

31985L0490

L 295/30

URADNI LIST EVROPSKIH SKUPNOSTI

7.11.1985

**ČETRТА DIREKTIVA KOMISIJE****z dne 11. oktobra 1985****o približevanju zakonodaj držav članic v zvezi z analiznimi metodami, ki so potrebne za preverjanje sestave kozmetičnih izdelkov**

(85/490/EGS)

KOMISIJA EVROPSKIH SKUPNOSTI JE

ob upoštevanju Pogodbe o ustanovitvi Evropske gospodarske skupnosti,

ob upoštevanju Direktive Sveta 76/768/EGS z dne 27. julija 1976 o približevanju zakonodaje držav članic v zvezi s kozmetičnimi izdelki<sup>(1)</sup>, kakor je bila nazadnje spremenjena z Direktivo 85/391/EGS<sup>(2)</sup>, in zlasti člena 8(1) Direktive,

ker Direktiva 76/768/EGS vzpostavlja uradno preskušanje kozmetičnih izdelkov, da se zagotovi, da so upoštewane zahteve o sestavi kozmetičnih izdelkov, ki so predpisane v določbah Skupnosti;

ker je vse potrebne analize metode treba določiti čim prej; ker so bili trije koraki k doseganju tega cilja že narejeni z opredelitvijo nekaterih metod v Direktivah Komisije 80/1335/EGS<sup>(3)</sup>, 82/434/EGS<sup>(4)</sup> in 83/514/EGS<sup>(5)</sup>, in je četrti korak opredelitev metod za kvalitativno in kvantitativno določanje glicerol 1-(4-aminobenzoata), kvantitativno določanje klorobutanola, kvalitativno in kvantitativno določanje kinina, kvalitativno in kvantitativno določanje anorganskih sulfitov in vodikovih sulfitov, kvalitativno in kvantitativno določanje kloratov alkaljskih kovin ter kvalitativno in kvantitativno določanje natrijevega jodata;

ker so ukrepi, predvideni v tej direktivi, v skladu z mnenjem Odbora za prilagajanje Direktive 76/768/EGS tehničnemu napredku,

SPREJELA NASLEDNJO DIREKTIVO:

**Člen 1**

Države članice sprejmejo vse potrebne ukrepe, s katerimi zagotovijo, da so med uradnim preskušanjem kozmetičnih izdelkov

- identifikacija in določanje količine glicerol 1-(4-aminobenzoata),
  - določanje količine klorobutanola,
  - identifikacija in določanje količine kinina,
  - identifikacija in določanje količine anorganskih sulfitov in vodikovih sulfitov,
  - identifikacija in določanje količine kloratov alkaljskih kovin ter
  - identifikacija in določanje količine natrijevega jodata
- opravljeni v skladu s postopki, opisanimi v Prilogi.

**Člen 2**

Države članice sprejmejo zakone in druge predpise, potrebne za uskladitev s to direktivo, najpozneje do 31. decembra 1986.

O tem takoj obvestijo Komisijo.

**Člen 3**

Ta direktiva je naslovljena na države članice.

V Bruslju, 11. oktobra 1985

Za Komisijo

Stanley CLINTON - DAVIS

Član Komisije

<sup>(1)</sup> UL L 262, 27.9.1976, str. 169.<sup>(2)</sup> UL L 224, 22.8.1985, str. 40.<sup>(3)</sup> UL L 383, 31.12.1980, str. 27.<sup>(4)</sup> UL L 185, 30.6.1982, str. 1.<sup>(5)</sup> UL L 291, 24.10.1983, str. 9.

## PRILOGA

## KVALITATIVNO IN KVANTITATIVNO DOLOČANJE GLICEROL 1-(4-AMINOBENZOATA)

## A. KVALITATIVNO DOLOČANJE

## 1. PODROČJE UPORABE

S to metodo se odkrije alfa-monogliceril-4-aminobenzoat (glicerol 1-(4-aminobenzoat). Odkriti je mogoče tudi etil-4-aminobenzoat (benzokain INN), ki se lahko pojavi kot nečistota.

## 2. PRINCIP

Ta identifikacija se opravi s tankoplastno kromatografijo na silikagelu s fluorescentnim indikatorjem in odkrivanjem proste primarne aminoskupine zaradi nastanka diazobarvila na plošči.

## 3. REAGENTI

Vsi reagenti naj bi bili analitsko čisti.

## 3.1 Topilo(zmes): cikloheksan/propan-2-ol/stabilizirani diklorometan 48/64/9 (v/v/v).

3.2 Topilo za razvijanje: petrolejni eter (40-60)/benzen/acetona raztopina amonijevega hidroksida (najmanj 25 % NH<sub>3</sub>): 35/35/35/1 (v/v/v/v).3.3 Raztopina za razvijanje: (a) natrijev nitrit: 1 g v 100 ml 1 M klorovodikove kisline (pripravljene tik pred uporabo);  
(b) 2-naftol: 0,2 g v 100 ml 1 M kalijevega hidroksida.

## 3.4 Standardne raztopine:

alfa-monogliceril 4-aminobenzoat: 0,05 g v 100 ml mešanega topila 3.1.;

etil 4-aminobenzoat: 0,05 g v 100 ml mešanega topila 3.1.

## 3.5 Silikagel 60 F 254 plošče, debele 0,25 mm, 200 mm x 200 mm.

## 4. APARATURA

## 4.1 Običajna priprava za tankoplastno kromatografijo.

## 4.2 Ultrazvočni vibrator.

## 4.3 Milipore filter FH 0,5 µm ali ekvivalenten.

## 5. POSTOPEK

## 5.1 Priprava vzorca

1,5 g izdelka za analizo se odtehta v 10-mililitrsko stekleničko z zamaškom in merilno oznako. Do oznake se doda topilo 3.1. Steklenička se zamaši in pusti eno uro v ultrazvočnem vibratorju (4.2) pri sobni temperaturi. Filtrira se skozi Milipore filter (4.3) in dobljeni filtrat uporabi za kromatografijo.

## 5.2 Tankoplastna kromatografija

10 µl raztopine vzorca (5.1.) in vsake standardne raztopine (3.4) se položi na ploščo (3.5).

Kromatogram se razvija do višine 150 mm v posodi, ki je bila predhodno nasičena s topilom 3.2. Plošča se pusti posušiti pri sobni temperaturi.

## 5.3 Razvijanje

## 5.3.1 Plošča se opazuje na UV-svetlobi pri 254 nm.

## 5.3.2 Popolnoma osušena plošča se naprši z raztopino 3.3(a).

Pusti se, da se suši 1 minuto pri sobni temperaturi, in se nato takoj naprši z raztopino 3.3(b).

Plošča se posuši v peči pri 60 °C. Pojavijo se lise oranžne barve. Alfa-monogliceril 4-aminobenzoat: R<sub>f</sub> 0,07; etil 4-aminobenzoat: R<sub>f</sub> 0,55.

## B. KVANTITATIVNO DOLOČANJE

## 1. PODROČJE UPORABE

S to metodo se določa količina alfa monogliceril 4-aminobenzoata. Z njo se lahko določi tudi količina etil 4-aminobenzoata. Ne morejo pa se določati količine, ki presežajo 5 % (m/m) alfa monogliceril 4-aminobenzoata in 1 % (m/m) etil 4-aminobenzoata.

## 2. OPREDELITEV

Vsebnost alfa monogliceril 4-aminobenzoata in etil 4-aminobenzoata, ki se izmeri s to metodo, se določi kot masni odstotek (% m/m) v izdelku.

## 3. PRINCIP

Izdelek za analizo se suspendira v metanolu in po ustrezni obdelavi vzorca se določi količina s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC).

## 4. REAGENTI

Vsi reagenti naj bi bili analitsko čisti in primerni za HPLC, kadar je ustrezno.

## 4.1 Metanol.

4.2 Kalijev dihidrogenortofosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ).4.3 Cinkov di(acetat) ( $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ).4.4 Ocetna kislina ( $d \frac{20}{4} = 1.05$ ).4.5 Tetrakalijev heksacianoferat, ( $\text{K}_4(\text{Fe}(\text{CN})_6) \times 3\text{H}_2\text{O}$ ).

## 4.6 Etil 4-hidroksibenzoat.

## 4.7 Alfa monogliceril 4-aminobenzoat.

## 4.8 Etil 4-aminobenzoat.

## 4.9 Raztopina fosfatnega pufra (0,02 M): v litru vode se raztopi 2,72 g kalijevega dihidrogenortofosfata (4.2).

## 4.10 Eluent: raztopina fosfatnega pufra (4.9)/metanol (4.1) 61/39 (v/v).

Sestava mobilne faze se lahko spremeni, da bi se dosegel faktor ločljivosti  $R \geq 1,5$ .

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

pri čemer so:

$R_1$  in  $R_2$  = retenzijska časa vrhov, v minutah,

$W_1$  in  $W_2$  = širine vrhov na polovici višine, v milimetrih,

$d$  = hitrost diagrama v milimetrih na minuto.

4.11 Pripravljena raztopina alfa-monogliceril 4-aminobenzoata: v 100-mililitrsko merilno bučko se natančno odtehta približno 40 mg alfa-monogliceril 4-aminobenzoata. Raztopi se v 40 ml metanola (4.1). Do oznake se dolije puferska raztopina (4.9) in premeša.

4.12 Osnovna raztopina etil 4-aminobenzoata: v 100-mililitrsko merilno bučko se natančno odtehta približno 40 mg etil 4-aminobenzoata. Raztopi se v 40 ml metanola (4.1). Do oznake se dolije puferska raztopina (4.9) in premeša.

4.13 Raztopina internega standarda: natančno se stehta približno 50 mg etil 4-hidroksibenzoata (4.6), prenese v 100-mililitrsko standardno bučko, raztopi v 40 ml metanola (4.1), do oznake se dolije puferska raztopina (4.9) in premeša.

4.14 Standardne raztopine: pripravijo se štiri standardne raztopine z raztapljanjem 100 ml eluenta (4.10) v skladu z naslednjo tabelo:

Standardna raztopina	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

(\*) Te vrednosti so navedene kot indikacija in natančno ustrezajo masam 4.11, 4.12 in 4.13.

Opomba: Te raztopine se lahko pripravijo tudi drugače.

4.15 Raztopina Carrez I: v vodi se raztopi 26,5 g tetrakalijevega heksacianoferata (4.5) in se dopolni do prostornine 250 ml.

4.16 Raztopina Carrez II: v vodi se raztopi 54,9 g cinkovega di(acetata) (4.3) in 7,5 ml očetne kisline (4.4) ter dopolni do prostornine 250 ml.

4.17 Merck Lichrosorb RP-18 ali ekvivalenten s povprečno velikostjo delcev 5  $\mu\text{m}$ .

## 5. APARATURA

5.1 Običajna laboratorijska oprema.

5.2 Oprema za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti z UV-detektorjem z nastavljivo valovno dolžino in termostatično komoro, nastavljeno na 45 °C.

5.3 Kolona iz nerjavečega jekla: dolžina: 250 mm; notranji premer: 4,6 mm; polnilo: Lichrosorb RP-18 (4.17).

5.4 Ultrazvočna kopel.

## 6. POSTOPEK

### 6.1 Priprava vzorca

6.1.1 V 100-mililitrsko čašo se natančno odtehta približno 1 g vzorca in doda 10 ml metanola (4.1).

6.1.2 Čaša se za 20 minut postavi v ultrazvočno kopel (5.4), da se naredi suspenzija. Tako dobljena suspenzija se količinsko prenese v 100-mililitrsko standardno bučko, ki ne vsebuje več kakor 75 ml eluenta (4.10).

V navedenem zaporedju se doda 1 ml raztopine Carrez I (4.15) in 1 ml raztopine Carrez II (4.16) ter premeša po vsakem dodajanju. Do oznake se dolije eluent (4.10), spet premeša in filtrira skozi naguban filtrirni papir.

6.1.3 S pipeto se prenese 3,0 ml filtrata, dobljenega v 6.1.2, in 5,0 ml interne standardne raztopine (4.13) v 50-mililitrsko standardno bučko. Do oznake se dolije eluent (4.10) in premeša. Tako dobljena raztopina se uporabi za kromatografsko analizo, opisano v 6.2.

### 6.2 Kromatografija

6.2.1 Hitrost pretoka mobilne faze (4.10) se nastavi na 1,2 ml/min in temperaturo kolone na 45 °C.

6.2.2 Detektor (5.2) se nastavi na 274 nm.

6.2.3 Z mikrobrizgalko se vsaj dvakrat vbrizga 20  $\mu\text{l}$  raztopine (6.1.3) v kromatograf in izmerijo površine vrhov.

### 6.3 Umeritvena krivulja

6.3.1 Vbrizga se 20  $\mu\text{l}$  vsake standardne raztopine (4.14) in izmeri površina vrha.

6.3.2 Pri vsaki koncentraciji se zračuna razmerje med površinami vrhov alfa-monogliceril 4-aminobenzoata in površinami vrhov internega standarda. Ta razmerja se vnesejo kot vrednosti na absciso, vrednosti ustreznih mas pa na ordinato.

6.3.3 Enako se naredi tudi za etil 4-hidroksibenzoat.

## 7. IZRAČUN

7.1 Z umeritvene krivulje iz 6.3 se odčitajo razmerja mas (RP1, RP2), ki ustrezajo razmerjem med površinami vrhov, zračunanih v 6.2.3, pri čemer je:

RP1 = masa alfa-monogliceril 4-aminobenzoata/masa etil 4-hidroksibenzoata,

RP2 = masa etil 4-aminobenzoata/masa etil 4-hidroksibenzoata.

- 7.2 Iz tako dobljenih razmerij med masami se zračunajo vsebnosti alfa-monogliceril 4-aminobenzoata in etil 4-aminobenzoata kot masni odstotki (% m/m) po formuli:

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

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

q = količina etil 4-hidroksibenzoata (interni standard), stehtanega 4.12, v miligramih,

p = količina vzorca, stehtanega v 6.1.1, v gramih.

8. PONOVLJIVOST <sup>(1)</sup>
- 8.1 Pri 5-odstotni (m/m) vsebnosti alfa-monogliceril 4-aminobenzoata razlika med rezultati dveh vzorednih določanj količine, opravljenih na istem vzorcu, ne bi smela presegati 0,25 %.
- 8.2 Pri 1-odstotni (m/m) vsebnosti etil 4-aminobenzoata razlika med rezultati dveh vzorednih določanj količine, opravljenih na istem vzorcu, ne bi smela presegati 0,10 %.
9. OPOMBE
- 9.1 Pred analizo se preveri, ali morda vzorec vsebuje spojine, ki bi lahko na kromatogramu prekrivale vrh krivulje internega standarda (etil 4-aminobenzoata).
- 9.2 Za preverjanje, da ni nobene interference, se ponovi določanje z 10-odstotno spremembo relativne količine metanola v mobilni fazi.

#### KVANTITATIVNO DOLOČANJE KLOROBUTANOLA

1. PODROČJE UPORABE
- Ta metoda je primerna za določanje količine klorobutanola (INN) do najvišje koncentracije 0,5 % (m/m) v katerem koli kozmetičnem izdelku, razen razpršil.
2. OPREDELITEV
- Vsebnost klorobutanola, zmerjena s to metodo, se izrazi kot masni odstotek (% m/m) izdelka.
3. PRINCIP
- Po ustrezni obravnavi izdelka za analizo se določanje količine opravi s plinsko kromatografijo ob uporabi 2,2,2-trikloroetanola kot internega standarda.
4. REAGENTI
- Vsi reagenti naj bi bili analitsko čisti.
- 4.1 Klorobutanol (1,1,1-trikloro-2-metilpropan-2-ol).
- 4.2 2,2,2-trikloroetanol.
- 4.3 Absolutni etanol.
- 4.4 Standardna raztopina klorobutanola: 0,025 g v 100 ml etanola (4.3) (m/v).
- 4.5 Standardna raztopina 2,2,2-trikloroetanola: 4 mg v 100 ml etanola (4.3) (m/v).
5. APARATURA
- 5.1 Običajna laboratorijska oprema.
- 5.2 Plinski kromatograf z elektronskim detektorjem, Ni 63.
6. POSTOPEK
- 6.1 **Priprava vzorca**
- Natančno se odtehta od 0,1 do 0,3 g (p g) vzorca. Vnese se v 100-mililitrsko merilno bučko. Raztopi se v etanolu (4.3), doda 1 ml interne standardne raztopine (4.5) in do oznake dolije etanol (4.3).

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

## 6.2 Pogoji za plinsko kromatografijo

6.2.1 Pogoji delovanja morajo zagotoviti faktor ločljivosti  $R \geq 1,5$ .

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

pri čemer so:

$R_1$  in  $R_2$  = retenzijska časa vrhov, v minutah,

$W_1$  in  $W_2$  = širini vrhov na polovici višine, v milimetrih,

$d'$  = hitrost diagrama v milimetrih na minuto.

6.2.2 Na primer, naslednji pogoji delovanja predvidevajo zahtevano ločljivost:

Kolona	I	II
Material	Steklo	Nerjaveče jeklo
Dolžina	1,80 m	3 m
Premer	3 mm	3 mm
Stacionarna faza	10 % Carbowax 20 M TPA na Glaschrom Q 80-100 mesh	5 % OV 17 na Chromosorb WAW DMCS 80-100 mesh
Kondicioniranje	od 2 do 3 dni pri 190 °C	
Temperatura:		
– injektor	200 °C	150 °C
– kolona	150 °C	100 °C
– detektor	200 °C	150 °C
Nosilni plin plin	Dušik	Argon/metan (95/5 v/v)
Hitrost pretoka	35 ml/min	35 ml/min

## 6.3 Standardna krivulja

V 100-mililitrske merilne bučke se da 1 ml standardne raztopine (4.5) in 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 in 0,6 ml raztopine 4.4 v navedenem zaporedju ter do oznake doda etanol (4.3) in premeša. V kromatograf se vbrizga 1 µl vsake izmed teh raztopin v skladu s pogoji delovanja iz 6.2.2 in se izdelata umeritvena krivulja tako, da se na abscisno os vnesejo mase klorobutanola glede na maso 2,2,2-trikloroetanolu ter na ordinatno os razmerja ustreznih površin vrhov krivulj.

6.4 Vbrizga se 1 µl raztopine, dobljene v 6.1., in nadaljuje v skladu s pogoji, opisanimi v 6.2.2.

## 7. IZRAČUN

7.1 S standardne krivulje (6.3) se zračuna količina „a“, izražena kot µg klorobutanola v raztopini 6.1.

7.2 Vsebnost klorobutanola v vzorcu se zračuna v skladu s formulo:

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

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

Pri 0,5-odstotni (m/m) vsebnosti klorobutanola razlika med rezultati dveh vzporednih določanj količine, opravljenih na istem vzorcu, ne bi smela presežati 0,01 %.

### Opomba

Če je rezultat enak ali presega največjo dovoljeno koncentracijo, je treba preveriti navzočnost morebitnih motenj.

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

## KVALITATIVNO IN KVANTITATIVNO DOLOČANJE KININA

## A. KVALITATIVNO DOLOČANJE

## 1. PODROČJE UPORABE

Ta metoda je namenjena za odkrivanje kinina v šamponih in losjonih za lase.

## 2. PRINCIP

Identifikacija se opravi s tankoplastno kromatografijo na silikagelu. Odkrivanje kinina se opravi ob modri fluorescenci kinina pri 360 nm v kislih pogojih.

Za nadaljnje potrjevanje rezultatov se fluorescenca lahko odpravi s hlapi broma, amonijevi hlapi pa povzročijo pojavljanje rumene fluorescence.

## 3. REAGENTI

Vsi reagenti naj bi bili analitsko čisti.

3.1 Plošče silikagela brez indikatorjev fluorescence, debele 0,25 mm, 200 x 200 mm.

3.2 Topilo za razvijanje: toluen/dietilni eter/diklorometan/dietilamin, 20/20/20/8 (v/v/v/v).

3.3 Metanol.

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

3.5 Dietileter.

3.6 Reagent za razvijanje: 95 ml dietilnega etra (3.5) v ohlajeni posodi se previdno doda 5 ml žveplove kisline (3.4).

3.7 Brom.

3.8 Raztopina amonijevega hidroksida (28 %;  $d \frac{20}{4} = 0,90$ ).

3.9 Kinin, brezvodni.

3.10 Standardna raztopina: v standardno bučko se natančno odtehta približno 100,0 mg brezvodnega kinina (3.9) in se raztopi v 100 ml metanola (3.3).

## 4. APARATURA

4.1 Običajna oprema za tankoplastno kromatografijo.

4.2 Ultrazvočna kopel.

4.3 Milipore filter, FH 0,5  $\mu$ m ali ekvivalent z ustrezno opremo za filtriranje.

## 5. POSTOPEK

## 5.1 Priprava vzorca

V 100-mililitrsko standardno bučko se natančno odtehta količina vzorca, ki vsebuje približno 100 mg kinina, se raztopi in do oznake dolije metanol (3.3).

Bučka se zamaši in pusti eno uro pri sobni temperaturi v ultrazvočnem vibratorju (4.2). Filtrira se (4.3) in filtrat se uporabi pri kromatografiji.

## 5.2 Tankoplastna kromatografija

1,0  $\mu$ l standardne raztopine (3.10) in 1,0  $\mu$ l raztopine vzorca (5.1) na plošči iz silikagela (3.1). Kromatogram se razvija do razdalje 150 mm s topilom 3.2 v posodi, nasičeni s topilom (3.2).

## 5.3 Razvijanje

5.3.1 Plošča se posuši pri sobni temperaturi.

5.3.2.1 Naprši se z reagentom 3.6.

5.3.3 Plošča se pusti sušiti eno uro pri sobni temperaturi.

5.3.4 Plošča se pogleda pod svetlobo iz UV-svetilke, katere valovna dolžina je 360 nm. Kinin se pri tem opazi kot intenzivno fluorescentna lisa.

Na primer, spodnja tabela kaže vrednosti  $R_f$  za glavne alkaloidne, sorodne kininu, po razvijanju s topilom 3.2.

Alkaloid	$R_f$
Kinin	0,20
Kinidin	0,29
Kinkronin	0,33
Kinkonidin	0,27
Hidrokinidin	0,17

- 5.3.5 Za nadaljnje potrjevanje navzočnosti kinina se plošča za približno eno uro izpostavi hlapom broma (3.7). Pri tem fluorescenca zgine. Ko se ista plošča izpostavi hlapom amoniaka (3.8), se spet pojavijo rjave lise, ko pa se plošča znova pregleda na UV-svetlobi pri 360 nm, se lahko opazi rumenkasta fluorescenca.

Meja detekcije: 0,1 µg kinina.

#### B. KVANTITATIVNO DOLOČANJE

##### 1. PODROČJE UPORABE

S to metodo se določi količina kinina. Lahko se uporabi za določanje največje dovoljene koncentracije 0,5 % (m/m) v šamponih in 0,2 % v losjonih za lase.

##### 2. OPREDELITEV

Vsebnost kinina, določena po tej metodi, se izrazi kot masni odstotek (% m/m) v izdelku.

##### 3. PRINCIP

Po ustrezni obdelavi izdelka za analizo se določanje količine opravi s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC).

##### 4. REAGENTI

Vsi reagenti naj bi bili analitsko čisti in ustrezni za HPLC.

##### 4.1 Acetonitril.

##### 4.2 Kalijev dihidrogenortofosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ).

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

##### 4.4 Tetrametilamonijev bromid.

##### 4.5 Kinin, brezvodni.

##### 4.6 Metanol.

##### 4.7 Raztopina ortofosforne kisline (0,1 M): odtehta se 11,53 g ortofosforne kisline (4.3) in se raztopi v 1 000 ml vode v merilni bučki.

##### 4.8 Raztopina kalijevega dihidrogenortofosfata (0,1 M): odtehta se 13,6 g kalijevega dihidrogenortofosfata (4.2) in se raztopi v 1 000 ml vode v merilni bučki.

##### 4.9 Raztopina tetrametilamonijevega bromida: raztopi se 15,40 g tetrametilamonijevega bromida (4.4) v 1 000 ml vode v merilni bučki.

##### 4.10 Eluent: ortofosforna kislina (4.7)/kalijev dihidrogenfosfat (4.8)/tetrametilamonijev bromid (4.9)/voda/acetonitril (4.1) 10/50/100/340/90 (v/v/v/v/v).

Sestava te mobilne faze se lahko tudi spremeni, da bi se dosegel faktor ločljivosti  $R \geq 1,5$ .

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

pri čemer so:

$R_1$  in  $R_2$  = retenzijska časa vrhov, v minutah,

$W_1$  in  $W_2$  = širini vrhov na polovici višine, v milimetrih,

$d'$  = hitrost diagrama (papierja), v milimetrih na minuto.

##### 4.11 Silika, obdelana z oktadecilsilanom, 10 µm.

##### 4.12 Standardna raztopina: v skupino 100-mililitrskih standardnih bučk se natančno odtehta približno 5,0, 10,0, 15,0 in 20,0 mg brezvodnega kinina. Do oznake se dolije metanol (4.6) in vsebina se stresa, dokler se kinin ne raztopi. Vsak vzorec se filtrira skozi 0,5-mikrometrski filter.

##### 5. APARATURA

##### 5.1 Običajna laboratorijska oprema.

##### 5.2 Ultrazvočna kopel.

##### 5.3 Oprema za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti z detektorjem z nastavljivo valovno dolžino.

##### 5.4 Kolona: dolžina: 250 mm; notranji premer: 4,6 mm; polnilo: silika (4.11).

##### 5.5 Milipore filter FH 0,5 µm ali ekvivalenten z ustrezno filtracijsko pripravo.



6. POSTOPEK
- 6.1 **Priprava vzorca**
- V standardno 100-mililitrsko bučko se natančno odtehta količina izdelka, ki je dovolj velika, da vsebuje 10,0 mg brezvodnega kinina, doda se 20 ml metanola (4.6) in se nato za 20 minut postavi v ultrazvočno kopel (5.2). Do oznake se izravna z metanolom (4.6). Raztopina se zmeša in filtrira alikvotni del (5.5).
- 6.2 **Kromatografija**
- Hitrost pretoka: 1,0 ml/min.
- Valovna dolžina detektorja (5.3): 332 nm.
- Volumen vbrizgane tekočine: 10 µl filtrirane raztopine (6.1)
- Meritve: površine vrhov.
- 6.3 **Umeritvena krivulja**
- Najmanj trikrat se vbrizga 10,0 µl vsake referenčne raztopine (4.12), izmerijo se površine vrhov in za vsako koncentracijo se zračuna povprečna površina.
- Izdela se umeritvena krivulja in preveri njena premočrtnost.
7. IZRAČUN
- 7.1 Z umeritvene krivulje (6.3) v µg se določi količina brezvodnega kinina v prostornini vbrizgane tekočine (6.2).
- 7.2 Koncentracija brezvodnega kinina v vzorcu se določi kot masni odstotek (% m/m) po naslednji formuli:
- $$\% \text{ (m/m) brezvodnega kinina} = \frac{B}{A},$$
- pri čemer je:
- B količina brezvodnega kinina, določena v 10 mikrolitrih filtrirane raztopine (6.1), v mikrogramih;
- A masa vzorca (6.1), v gramih.
8. PONOVLJIVOST<sup>(1)</sup>
- Pri 0,5-odstotni (m/m) vsebnosti brezvodnega kinina razlika med rezultati dveh vzporednih določanj količine, opravljenih na istem vzorcu, ne sme presegati 0,02 %.
- Pri 0,2-odstotni (m/m) vsebnosti brezvodnega kinina razlika med rezultati dveh vzporednih določanj količine, opravljenih na istem vzorcu, ne sme presegati 0,01 %.

## KVALITATIVNO IN KVANTITATIVNO DOLOČANJE ANORGANSKIH SULFITOV IN VODIKOVIH SULFITOV

### PODROČJE UPORABE

S to metodo se identificirajo anorganski sulfiti in vodikovi sulfiti v kozmetičnih izdelkih, ter določi njihova količina. Uporabna je le za izdelke z alkoholno ali vodno fazo in koncentracije, ki znašajo do največ 0,2 % žveplovega dioksida.

### A. KVALITATIVNA DOLOČITEV

1. PRINCIP
- Vzorec se pogreje v klorovodikovi kislini, izločen žveplov dioksid pa se identificira po vonju ali učinku na indikacijski papir.
2. REAGENTI
- Vsi reagenti naj bi bili analitsko čisti.
- 2.1 Klorovodikova kislina (4 M).
- 2.2 Papir iz škroba kalijevega jodata ali ustrezno nadomestno sredstvo.
3. PRIPRAVE
- 3.1 Običajna laboratorijska oprema.
- 3.2 Bučke (25 ml) s kratkim kondenzatorjem povratnega toka.
4. POSTOPEK
- 4.1 Približno 2,5 g vzorca se vnese v bučko (3.2), ki vsebuje 10 ml solne kisline (2.1).
- 4.2 Premeša se in segreje do vrelišča.
- 4.3 Z vonjem ali indikatorskim papirjem (2.2) se preskusi, ali se izloča žveplov dioksid.

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

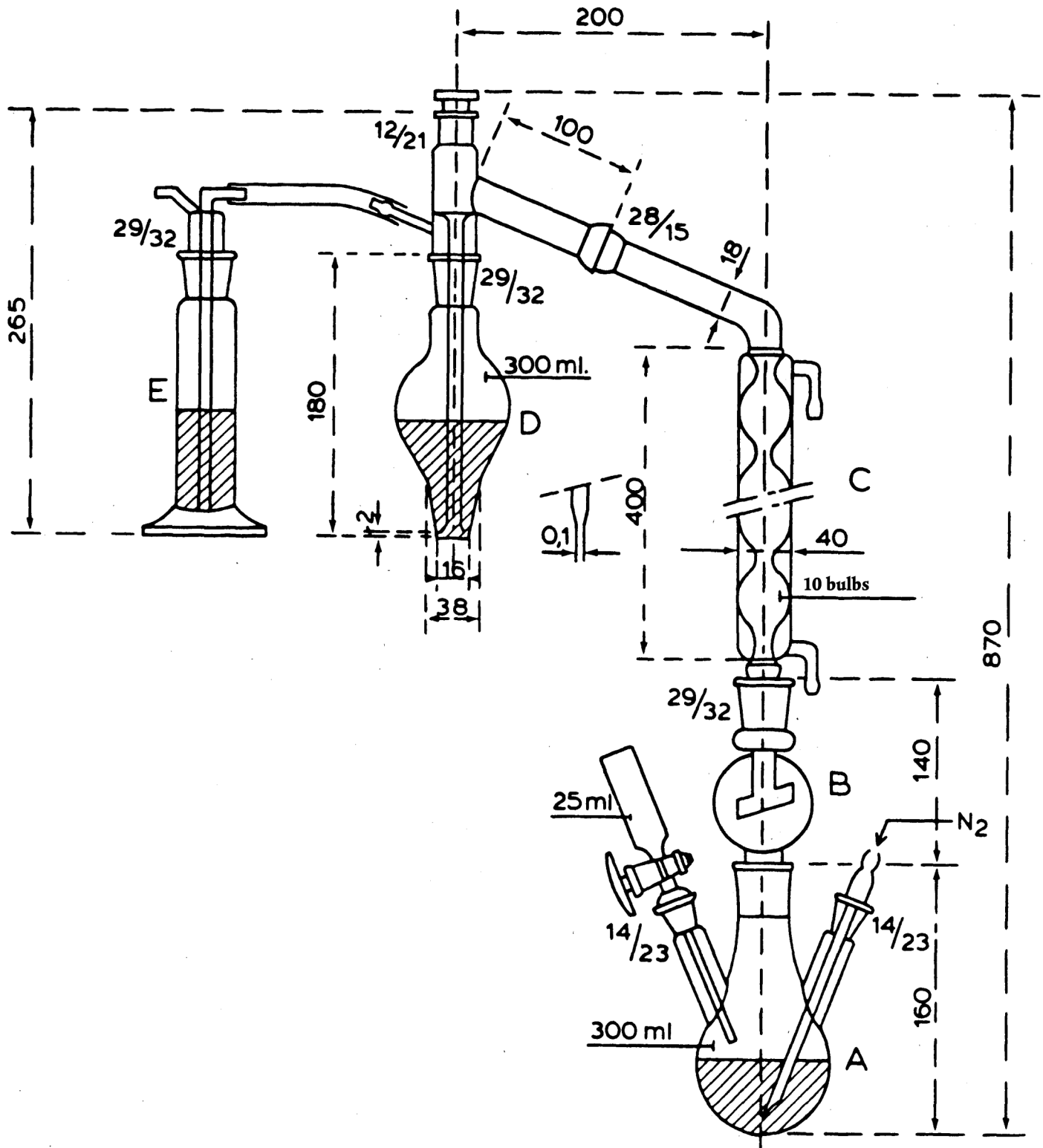
## B. KVANTITATIVNA DOLOČITEV

1. OPREDELITEV  
Vsebnost sulfita ali vodikovega sulfita, ki se določi po tej metodi, se izrazi kot masni odstotek žveplovega dioksida.
2. PRINCIP  
Po nakisanju vzorca se sproščeni žveplov dioksid destilirira v raztopino vodikovega peroksida. Žveplova kislina, ki tako nastane, se titrira s standardno raztopino natrijevega hidroksida.
3. REAGENTI  
Vsi reagenti naj bi bili analitsko čisti.
  - 3.1 Vodikov peroksid, 0,2 % (m/v). Pripravljen vsak dan.
  - 3.2 Ortofosforna kislina ( $d \frac{20}{4} = 1,75$ ).
  - 3.3 Metanol.
  - 3.4 Standardizirana raztopina natrijevega hidroksida (0,01 M).
  - 3.5 Dušik.
  - 3.6 Indikator: mešanica 1: 1 (v/v) metilrdeče (0,03 % m/v v etanolu) in metilmodre (0,05 % m/v v etanolu). Raztopina se filtrira.
4. APARATURA
  - 4.1 Običajna laboratorijska oprema.
  - 4.2 Destilacijska priprava (glej sliko).
5. POSTOPEK
  - 5.1 Približno 2,5 g vzorca se natančno odtehta v destilacijsko bučko A (glej sliko).
  - 5.2 Doda se 60 ml vode in 50 ml metanola (3.3) ter premeša.
  - 5.3 10 ml vodikovega peroksida (3.1), 60 ml vode in nekaj kapljic indikatorja (3.6) se vnese v sprejemno odprtino destilatorja D (glej sliko). Doda se toliko kapljic natrijevega hidroksida (3.4), da se barva indikatorja spremeni v zeleno.
  - 5.4 Ponovite 5.3 za pralno steklenico E (glej sliko).
  - 5.5 Priprava se sestavi in naravna pretok dušika (3.5) na približno 60 mehurčkov na minuto.
  - 5.6 Iz lija se odtoči v destilacijsko bučko A 15 ml ortofosforne kisline (3.2).
  - 5.7 Hitro se segreje do vrelišča in nato pusti počasi neprekinjeno vreti 30 minut.
  - 5.8 Destilacijski sprejemnik D se odklopi. Cev se spere in nato titrira z raztopino natrijevega hidroksida (3.4), dokler se indikator ne obarva zeleno (3.6).
6. IZRAČUN  
Vsebnost sulfita ali vodikovega sulfita se zračuna v masnih odstotkih po formuli:
$$\% \text{ m/m žveplovega dioksida} = \frac{3,2 \text{ MV}}{m},$$
v kateri je:  
M = molarna koncentracija raztopine natrijevega hidroksida (3.4),  
V = prostornina (volumen) natrijevega hidroksida (3.4), potrebnega za titracijo (5.8), v mililitrih,  
m = masa vzorca (5.1), v gramih.
7. PONOVLJIVOST <sup>(1)</sup>  
Pri 0,2-odstotni m/m vsebnosti žveplovega dioksida razlika med rezultati dveh vzporednih določanj količine, opravljenih na istem vzorcu, ne bi smela presežati 0,006 %.

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

## Priprava za destilacijo žveplovega dioksida v skladu s Tannerjem

Vse mere so v milimetrih.



## KVALITATIVNO IN KVANTITATIVNO DOLOČANJE KLORATOV ALKALIJSKIH KOVIN

### PODROČJE UPORABE

S to metodo se identificirajo klorati in določi njihova količina v kremah za zobe in drugih kozmetičnih izdelkih.

### A. KVALITATIVNO DOLOČANJE

#### 1. PRINCIP

Klorati se ločijo od drugih halatov s tankoplastno kromatografijo in identificirajo z oksidacijo jodida, pri čemer nastane jod.

#### 2. REAGENTI

Vsi reagenti naj bi bili analitsko čisti.

2.1 Referenčne raztopine: sveže pripravljene vodne raztopine kalijevega klorata, bromata in jodata (0,2 % m/v).

2.2 Topilo za razvijanje: raztopina amoniaka (28 % m/v), acetona/butanola (60/130/30 v/v/v).

2.3 Kalijev jodid, vodna raztopina (5 % m/v).

2.4 Raztopina škroba (od 1 do 5 % m/v).

2.5 Klorovodikova kislina (1 M).

2.6 Za uporabo že pripravljene tankoplastne celulozne plošče (0,25 mm).

#### 3. APARATURA

Običajna oprema za tankoplastno kromatografijo.

#### 4. POSTOPEK

4.1 Z vodo se ekstrahira približno 1 g vzorca, filtrira in razredči na približno 25 ml.

4.2 Na ploščo (2.6) se da 2  $\mu$ l raztopine (4.1) skupaj z 2  $\mu$ l alikvotov vsake izmed treh referenčnih raztopin (2.1).

4.3 Plošča se postavi v posodo in se s topilom 2.2 razvija do približno treh četrtin dolžine plošče (2.6).

4.4 Plošča se odstrani iz posode in pusti, da topilo izhlapi. (Opomba: to lahko traja do dve uri.)

4.5 Plošča se naprši s kalijevim jodidom (2.3) in pusti sušiti približno pet minut.

4.6 Plošča se naprši z raztopino škroba (2.4) in pusti sušiti približno pet minut.

4.7 Plošča se naprši s klorovodikovo kislino (2.5).

#### 5. OCENJEVANJE

Če je navzoč klorat, se čez pol ure pojavi kot modra lisa (včasih tudi kot rjava), katere vrednost  $R_f$  je od 0,7 do 0,8.

Halati	$R_f$
Jodat	od 0 do 0,2
Bromat	od 0,5 do 0,6
Klorat	od 0,7 do 0,8

Treba je vedeti, da bromati in jodati takoj reagirajo. Paziti je treba, da se lise bromatov ne zamenjajo z lisami kloratov.

## B. KVANTITATIVNO DOLOČANJE

## 1. OPREDELITEV

Vsebnost klorata v vzorcu, določena po tej metodi, se izrazi kot masni odstotek klorata.

## 2. PRINCIP

Klorat se v kisljih pogojih reducira s cinkovim praškom. Nastali klorid se meri s potenciometrično titracijo, pri kateri se uporabi raztopina srebrovega nitrata. Podobna metoda določanja pred reduciranjem dopušča možno navzočnost halidov.

## 3. REAGENTI

Vsi reagenti naj bi bili analitsko čisti.

## 3.1 Ocetna kislina, 80 % (m/m).

## 3.2 Cinkov prašek.

## 3.3 Standardna raztopina srebrovega nitrata (0,1 M).

## 4. APARATURA

## 4.1 Običajna laboratorijska oprema.

## 4.2 Potenciomter, opremljen z indikacijsko srebreno elektrodo.

## 5. POSTOPEK

5.1 **Priprava vzorca**

V epruveto za centrifugiranje se natančno odtehta masa „m“, ki naj znaša približno 2 g. Doda se približno 15 ml očetne kisline (3.1) in previdno premeša. Počaka se 30 minut in nato centrifugira 15 minut pri 2000 obr/min. Supernatantna raztopina se prenese v 50-mililitrsko merilno bučko. Centrifugiranje se dvakrat ponovi z dodajanjem 15 ml očetne kisline (3.1) ostanku. Raztopina, ki vsebuje klorat, se zbere v isto merilno bučko. Do oznake se dolije očetna kislina (3.1).

5.2 **Redukcija klorata**

20 ml raztopine 5.1 se doda 0,6 g cinkovega praška (3.2). V bučki, ki ima tudi kondenzacijsko cev, se segreje do vrelišča. Po 30 minutah vretja se ohladi in filtrira. Bučka se spere z vodo. Filtrira se in filtrat kombinira z vodo za izpiranje.

5.3 **Določanje količine klorida**

20 ml raztopine 5.2 se titrira s srebromim nitratom (3.3) z uporabo potenciometra (4.2). S srebromim nitratom (3.3) se enako titrira tudi 20 ml raztopine 5.1.

*Opomba:* če vsebuje izdelek derivate broma ali joda, ki lahko po redukciji sproščajo bromide ali jodide, bo imela titracijska krivulja več prevojev. V tem primeru je prostornina titrirane raztopine (3.3), ki ustreza kloru, razlika med zadnjim in predzadnjim prevojem na diagramu.

## 6. IZRAČUN

Vsebnost klorata v vzorcu (% m/m) se zračuna po formuli:

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

pri čemer je:

V = prostornina raztopine srebrovega nitrata (3.3), uporabljenega za titracijo raztopine 5.2, v mililitrih,

V' = prostornina raztopine srebrovega nitrata (3.3), uporabljenega za titracijo 20 mililitrov raztopine 5.1, v mililitrih,

M = molarnost standardne raztopine srebrovega nitrata,

m = masa vzorca, v gramih.

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

Pri 3- do 5-odstotni m/m vsebnosti klorata razlika med rezultati dveh vzporednih določanj količine, opravljenih na istem vzorcu, ne bi smela presežati 0,07 % m/m.

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

## KVALITATIVNO IN KVANTITATIVNO DOLOČANJE NATRIJEVEGA JODATA

## PODROČJE UPORABE

Ta metoda opisuje postopek identifikacije in določanje količine preostanka kozmetičnih izdelkov, ki vsebujejo natrijev jodat.

## A. KVALITATIVNO DOLOČANJE

## 1. PRINCIP

Natrijev jodat se loči od drugih halatov s tankoplastno kromatografijo in identificira z oksidacijo jodida, pri čemer nastane jod.

## 2. REAGENTI

Vsi reagenti naj bi bili analitsko čisti.

2.1 Referenčne raztopine. Sveže pripravljene vodne raztopine kalijevega klorata, bromata in jodata (0,01 % m/v).

2.2 Topilo za razvijanje.

Raztopina amoniaka (28 % m/v)/acetona/butanola (60/130/30 v/v/v).

2.3 Vodna raztopina kalijevega jodida (5 % m/v).

2.4 Raztopina škroba (od 1 do 5 % m/v).

2.5 Klorovodikova kislina (1 M).

## 3. APARATURA

3.1 Za uporabo pripravljene tankoplastne celulozne kromatografske plošče (0,25 mm).

3.2 Običajna oprema za tankoplastno kromatografijo.

## 4. POSTOPEK

4.1 Z vodo se ekstrahira približno 1 g vzorca, filtrira in razredči na približno 10 ml.

4.2 2 µl te raztopine se da na startno črto plošče (3.1) skupaj z 2 µl alikvotov vsake referenčne raztopine (2.1).

4.3 Plošča se postavi v posodo in se s topilom (2.2) razvija z do približno treh četrtin celotne dolžine plošče.

4.4 Plošča se odstrani iz posode in pusti pri sobni temperaturi, da topilo izhlapi (*opomba*: to lahko traja do dve uri).

4.5 Plošča se naprši s kalijevim jodidom (2.3) in pusti sušiti približno pet minut.

4.6 Nato se naprši s škrobom (2.4) in pusti sušiti približno pet minut.

4.7 Nazadnje se naprši še s klorovodikovo kislino (2.5).

## 5. OCENJEVANJE

Če je navzoč jodat, se takoj pojavi modra lisa (lahko tudi rjava ali pa se spremeni v rjavo, kadar s ploščo ne delamo), katere vrednost  $R_f$  je približno od 0 do 0,2.

Upoštevati je treba, da bromati reagirajo takoj pri vrednostih  $R_f$  od približno 0,5 do 0,6, klorati pa šele po približno 30 minutah pri vrednostih  $R_f$  od 0,7 do 0,8.

## B. KVANTITATIVNO DOLOČANJE

## 1. OPREDELITEV

Vsebnost natrijevega jodata, določena po tej metodi, se izrazi kot masni odstotek natrijevega jodata.

## 2. PRINCIP

Natrijev jodat se raztopi v vodi, njegova količina pa se določi s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti, pri čemer se v navedenem zaporedju uporabi kolona C 18 za reverzno fazo in nato še kolona z anionskim izmenjalcem.

### 3. REAGENTI

Vsi reagenti naj bi bili analitsko čisti in posebej primerni za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC).

3.1 Klorovodikova kislina (4 M).

3.2 Natrijev sulfit aq., 5 % m/v.

3.3 Osnovna raztopina natrijevega jodata.

Pripravi se osnovna raztopina, ki vsebuje 50 mg natrijevega jodata na 100 ml vode.

3.4 Kalijev dihidrogenortofosfat.

3.5 Dinatrijev hidrogenortofosfat x 2H<sub>2</sub>O.

3.6 Mobilna faza za HPLC: v 1 litru vode se raztopi 3,88 g kalijevega dihidrogenortofosfata (3.4) in 1,19 g dinatrijevega hidrogenortofosfata x 2H<sub>2</sub>O (3.5).

pH nastale raztopine je 6.2.

3.7 Univerzalni indikatorski papir, pH 1-11.

### 4. APARATURA

4.1 Običajna laboratorijska oprema.

4.2 Krožni filtrirni papir, premer 110 mm, Schleicher in Schüll št. 575 ali ekvivalenten.

4.3 Tekočinski kromatograf z visoko ločljivostjo z detektorjem z nastavljivo valovno dolžino.

4.4 Kolone: dolžina: 120 mm; notranji premer: 4,6 mm; število: dve zaporedno povezani; prva kolona – Nucleosil<sup>®</sup> 5 C 18 ali ekvivalentna; druga kolona – Vydac<sup>™</sup>-301-SB ali ekvivalentna.

### 5. POSTOPEK

#### 5.1 Priprava vzorca

##### 5.1.1 Vzorci tekočin (šamponi)

V 10-mililitrsko umerjeno stekleničko z zamaškom ali merilno bučko se natančno odtehta testni delež, ki znaša približno 1,0 g vzorca.

Do oznake se dolije voda in premeša.

Če je treba, se raztopina filtrira.

Količina jodata v vzorcu se določi s HPLC, kakor je opisano v razdelku 5.2.

##### 5.1.2 Trdni vzorci (milo)

Del vzorca se narahlo razdeli in natančno odtehta testni delež približno 1,0 g v 100-mililitrsko merilni valj s steklenim zamaškom. Do prostornine 50 ml se dolije voda in močno stresa eno minuto. Centrifugira se in filtrira skozi filtrirni papir (4.1) ali pusti mešanico stati vsaj eno noč.

Želatinasta raztopina se močno pretrese in filtrira skozi filtrirni papir (4.1).

S HPLC se določi količina jodata v filtratu, kakor je opisano v razdelku 5.2.

#### 5.2 Kromatografija

Hitrost pretoka: 1 ml/min.

Detektor valovne dolžine (4.2): 210 nm.

Prostornina vbrizgane tekočine: 10 µl.

Meritve: površina vrha.

#### 5.3 Umerjanje

V navedenem razmerju se nakapa 1,0, 2,0, 5,0, 10,0 in 20,0 ml osnovne raztopine natrijevega jodata (3.3) v 50-mililitrske merilne bučke. Dopolni se do oznake in premeša.

Tako dobljene raztopine vsebujejo v navedenem zaporedju 0,01, 0,02, 0,05, 0,10 in 0,20 mg natrijevega jodata na ml.

10-mikrolitrski delež vsake standardne raztopine se vbrizga v tekočinski kromatograf (4.2) in izdela kromatogram. Določijo se površine vrhov jodata in nariše krivulja, na kateri se primerjajo površine vrhov s koncentracijo natrijevega jodata.

## 6. IZRAČUN

Vsebnost natrijevega jodata se zračuna kot masni odstotek (% m/m) po naslednji formuli:

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

pri čemer je:

m = masa testnega deleža (5.1) v gramih,

V = celotna prostornina raztopine vzorca, dobljena, kakor je opisano v 5.1, v mililitrih,

c = koncentracija, dobljena z umeritvene krivulje (5.3), v miligramih na mililiter natrijevega jodata.

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

Pri 0,1-odstotni (m/m) vsebnosti natrijevega jodata razlika med rezultati dveh vzorednih določanj, opravljenih na istem vzorcu, ne bi smela presegati 0,002 %.

## 8. POTRDITEV

8.1 **Princip**

V okisani raztopini kozmetičnih izdelkov se jodat ( $\text{IO}_3^-$ ) s sulfitom reducira v jod ( $\text{I}^-$ ), nastala raztopina pa se lahko preišče s HPLC. Če vrh krivulje, katerega retenzijski čas ustreza retenzijskemu času jodata, zgine po obravnavanju s sulfitom, se prvotni vrh te krivulje najverjetneje lahko pripiše jodatu.

8.2 **Postopek**

5-mililitrski delež raztopine vzorca, dobljene, kakor je opisano v razdelku 5.1, se s pipeto nakapa v erlenmajerico.

pH raztopine se z uporabo klorovodikove kisline (3.1) nastavi na vrednost 3 ali manj; uporabi se univerzalni indikatorski papir (3.7).

Doda se tri kapljice raztopine natrijevega sulfita (3.2) in premeša.

10-mikrolitrski delež raztopine se vbrizga v tekočinski kromatograf (4.2).

Dobljeni kromatogram se primerja s kromatogramom, dobljenim, kakor je opisano v odstavku 5 za isti vzorec.

---

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