilni bučki in do oznake se dolije 96-odstotni etanol (4.3) ter premeša (1 ml ustreza 400 µg resorcinola in 400 µg DHT).

4.9 Reagenti za siliranje:

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

4.9.2 Heksametildisilazan (HMDS)

4.9.3 Trimetilklorosilan (TMCS)

5. APARATURA

5.1 Običajna oprema za tankoplastno in plinsko kromatografijo

5.2 Steklovina

6. POSTOPEK

6.1 **Priprava vzorca**

6.1.1 V 150-mililitrsko čašo se natančno odtehta preskusni delež (m gramov) izdelka, ki vsebuje približno 20 do 50 mg resorcinola.

6.1.2 Nakisa se s klorovodikovo kislino (4.1), dokler mešanica ne postane kisla (potrebujemo približno 2 do 4 ml), doda se 10 ml (40 mg DHT) raztopine internega standarda (4.7) in se premeša. V 100-mililitrsko merilno bučko se prenese navedena mešanica z etanolom (4.3), do oznake se dolije etanol in se premeša.

6.1.3 Kot neprekinjeno črto dolžine približno 8 cm se nanese 250 µl raztopine (6.1.2) na deaktivirano silikonsko polo (4.4). Treba je poskrbeti, da bo črta čim tanjša.

6.1.4 Na isto ploščo in enako (6.1.3) se nanese tudi 250 µl standardne raztopine (4.8).

6.1.5 Na dve točki startne črte se nanese 5 µl vsake od raztopin 4.6 in 4.7, kar naj bi pomagalo pri lokalizaciji po razvijanju plošče.

6.1.6 Plošča se razvija v posodi (nenasičeni), napolnjeni s topilom za razvijanje 4.5, dokler črta topila ne doseže linije, ki je 12 cm oddaljena od startne črte; to navadno traja 45 minut. Plošča se posuši na zraku in pod UV-svetlobo (254 nm) se lokalizira cona resorcinola/DHT. Ti dve spojini imata približno enaki vrednosti R_f . Lise se označijo s svinčnikom 2 mm od zunanje temne meje lis. Te cone se odstranijo in adsorbent vsakega madeža se zbere v 10-mililitrsko stekleničko.

6.1.7 Izločita se adsorbent, ki vsebuje vzorec, in adsorbent, ki vsebuje standardno mešanico vsakega, po naslednjem postopku:

doda se 2 ml metanola (4.2) in se ekstrahira eno uro ob nenehnem mešanju. Mešanica se filtrira in nadaljnjih 15 minut se ponavlja ekstrakcija z 2 ml metanola.

6.1.8 Ekstrakti se združijo in topilo se odhlapi s sušenjem čez noč v vakuumskem sušilcu, ki je napolnjen z ustreznim sušilom. Pri tem se ne uporablja toplota.

6.1.9 Ostanki (6.1.8) se silirajo, kakor je opredeljeno v 6.1.9.1 ali 6.1.9.2.

6.1.9.1 Z mikrobrizgo se doda 200 µl BSTFA (4.9.1.) in mešanica se pusti v zaprti posodi 12 ur pri sobni temperaturi.

6.1.9.2 V opisanem zaporedju se z mikrobrizgo doda 200 µl HMDS (4.9.2) in 100 µl TMCS (4.9.3) in nato se mešanica segreva 30 minut pri 60 °C v zaprti posodi. Mešanica se ohladi.

6.2 **Plinska kromatografija**

6.2.1 *Pogoji za kromatografijo*

Kolona mora omogočiti ločljivost R, ki je enaka ali večja od 1,5, pri čemer je:

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

pri tem:

r_1 in r_2 = retenzijska časa dveh vrhov v minutah,

w_1 in w_2 = širini istih vrhov na polovici višine v mm,

d' = hitrost diagrama (papierja) v mm na minuto.

Za ustrezne so bili ugotovljeni naslednji pogoji za kolonsko in plinsko kromatografijo:

Kolona	material:	nerjaveče jeklo
	dolžina:	200 cm
	notranji premer:	~ 3 mm
	polnilo:	10 % OV-17 na Chromosorbu WAW 100 do 120 <u>meshov</u>

Plamensko-ionizacijski detektor

Temperature:

kolona: 85 °C (izotermično)

detektor: 250 °C

injekcijski vhod: 250 °C

Nosilni plin: dušik

pretok: 45 ml/min.

Pri nastavitvi pretoka vodika in dušika se sledi navodilom izdelovalca.

- 6.2.2. Vbrizga se 1 do 3 µl raztopin, dobljenih po 6.1.9 v plinskem kromatografu. Opravi se pet injiciranj za vsako raztopino (6.1.9), izmerijo se površine vrhov in izračunajo njihova povprečja in razmerja površin vrhov: $S = \text{površina vrha resorcinola/površina vrha DHT}$.

7. IZRAČUN

Koncentracija resorcinola v vzorcu, izražena kot masni % (% m/m), je dana s formulo:

$$\% \text{resorcinol} = \frac{4}{M} \times \frac{S_{\text{vzorca}}}{S_{\text{standardne mešanice}}}$$

pri čemer je:

M = preskusni delež v gramih (6.1.1),

S_{vzorca} = povprečno razmerje površine vrha glede na 6.2.2 za raztopino vzorca,

$S_{\text{standardne mešanice}}$ = povprečno razmerje površine vrha glede na 6.2.2 za standardno mešanico.

8. PONOVLJIVOST ⁽¹⁾

Pri 0,5-odstotni vsebnosti resorcinola razlika med rezultati dveh določanj količine, opravljenih vzporedno na istem vzorcu, ne bi smela presegati absolutne vrednosti 0,025 %.

VI. DOLOČANJE KOLIČINE METANOLA V RAZMERJU Z ETANOLOM ALI PROPAN-2-OLOM

1. NAMEN IN PODROČJE UPORABE

Metoda opisuje plinsko kromatografsko analizo metanola v vseh vrstah kozmetičnih izdelkov (vključno z razpršili).

Določimo lahko relativne stopnje od 0 do 10 %.

2. OPREDELITEV

Vsebnost metanola se v skladu s to metodo izrazi kot masni odstotek metanola v razmerju z etanolom ali propan-2-olom.

3. PRINCIP

Količina se določi s plinsko kromatografijo.

⁽¹⁾ Glej ISO 5725.

4. REAGENTI

Uporabijo se reagenti analitske čistote.

4.1 Metanol

4.2 Etanol, absolutni

4.3 Propan-2-ol

4.4 Kloroform, ki je po izpiranju z vodo brez alkoholov

5. APARATURA

5.1 Plinski kromatograf:

s katarometričnim detektorjem za vzorce razpršil,

s plamensko-ionizacijskim detektorjem za vzorce, ki niso v obliki razpršil.

5.2 Merilne bučke, 100 ml

5.3 Pipete, 2 ml, 20 ml, od 0 do 1 ml

5.4 Mikrobrizge od 0 do 100 µl in od 0 do 5 µl

in (le za vzorce razpršil) posebne plinsko neprepustne brizge z drsnim ventilom (glej postopek za vzorčenje na sliki 5⁽¹⁾).

6. POSTOPEK

6.1 **Priprava vzorca**

6.1.1 Razpršila se vzorčijo v skladu s poglavjem II Priloge Direktive Komisije 80/1335/EGS z dne 22. decembra 1980⁽¹⁾ in se nato analizirajo s plinsko kromatografijo po pogojih iz 6.2.1.

6.1.2 Izdelki, ki niso v obliki razpršil in se vzorčijo v skladu z zgoraj navedenim poglavjem II, se razredčijo z vodo do 1 do 2-odstotnega etanola ali propan-2-ola, nato pa se analizirajo s plinsko kromatografijo pod pogoji iz 6.2.2.

6.2 **Plinska kromatografija**

6.2.1 Za vzorce razpršil se uporablja katarometrični detektor.

6.2.1.1 Kolona se napolni z 10-odstotnim Hallcomidom M 18 na Chromosorb WAW od 100 do 200 meshov.

6.2.1.2 Kolona mora dati ločljivost R, ki je enaka ali večja od 1,5, pri čemer je:

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

pri tem:

r_1 in r_2 = retenzijska časa dveh vrhov v minutah,

w_1 in w_2 = širini istih vrhov na polovici višine v mm,

d' = hitrost diagrama (papirja) v mm na minuto.

6.2.1.3 Naslednji pogoji omogočajo doseganje te ločljivosti:

Kolona	Material:	nerjaveče jeklo
	dolžina:	3,5 metra
	premer:	3 mm
Tok v mostiču katahometra:		150 mA

⁽¹⁾ UL L 383, 31. 12. 1980, str. 27.

Nosilni plin:	helij
tlak:	2,5 bara
pretok:	45 ml/min
Temperature:	
injekcijski vhod:	150 °C
detektor:	150 °C
peč kolone:	65 °C

Meritve površin vrhov se lahko izboljšajo z elektronsko integracijo.

6.2.2 Za vzorce, ki niso v obliki razpršil:

6.2.2.1 Kolona je napolnjena s Chromosorbom 105 ali Porapakom QS, uporablja pa se plamensko-ionizacijski detektor.

6.2.2.2 Kolona mora dati ločljivost R, ki je enaka ali večja od 1,5, pri čemer je:

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

r_1 in r_2 = retenzijska časa dveh vrhov v minutah,

w_1 in w_2 = širini istih vrhov na polovici višine v mm,

d' = hitrost diagrama v mm na minuto.

6.2.2.3 Ta ločljivost se doseže pri uporabi naslednjih pogojev:

kolona	material:	nerjaveče jeklo
	dolžina:	2 metra
	premer:	3 mm

Občutljivost elektrometra: 8 x 10⁻¹⁰A

Plini:

nosilni:	dušik
tlak:	2,1 bara
pretok:	40 ml/min

Pomožni plin: vodik

tlak:	1,5 bara
pretok:	20 ml/min

Temperature:

injekcijski vhod:	150 °C
detektor:	230 °C
peč kolone:	120 do 130 °C

7. UMERITVENA KRIVULJA

7.1 Za postopek plinske kromatografije 6.2.1 (kolona Hallcomid M 18) se uporabijo naslednje standardne mešanice. Te mešanice se pripravijo z merjenjem s pipetami tako, da se po vsakem dodajanju natančno izmeri teža pipete ali stekleničke.

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

Po pogojih iz 6.2.1 se vbrizgne od 2 do 3 µl v kromatograf.

Izračunajo se razmerja površin vrhov (metanol/etanol) ali (metanol/propan-2-ol) za vsako mešanico. Nariše se umeritvena krivulja z:

X-osjo: % metanola v razmerju z etanolom ali propan-2-olom,

Y-osjo: razmerje površine vrhov (metanol/etanol) ali (metanol/propan-2-ol).

- 7.2 Pri postopku plinske kromatografije 6.2.2 (Porapak QS ali Chromosorb 105) se uporabijo naslednje standardne mešanice. Te mešanice se pripravijo z merjenjem z mikrobrizgo in pipeto, natančne količine pa se ugotovijo s takojšnjim tehtanjem pipete ali stekleničke po vsakem dodajanju.

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

V kromatograf se po pogojih iz 6.2.2 injicira od 2 do 3 μ l.

Izračuna se razmerje površin vrhov (metanol/etanol) ali (metanol/propan-2-ol) vsake mešanice. Nariše se umeritvena krivulja tako, da je:

na X-osi: % metanola v razmerju z etanolom ali propan-2-olom,

na Y-osi: razmerje površine vrhov (metanol/etanol) ali (metanol/propan-2-ol).

- 7.3 Umeritvena krivulja mora biti ravna črta.

8. PONOVLJIVOST ⁽¹⁾

Pri 5-odstotni vsebnosti metanola v razmerju z etanolom ali propan-2-olom razlika med rezultati dveh določanj količine, opravljenih vzporedno na istem vzorcu, ne bi smela presežati 0,25 %.

⁽¹⁾ Glej ISO 5725.