

PODROBNOSTI O ANALYTICKÝCH METÓDACH NA KONTROLU ZLOŽENIA KOZMETICKÝCH VÝROBKOV

1. ODBER VZORIEK

(Podľa smernice Komisie 80/1335/EHS z 22. decembra 1980)

1. ROZSAH A OBLASŤ POUŽITIA
Ustanovuje postup na odber vzoriek kozmetických výrobkov za účelom ich analýzy v rôznych laboratóriách.
2. DEFINÍCIE
 - 2.1. *Základná vzorka* - jednotkové množstvo, odobraté z výrobnjej dávky, určenej na predaj.
 - 2.2. *Celková vzorka* - súhrn všetkých základných vzoriek, odobratých z jednej výrobnjej dávky.
 - 2.3. *Laboratórna vzorka* - reprezentatívna časť celkovej vzorky, určená na analýzu v laboratóriách.
 - 2.4. *Skúšobná vzorka* - reprezentatívna časť laboratórnej vzorky, potrebná na jednu analýzu.
 - 2.5. *Obal* - predmet, v ktorom je výrobok zabalený a s ktorým je v priamom kontakte.
3. POSTUP ODBERU VZORIEK
 - 3.1. Vzorky kozmetických výrobkov sa odoberajú v ich pôvodných, spotrebiteľských obaloch a do laboratórií sa dopravujú v neporušenom stave.
 - 3.2. Ak sa kozmetické výrobky uvádzajú do obehu vo veľkospotrebiteľskom balení alebo v inom obale, ako je pôvodné balenie od výrobcu, vzorka sa odoberie vhodne zvoleným vzorkovačom po predchádzajúcom premiešaní obsahu v obale. Ak obsah nemožno premiešať, vzorka sa odoberie vrstveným (stratifikovaným) odberom.
 - 3.3. Počet základných vzoriek, potrebných na prípravu laboratórnej vzorky, závisí od analytickej metódy a od počtu analýz, ktoré je potrebné vykonať.
4. IDENTIFIKÁCIA VZORKY
 - 4.1. Vzorky sa pri odbere zapečatia a označia štítkom, pripevneným tak, aby obal nebolo možné otvoriť, štítok vymeniť alebo odstrániť bez porušenia pečate. Ak nemožno štítok pripevniť na obal, číslo protokolu o odbere vzorky sa vyznačí na obal.
 - 4.2. Každá odobratá základná vzorka musí byť označená týmito údajmi
 - 4.2.1. Názov kozmetického výrobku
 - 4.2.2. Dátum, čas a miesto odberu vzorky
 - 4.2.3. Meno a priezvisko osoby, ktorá odobrala vzorku
 - 4.2.4. Názov orgánu dozoru
 - 4.3. Protokol o odbere vzorky musí obsahovať
 - 4.3.1. Názov a špecifikáciu výrobku alebo suroviny
 - 4.3.2. Názov a adresu výrobcu, spracovateľa, dovozcu, distribútora alebo predávajúceho
 - 4.3.3. Údaj o veľkosti vzorkovanej dávky; jej objem alebo hmotnosť
 - 4.3.4. Označenie výrobnjej dávky
 - 4.3.5. Dátum minimálnej trvanlivosti

- 4.3.6. Miesto, dátum a čas odberu vzorky
- 4.3.7. Spôsob odberu vzorky; údaje o postupe odberu vzorky s dôrazom na odchýlky od predpísaného štandardného alebo dohodnutého postupu
- 4.3.8. Počet, objem alebo hmotnosť odobratých vzoriek na laboratórne skúšanie
- 4.3.9. Meno, priezvisko a podpis osoby, ktorá odobrala vzorku
- 4.3.10. Miesto doručenia vzorky, ak je to potrebné

5. USKLADNENIE VZORIEK

- 5.1. Základné vzorky sa musia uskladniť v súlade s pokynmi výrobcu, uvedenými na etikete, ak sú tam uvedené.
- 5.2. Ak nie sú určené iné podmienky, laboratórne vzorky sa uskladnia v tme pri teplote od 10 do 25 °C.
- 5.3. Základné vzorky nesmú byť otvorené pred začiatkom analýzy.

2. LABORATÓRNA PRÍPRAVA SKÚŠOBNÝCH VZORIEK

(Podľa smernice Komisie 80/1335/EHS z 22. decembra 1980)

1. VŠEOBECNE

- 1.1. Ak je to možné, analyzuje sa každá základná vzorka. Ak je základná vzorka príliš malá, použije sa minimálny počet základných vzoriek. Pred odobratím skúšobnej vzorky sa základné vzorky najskôr spolu dôkladne zmiešajú.
- 1.2. Obal sa otvorí v atmosfére inertného plynu, ak je to tak určené v analytickej metóde a čo najrýchlejšie sa odoberie požadovaný počet skúšobných vzoriek. Analýza sa vykoná v čo najkratšom čase. Ak sa vzorka ďalej uchováva, obal sa znova zapečatí v atmosfére inertného plynu.
- 1.3. Kozmetické výrobky môžu byť vyrobené v kvapalnom, tuhom alebo polotuhom stave. Ak sú pôvodne homogénne výrobky oddelené vo viacerých fázach, pred odberom skúšobnej vzorky sa znova zhomogenizujú.
- 1.4. Ak je kozmetický výrobok predávaný osobitným spôsobom, v dôsledku čoho sa nemôže postupovať v súlade s touto skúšobnou metódou a ak neboli prijaté žiadne ustanovenia o príslušných vhodných skúšobných metódach, môže byť použitý vlastný postup za predpokladu, že bude sformulovaný do písomnej formy ako súčasť protokolu o skúške.

2. KVAPALINY

- 2.1. Môžu sa vyskytovať ako olejové, alkoholové a vodné roztoky, toaletné vody, lotiony alebo mlieka a môžu byť balené vo fľaštičkách, fľašiach, ampuliach alebo tubách.
- 2.2. *Odber skúšobnej vzorky*
 - 2.2.1. Obal sa pred otvorením intenzívne pretrepe.
 - 2.2.2. Obal sa otvorí.
 - 2.2.3. Na vizuálne posúdenie vzorky sa odleje niekoľko mililitrov kvapaliny do skúmavky.
 - 2.2.4. Odoberú sa požadované skúšobné vzorky.
 - 2.2.5. Obal sa znova dôkladne uzavrie.

3. POLOTUHÉ LÁTKY

- 3.1. Môžu sa vyskytovať ako pasty, krémy, tuhé emulzie a gély a môžu byť balené v tubách, plastových fľašiach alebo téglkoch.
- 3.2. *Odber skúšobnej vzorky*
 - 3.2.1. Z obalov s úzkym hrdlom sa vytlačí aspoň jeden centimeter výrobku a až potom sa vytlačí skúšobná vzorka a obal sa ihneď znova uzavrie.
 - 3.2.2. Z obalov so širokým hrdlom sa zľahka rovnomerne odstráni povrchová vrstva výrobku a po odbere skúšobnej vzorky sa obal ihneď uzatvorí.

4. TUHÉ LÁTKY

- 4.1. Môžu sa vyskytovať ako sypké a kompaktné púdre, tyčinky a môžu byť balené v rôznych obaloch.
- 4.2. *Odber skúšobnej vzorky*
 - 4.2.1. Zo sypkého púdru sa pred otvorením obal intenzívne pretrepe a následne sa odoberie skúšobná vzorka.
 - 4.2.2. Z kompaktného púdru alebo z tyčinky sa rovnomerným zoškrabaním odstráni povrchová vrstva a spod nej sa odoberie skúšobná vzorka.

5. VÝROBKY V OBALOCH POD TLAKOM

5.1. Výrobkami v obaloch pod tlakom sú aerosólové rozprašovače podľa osobitného predpisu ¹⁾.

5.2. *Odber skúšobnej vzorky*

Po intenzívnom pretrepaní sa reprezentatívne množstvo obsahu aerosólového rozprašovača preniesie pomocou vhodnej spojovacej súčiastky (obrázok č. 1; v špecifických prípadoch môže analytická metóda vyžadovať použitie iných spojovacích súčiastok) do plastom potiahnutej sklenenej fľaše (obrázok č. 4), vybavenej aerosólovým ventilom bez ponornej trubice. Počas prenosu sa fľaša drží ventilom smerom nadol. Takýto spôsob prenosu zabezpečí, aby bol obsah jasne viditeľný a odpovedajúci jednému zo štyroch nasledovných prípadov

5.2.1. Aerosólový výrobok vo forme homogénneho roztoku, vhodného priamo na analýzu.

5.2.2. Aerosólový výrobok, pozostávajúci z dvoch kvapalných fáz. Po oddelení spodnej fázy do druhej fľaše na prenášanie vzoriek, môže byť analyzovaná každá fáza osobitne. V tomto prípade sa prvá fľaša na prenášanie vzoriek drží ventilom smerom nadol. Vtedy je zvyčajne spodná vrstva vodná a neobsahuje hnací plyn (napr. pri sústave bután/voda).

5.2.3. Aerosólový výrobok, obsahujúci prášok v suspenzii. Kvapalná fáza sa analyzuje po odstránení prášku.

5.2.4. Výrobok v podobe peny alebo krému. Najprv sado fľaše na prenášanie vzoriek presne naváži 5 až 10 g 2-metoxyetanolu. Táto látka potláča tvorbu peny počas odplyňovania na základe čoho je možné odstrániť hnací plyn bez straty kvapalnej zložky.

5.3. *Príslušenstvo*

Spojka je spojovacia súčiastka (obrázok č. 1), vyrobená z duralu alebo z mosadze, skonštruovaná tak, aby prostredníctvom polyetylénového adaptéra vyhovovala rozdielnym systémom ventilov. Podľa uvedeného príkladu môžu byť použité aj iné typy spojovacích súčiastok. (obrázok č. 2 a 3).

Vzorkovnica je fľaša na prenášanie vzoriek (obrázok č. 4), vyrobená z bieleho skla z vonkajšej strany potiahnutá ochrannou vrstvou priehľadného plastu, s objemom 50 ml až 100 ml, vybavená aerosólovým ventilom bez ponornej trubice.

5.4. *Postup*

Z fľaše na prenášanie vzoriek sa vytlačí vzduch. Za týmto účelom sa cez spojovaciu súčiastku zavedie asi 10 ml difluórdichlórmetánu alebo butánu (v závislosti od toho, aký aerosólový výrobok sa bude analyzovať). Spojovacia súčiastka sa odpojí až po úplnom odplynení - odstránení kvapalnej fázy, pričom vzorkovnica sa drží ventilom čo najvyššie. Fľaša na prenášanie vzoriek sa odváži („a“ v gramoch). Aerosólový rozprašovač, z ktorého sa bude odoberať vzorka, sa intenzívne pretrepe. Na ventil obalu aerosólovej vzorky (ventilom smerom nahor) sa pripojí spojovacia súčiastka, na ktorú sa nasadí fľaša na prenášanie vzoriek (hrdlom smerom nadol) a stlačí sa. Fľaša na prenášanie vzoriek sa naplní približne do dvoch tretín. Ak sa v dôsledku vyrovnania tlaku prečerpávanie predčasne preruší, obnoví sa ochladením fľaše na prenášanie vzoriek. Spojovacia súčiastka sa odpojí, naplnená fľaša sa odváži („b“ v gramoch) a určí sa hmotnosť prenesenej aerosólovej vzorky m_1 ($m_1 = b - a$).

Takto získaná vzorka môže byť použitá

a) na bežnú chemickú analýzu,

b) na analýzu prchavých zložiek plynovou chromatografiou.

¹⁾ Vyhláška Ministerstva hospodárstva Slovenskej republiky č. 330/2001 Z. z. o požiadavkách na aerosólové rozprašovače

5.4.1. **Chemická analýza**

Fľaša na prenášanie vzoriek sa pridrží ventilom smerom nahor. Odplyní sa. Ak odplyňovacia operácia spôsobí penenie, použije sa fľaša na prenášanie vzoriek, do ktorej sa injekčnou striekačkou cez spojovaciu súčiastku dopredu prenieslo 5 g až 10 g 2-metoxyetanolu. Dokončí sa odstránenie prchavých súčastí bez strát, pretrepávaním vo vodnom kúpeli, udržiavanom pri 40 °C. Spojovacia súčiastka sa odpojí a fľaša na prenášanie vzoriek sa znova odváži („c“ v gramoch), aby sa určila hmotnosť zvyšku m_2 ($m_2 = c - a$), pričom pri výpočte hmotnosti zvyšku sa odčíta hmotnosť použitého 2-metoxyetanolu. Fľaša na prenášanie vzoriek sa otvorí odstránením ventilu. Celý zvyšok sa rozpustí v známom množstve vhodného rozpúšťadla a s alikvotnou časťou sa uskutoční požadované stanovenie.

Vzorce pre výpočet

$$R = \frac{r \times m_2}{m_1} \text{ a } Q = \frac{R \times P}{100}$$

Kde

m_1 je hmotnosť aerosólu preneseného do fľaše na prenášanie vzoriek,

m_2 je hmotnosť zvyšku po zahriatí na 40 °C,

r je percentuálny podiel danej zložky v m_2 (stanovený podľa príslušnej metódy),

R je percentuálny podiel danej zložky v aerosóle (v takej podobe, ako bol prijatý),

Q je celková hmotnosť danej zložky v aerosólovom rozprašovači,

P je čistá hmotnosť pôvodného aerosólového rozprašovača (základná vzorka).

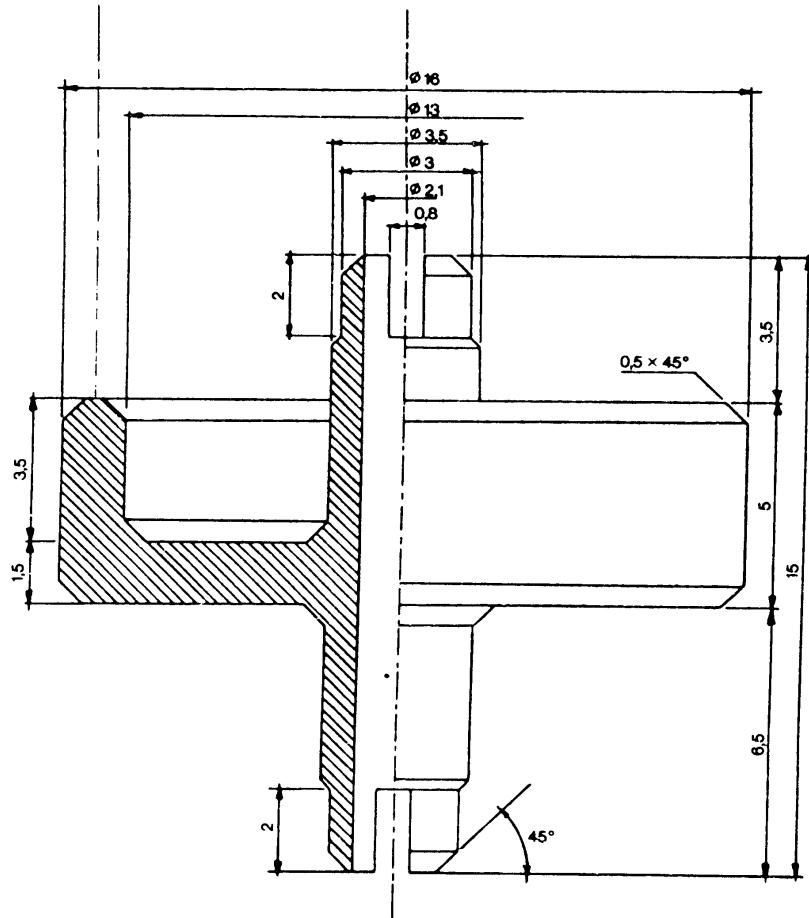
5.4.2. **Analýza prchavých zložiek plynovou chromatografiou**

5.4.2.1. *Princíp* - pomocou striekačky pre plynovú chromatografiu sa z fľaše na prenášanie vzoriek odoberie potrebné množstvo vzorky. Potom sa obsah striekačky nastrekne do plynového chromatografu.

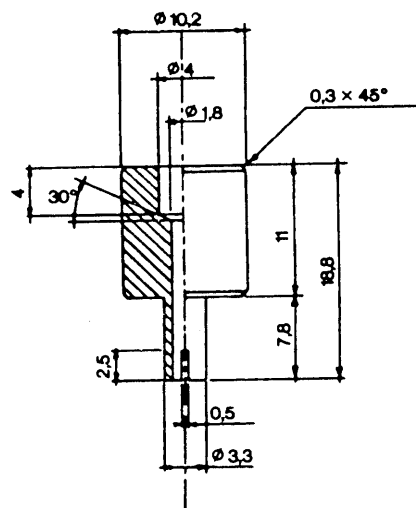
5.4.2.2. *Príslušenstvo* - injekčná striekačka pre plynovú chromatografiu série A2 na „presné dávkovanie vzoriek“ s objemom 25 μ l alebo 50 μ l (obrázok č. 5) alebo ekvivalent. Táto striekačka je na ihlovom konci vybavená posuvným ventilom. Striekačka sa pripája k vzorkovnici pomocou spojovacej súčiastky na fľaši a polyetylénovej hadičky (dĺžka 8 mm, vnútorný priemer 2 – 5 mm) na striekačke.

5.4.2.3. *Postup* - po odobratí príslušného množstva aerosólového výrobku do fľaše na prenášanie vzoriek sa kuželový koniec striekačky pripojí k prečerpávacej fľaši, ako je opísané v 5.4.2.2. Ventil sa otvorí a naberie sa potrebné množstvo kvapaliny. Niekoľkonásobným posúvaním piestu sa odstránia bublinky plynu (ak je to potrebné a striekačka sa ochladí). Keď striekačka obsahuje potrebné množstvo kvapaliny bez bubliniek, ventil sa uzavrie a striekačka sa odpojí od fľaše na prenášanie vzoriek. Nasadí sa ihla, striekačka sa vsunie do dávkovacieho ventilu plynového chromatografu, ventil sa otvorí a vzorka sa nastrekne.

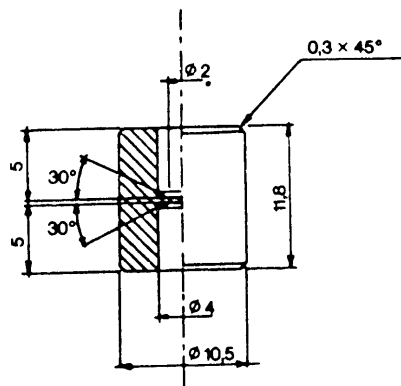
5.4.2.4. *Vnútorný štandard* - ak sa vyžaduje vnútorný štandard, zavedie sa do fľaše na prenášanie vzoriek (prostredníctvom obyčajnej sklenenej striekačky s použitím spojovacej súčiastky).



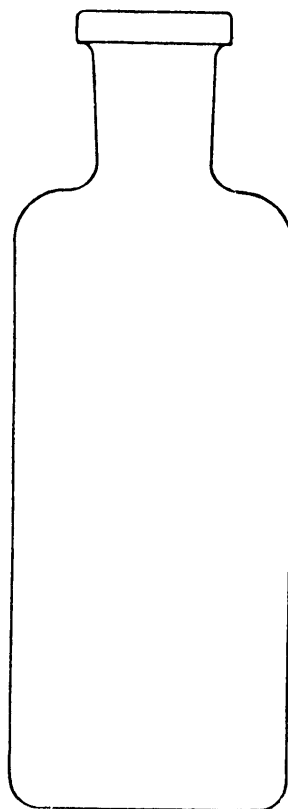
Obrázok č. 1
Spojka P1



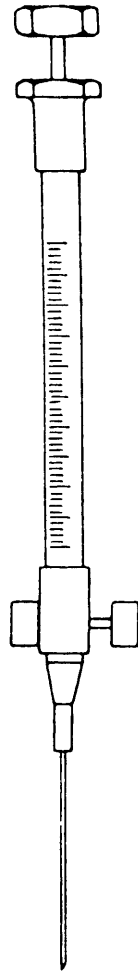
Obrázok č. 2
Spojka M₂ na prenos medzi vnútorným a vonkajším ventilom



Obrázok č. 3
Spojka M_1 na prenos medzi vnútornými ventilmi



Obrázok č. 4
Vzorkovnica s objemom 50 až 100 ml



Obrázok č. 5
Tlaková injekčná striekačka na plyn

3. DÔKAZ A STANOVENIE VOĽNÉHO HYDROXIDU SODNÉHO A HYDROXIDU DRASELNÉHO

(Podľa smernice Komisie 80/1335/EHS z 22. decembra 1980)

1. ROZSAH A OBLASŤ POUŽITIA

Táto metóda určuje postup na dôkaz voľného hydroxidu sodného a/alebo hydroxidu draselného v kozmetických výrobkoch, ktoré ho obsahujú vo významnom množstve a na stanovenie voľného hydroxidu sodného a/alebo draselného vo výrobkoch na narovnávanie vlasov a vo výrobkoch na odstraňovanie prínechtovej kože.

2. DEFINÍCIA

Obsah voľného hydroxidu sodného a hydroxidu draselného je definovaný objemom štandardnej kyseliny, potrebnej na neutralizáciu výrobku, za určených podmienok. Výsledné množstvo sa vyjadří ako hmotnostné percento voľného hydroxidu sodného.

3. PRINCÍP

Vzorka sa rozpustí alebo rozdisperguje vo vode a titruje sa štandardnou kyselinou. Súčasne s pridávaním kyseliny sa zaznamenáva hodnota pH pre jednoduchý roztok hydroxidu sodného alebo draselného je koncový bod titrácie jednoznačne bodom maximálnej zmeny zaznamenávanej hodnoty pH.

Jednoduchá titračná krivka môže byť skreslená prítomnosťou

- a) Amoniak alebo iných slabých organických zásad, ktoré majú sami o sebe pomerne plochú titračnú krivku. Amoniak sa odstráni odparením za zníženého tlaku pri laboratórnej teplote.
- b) Soli slabých kyselín, ktoré môžu spôsobiť, že titračná krivka má niekoľko inflexných bodov. V takýchto prípadoch len prvá časť krivky do prvého z týchto inflexných bodov odpovedá neutralizácii hydroxidového aniónu, pochádzajúceho z voľného hydroxidu sodného alebo draselného.

Alternatívny postup pre titráciu v alkohole je uvedený pre prípad, keď je pozorovaná nadmerná interferencia soľami slabých anorganických kyselín. Existuje teoretická možnosť, že by mohli byť prítomné iné rozpustné silné zásady, napr. hydroxid lítny alebo hydroxidy kvartérnych amóniových solí, ktoré by mohli spôsobiť vysoké pH. Prítomnosť takýchto typov zásad v kozmetických výrobkov je veľmi nepravdepodobná.

4. DÔKAZ

4.1. Činidlá

- 4.1.1. 0,05M roztok dekahydrátu tetraboritanu sodného - štandardný alkalický tlmivý roztok s pH 9,18 pri 25 °C

4.2. Prístroje a pomôcky

- 4.2.1. Bežné laboratórne sklo
- 4.2.2. pH meter
- 4.2.3. Sklenená membránová elektróda
- 4.2.4. Štandardná kalomelová referenčná elektróda

- 4.3. *Postup* - pH meter s elektródami sa okalibruje s použitím štandardného tlmivého roztoku. Pripraví sa 10 % roztok vo vode alebo výrobok, určený na analýzu sa rozdisperguje a prefiltruje sa. Odmeria sa pH. Ak je pH 12 alebo viac, musí sa uskutočniť kvantitatívne stanovenie.

5. STANOVENIE

5.1. **Titrácia vo vodnom prostredí**

5.1.1. Činidlo

5.1.1.1. Štandardná 0,1 N kyselina chlorovodíková

5.1.2. Prístroje a pomôcky

5.1.2.1. Bežné laboratórne sklo

5.1.2.2. pH meter pokiaľ možno so zapisovačom

5.1.2.3. Sklenená membránová elektróda

5.1.2.4. Štandardná kalomelová referenčná elektróda

5.1.3. Postup

Do 150 ml kadičky sa presne naváži skúšobná vzorka v rozmedzí 0,5 g až 1,0 g. Ak je prítomný amoniak, pridá sa niekoľko varných kamienkov, kadička sa umiestni do vákuového exsikátora, evakuuje sa pomocou vodnej vývevy dovtedy, kým nie je detekovateľný zápach amoniaku (asi tri hodiny). Pridá sa 100 ml vody, odparok sa rozpustí alebo rozdisperguje a titruje sa 0,1 N roztokom kyseliny chlorovodíkovej (5.1.1.1.) pri súčasnom zaznamenávaní zmeny hodnoty pH (5.1.2.2).

5.1.4. Výpočet

Na titračných krivkách sa určia inflexné body. Ak sa prvý z inflexných bodov nachádza pri pH nižšom ako 7, vzorka neobsahuje hydroxid sodný alebo draselný. Ak sú na krivke dva alebo viac inflexných bodov, iba prvý z nich je relevantný. Zapiše sa spotreba titračného činidla po prvý inflexný bod.

Kde

V je objem titračného činidla v ml,

M je hmotnosť skúšobnej vzorky v g.

Vzorec pre výpočet obsahu hydroxidu sodného a/alebo draselného vo vzorke, vyjadrený v hmotnostných percentách hydroxidu sodného

$$\% = 0,4 \frac{V}{M}$$

Môže nastať situácia, keď napriek náznaku prítomnosti určitého množstva hydroxidu sodného a/alebo draselného, titračná krivka neposkytuje jednoznačný inflexný bod. V takom prípade sa stanovenie zopakuje v izopropylalkohole.

5.2. **Titrácia v izopropylalkohole**

5.2.1. Činidlá

5.2.1.1. Izopropylalkohol (propán-2-ol)

5.2.1.2. Štandardný 1,0 N vodný roztok kyseliny chlorovodíkovej

5.2.1.3. 0,1 N kyselina chlorovodíková v izopropylalkohole, pripravená tesne pred použitím, zriedením štandardného 1 N vodného roztoku kyseliny chlorovodíkovej izopropylalkoholom.

5.2.2. Prístroje a pomôcky

5.2.2.1. Bežné laboratórne sklo

5.2.2.2. pH meter pokiaľ možno so zapisovačom

5.2.2.3. Sklenená membránová elektróda

5.2.2.4. Štandardná kalomelová referenčná elektróda

5.2.3. *Postup* - Do 150 ml kadičky sa presne naváži skúšobná vzorka v rozsahu 0,5 g až 1,0 g. Ak je prítomný amoniak, pridá sa niekoľko varných kamienkov, kadička sa umiestni do vákuového exsikátora, evakuuje sa pomocou vodnej vývevy dovtedy, kým zápach amoniaku nie je detekovateľný (asi tri hodiny). Pridá sa 100 ml izopropylalkoholu, odparok sa rozpustí alebo rozdisperguje a titruje sa 0,1 N

kyselinou chlorovodíkovou v izopropylalkohole (5.2.1.3) pri súčasnom zaznamenávaní zmeny pH (5.1.2.2).

5.2.4. *Výpočet*

Ako v 5.1.4. Prvý inflexný bod je pri pH okolo 9.

5.3. OPAKOVATEĽNOSŤ²⁾

Pri obsahu hydroxidu sodného alebo draselného v rozmedzí okolo 5 % (hmot.) ako hydroxid sodný rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelne uskutočnených stanovení na tej istej vzorke nesmie presiahnuť v absolútnej hodnote 0,25 %.

²⁾ STN ISO 5725-1 Presnosť (správnosť a zhodnosť) metód a výsledkov merania. Časť 1: Všeobecné zásady a definície, STN ISO 5725-2 Presnosť (správnosť a zhodnosť) metód a výsledkov merania. Časť 2: Základná metóda stanovenia opakovateľnosti a reprodukovateľnosti normalizovanej metódy merania, STN ISO 5725-3 Presnosť (správnosť a zhodnosť) metód a výsledkov merania. Časť 3: Medziľahlé miery zhodnosti normalizovanej metódy merania, STN ISO 5725-4 Presnosť (správnosť a zhodnosť) metód a výsledkov merania. Časť 4: Základné metódy stanovenia správnosti normalizovanej metódy merania, STN ISO 5725-5 Presnosť (správnosť a zhodnosť) metód a výsledkov meraní. Časť 5: Alternatívne metódy stanovenia zhodnosti normalizovanej metódy merania, STN ISO 5725-6 Presnosť (správnosť a zhodnosť) metód a výsledkov merania. Časť 6: Použitie hodnôt mier presnosti v praxi.

4. DÔKAZ A STANOVENIE KYSELINY ŠŤAVEĽOVEJ A JEJ ALKALICKÝCH SOLÍ VO VÝROBKOV NA STAROSTLIVOSŤ O VLASY

(Podľa smernice Komisie 80/1335/EHS z 22. decembra 1980)

1. ROZSAH A OBLASŤ POUŽITIA
Nižšie opísaná metóda je vhodná na stanovenie a dôkaz kyseliny šťaveľovej a jej alkalických solí vo výrobkoch určených na starostlivosť o vlasy. Môže byť použitá pri bezfarebných vodných/alkoholických roztokoch a lotionoch, ktoré obsahujú okolo 5 % kyseliny šťaveľovej alebo ekvivalentné množstvo alkalických šťaveľanov.
2. DEFINÍCIA
Obsah kyseliny šťaveľovej a/alebo jej alkalických solí stanovený touto metódou sa vyjadří ako hmotnostné percento voľnej kyseliny šťaveľovej vo vzorke.
3. PRINCÍP
Po odstránení všetkých prítomných aniónových povrchovo aktívnych látok s hydrochloridom p-toluidínu sa kyselina šťaveľová a/alebo šťaveľany vyzrážajú ako šťaveľan vápenatý, po čom sa roztok prefiltruje. Zrazenina sa rozpustí v kyseline sírovej a titruje sa manganistanom draselným.
4. ČINIDLÁ
Všetky činidlá musia byť analyticky čisté.
 - 4.1. 5 % (hmot.) roztok octanu amónneho
 - 4.2. 10 % (hmot.) roztok chloridu vápenatého
 - 4.3. 95 % (obj.) etanol
 - 4.4. Chlorid uhličité
 - 4.5. Dietyléter
 - 4.6. 6,8 % (hmot.) roztok dihydrochloridu p-toluidínu
 - 4.7. 0,1 N roztok manganistanu draselného
 - 4.8. 20 % (hmot.) kyselina sírová
 - 4.9. 10 % (hmot.) kyselina chlorovodíková
 - 4.10. Trihydrát octanu sodného
 - 4.11. Ľadová kyselina octová
 - 4.12. Kyselina sírová (1:1)
 - 4.13. Nasýtený roztok hydroxidu bárnatého
5. PRÍSTROJE A POMÔCKY
 - 5.1. Oddeľovacie lieviky 500 ml
 - 5.2. Kadičky 50 ml a 600 ml
 - 5.3. Sklenené filtračné tégly G-4
 - 5.4. Odmerné valce 25 ml a 100 ml
 - 5.5. Pipety 10 ml
 - 5.6. Odsávacie banky 500 ml
 - 5.7. Vodná výveva
 - 5.8. Teplomer delený od 0 do 100 °C
 - 5.9. Magnetické miešadlo s vyhrievacím telesom
 - 5.10. Magnetické miešadielka, potiahnuté teflónom
 - 5.11. Byreta 25 ml
 - 5.12. Kuželovité banky 250 ml

6. POSTUP

- 6.1. Do 50 ml kadičky sa naváži okolo 6 až 7 g vzorky, pH sa upraví zriedenou kyselinou chlorovodíkovou (4.9.) na 3 a spláchne sa 100 ml destilovanej vody do oddeľovacieho lievika. Jeden po druhom sa pridá 25 ml etanolu (4.3.), 25 ml roztoku dihydrochloridu p-toluidínu (4.6.) a 25 až 30 ml chloridu uhličitého (4.4.) a zmes sa intenzívne pretrepe.
- 6.2. Po oddelení fáz sa odpustí dolná organická fáza, s použitím činidiel uvedených v 6.1. sa extrakcia zopakuje a znova sa odpustí organická fáza.
- 6.3. Vodný roztok sa zmyje do 600 ml kadičky a stále prítomný zvyšok chloridu uhličitého sa odstráni prevarením roztoku.
- 6.4. Pridá sa 50 ml roztoku octanu amónneho (4.1.), roztok sa zahreje do varu (5.9.) a za miešania sa do roztoku vo vare pridá 10 ml horúceho roztoku chloridu vápenatého (4.2.); zrazenina sa nechá usadiť.
- 6.5. Pridaním niekoľkých kvapiek roztoku chloridu vápenatého (4.2.) sa overí, či je vyzrážanie úplné, nechá sa ochladiť na laboratórnu teplotu a potom sa za miešania (5.10.) pridá 200 ml etanolu (4.3.); nechá sa stáť 30 minút.
- 6.6. Prefiltruje sa cez sklenený filtračný téglík (5.3.), zrazenina sa preniesie malým množstvom horúcej vody (50 až 60 °C) na filter téglíka a zrazenina sa premyje studenou vodou.
- 6.7. Zrazenina sa päťkrát premyje malým množstvom etanolu (4.3.), potom päťkrát malým množstvom dietyléteru (4.5.) a zrazenina sa rozpustí v 50 ml horúcej kyseliny sírovej (4.8.) presatím kyseliny cez filter téglíka za zníženého tlaku.
- 6.8. Roztok sa kvantitatívne preniesie do kužeľovitej banky (5.11.) a titruje sa roztokom manganistanu draselného (4.7.), kým sa nesfarbí na slabo ružovo.

7. VÝPOČET

Obsah vzorky vyjadrený ako hmotnostné percentá kyseliny šťaveľovej sa vypočíta podľa vzorca

$$\% \text{ kyseliny šťaveľovej} = \frac{A \times 4,50179 \times 100}{E \times 1000}$$

Kde

A je spotreba 0,1 N roztoku manganistanu draselného (6.8.),

E je množstvo skúšobnej vzorky v gramoch (6.1),

4,50179 je prepočítavací faktor pre kyselinu šťaveľovú.

8. OPAKOVATELNOSŤ²⁾

Pri obsahu kyseliny šťaveľovej okolo 5 %, rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelne uskutočnených stanovení na tej istej vzorke nesmie presiahnuť v absolútnej hodnote 0,15 %.

9. DÔKAZ

9.1. Princíp

Kyselina šťaveľová a/alebo šťaveľany sa vyzrážajú ako šťaveľan vápenatý a rozpustí sa v kyseline sírovej. Do roztoku sa pridá malé množstvo manganistanu draselného, ktorý sa odfarbuje a spôsobuje vznik oxidu uhličitého. Keď sa vznikajúci oxid uhličitý prepúšťa cez roztok hydroxidu bárnateho, vzniká biela zrazenina (mliečny zákal) uhličitanu bárnateho.

9.2. *Postup*

- 9.2.1. Skúšobná vzorka určená na analýzu sa spracuje podľa postupu v častiach (6.1. až 6.3.); tým sa odstráni akékoľvek prítomné detergenty.
- 9.2.2. K približne 10 ml roztoku, získaného podľa 9.2.1. sa pridá za špičku špachtle octanu sodného (4.10.) a roztok sa okyslí niekoľkými kvapkami ľadovej kyseliny otcovej (4.11.).
- 9.2.3. Pridá sa 10 % roztok chloridu vápenatého (4.2.) a prefiltruje sa. Šťaveľan vápenatý sa rozpustí v 2 ml kyseliny sírovej (1:1) (4.12.).
- 9.2.4. Roztok sa preniesie do skúmavky a po kvapkách sa pridá asi 0,5 ml 0,1 M roztoku manganistanu draselného (4.7.). Ak sú prítomné šťaveľany, roztok sa odfarbuje najskôr pomaly a potom rýchlo.
- 9.2.5. Ihneď po pridaní manganistanu draselného sa skúmavka uzavrie vhodnou zátkou so sklenenou trubičkou, obsah sa mierne zahrieva a vznikajúci oxid uhličitý sa zachytáva do nasýteného roztoku hydroxidu bárnateho (4.13.). Objavenie sa mliečneho zákalu uhličitanu bárnateho do troch až piatich minút je dôkazom prítomnosti kyseliny šťaveľovej.

5. STANOVENIE CHLOROFORMU V ZUBNÝCH PASTÁCH

(Podľa smernice Komisie 80/1335/EHS z 22. decembra 1980)

1. ROZSAH A OBLASŤ POUŽITIA

Táto metóda sa používa na stanovenie chloroformu v zubných pastách plynovou chromatografiou. Táto metóda je vhodná na stanovenie chloroformu s úrovňami obsahu 5 % a menej.

2. DEFINÍCIA

Obsah chloroformu stanovený touto metódou sa vyjadří v hmotnostných percentách výrobku.

3. PRINCÍP

Zubná pasta sa suspenduje v zmesi dimetylformamid/metanol, do ktorej sa pridá známe množstvo acetonitrilu ako vnútorného štandardu. Po odstredení na centrifúge sa časť kvapalnej fázy podrobí plynovej chromatografii a vypočíta sa obsah chloroformu.

4. ČINIDLÁ

Všetky činidlá musia byť analyticky čisté.

4.1. Porapak Q, Chromosorb 101 alebo ekvivalent, 80 až 100 mesh

4.2. Acetonitril

4.3. Chloroform

4.4. Dimetylformamid

4.5. Metanol

4.6. Roztok vnútorného štandardu - do 50 ml odmernej banky sa napipetuje 5 ml dimetylformamidu (4.4) a pridá sa asi 300 mg („M“ v miligramoch) acetonitrilu. Doplní sa po značku dimetylformamidom a premieša sa.

4.7. Roztok na stanovenie relatívneho odozvového faktora - do 10 ml odmernej banky sa napipetuje presne 5 ml roztoku vnútorného štandardu (4.6.) a pridá sa asi 300 mg („M₁“ v miligramoch) chloroformu. Doplní sa po značku dimetylformamidom a premieša sa.

5. PRÍSTROJE A POMÔCKY

5.1. Analytické váhy

5.2. Plynový chromatograf s plameňovo-ionizačným detektorom

5.3. Mikrostriekačky 5 až 10 µl, delené po 0,1 µl

5.4. Nedelené pipety 1, 4 a 5 ml

5.5. Odmerné banky 10 a 50 ml

5.6. Skúmavky 20 ml so skrutkovacími uzávermi, Sovirel France č. 20 alebo ekvivalent, Skrutkovací uzáver má vnútornú tesniacu platničku pokrytú z jednej strany teflónom

5.7. Centrifúga

6. POSTUP

6.1. *Vhodné podmienky pre plynovú chromatografiu*

- 6.1.1. Materiál kolóny sklo
Dĺžka 150cm
Vnútorný priemer 4 mm
Vonkajší priemer 6 mm

- 6.1.2. Kolóna sa naplní pomocou vibrátora Porapakom Q, Chromosorb 101 alebo ekvivalentom, 80 až 100 mesh (4.1.), upraveného kyselinou.
- 6.1.3. Citlivosť plameňovo-ionizačného detektora sa nastaví tak, aby po nastreknutí 3 µl roztoku (4.7.) výška píku acetonitrilu siahala asi do troch štvrtín maximálnej výchylky.
- 6.1.4. *Plyny*
Nosný plyn - dusík, prietoková rýchlosť 65 ml/min
Prietok plynov do detektora sa nastaví tak, že prietok vzduchu alebo kyslíka je päť- až desaťkrát väčší ako prietok vodíka.
- 6.1.5. *Teplota*
Dávkovací ventil 210 ° C
Detektor 210 ° C
Kolónová pec 175 ° C
- 6.1.6. *Rýchlosť zapisovača* - okolo 100 cm za hodinu.
- 6.2. **Príprava vzorky**
Na analýzu sa použije neporušená uzatvorená tuba, odstráni sa jedna tretina obsahu, tube sa uzavrie, obsah sa starostlivo premieša a potom sa odoberie skúšobná vzorka.
- 6.3. **Stanovenie**
- 6.3.1. Do skúmavky so skrutkovacím uzáverom (5.6.) sa s presnosťou na 10 mg naváži 6 až 7 g („M₀“ v gramoch) zubnej pasty, pripravenej v súlade s (6.2.) a pridajú sa tri malé sklenené guľôčky.
- 6.3.2. Do skúmavky sa napipetuje presne 5 ml roztoku vnútorného štandardu (4.6.), 4 ml dimetylformamidu (4.4.) a 1 ml metanolu (4.5.). Skúmavka sa uzavrie a premieša sa.
- 6.3.3. Pretrepáva sa pol hodiny na mechanickej trepačke a uzavretá skúmavka sa odstredí 15 minút na centrifúge pri takej rýchlosti, ktorá spôsobí úplnú separáciu fáz.
Poznámka: Niekedy sa môže stať, že kvapalná fáza aj po odstredovaní na centrifúge ostáva stále zakalená. Určité vylepšenie sa môže dosiahnuť pridaním 1 až 2 g chloridu sodného do kvapalnej fázy, nechá sa usadiť a znova sa odstredí na centrifúge.
- 6.3.4. Za podmienok podľa 6.1. sa nastreknú 3 µl tohto roztoku (6.3.3.). Táto operácia sa zopakuje. Za vyššie opísaných podmienok môžu byť pre usmernenie uvedené nasledovné retenčné časy
metanol približne jedna minúta,
acetonitril približne 2,5 minúty,
chloroform približne šesť minút,
dimetylformamid > 15 minút.
- 6.3.5. *Stanovenie relatívneho odozvového faktora*
Pre stanovenie tohto faktora sa nastreknú 3 µl roztoku (4.7.). Táto operácia sa zopakuje. Relatívny odozvový faktor sa stanovuje denne.

7. VÝPOČTY

7.1. Výpočet relatívnej odozvy

- 7.1.1. Zmeria sa výška a šírka v polovičnej výške pre píky acetonitrilu a chloroformu a vypočíta sa plocha oboch pík podľa vzorca výška × šírka v polovičnej výške.
- 7.1.2. Stanoví sa plocha pík acetonitrilu a chloroformu v chromatogramoch získaných v súlade s časťou (6.3.5.) a relatívna odozva f_s sa vypočíta podľa vzorca

$$f_s = \frac{A_s \cdot M_i}{M_s \cdot A_i} = \frac{A_s \cdot \frac{1}{10} M}{M_1 \cdot A_i}$$

Kde

f_s je relatívny odozvoový faktor pre chloroform,

A_s je plocha píku chloroformu (6.3.5),

A_i je plocha píku acetonitrilu (6.3.5),

M_s je množstvo chloroformu v mg na 10 ml roztoku uvedeného v častiach 6.3.5. (M_1),

M_i je množstvo acetonitrilu v mg na 10 ml roztoku uvedeného v častiach 6.3.5. ($1/10M$).

Z odčítaných hodnôt sa vypočíta priemerná hodnota.

7.2. **Výpočet obsahu chloroformu**

7.2.1. Z chromatogramov, získaných v častiach 6.3.4. sa v súlade s bodom 7.1.1. vypočíta plocha píku chloroformu a acetonitrilu.

7.2.2. Obsah chloroformu v zubnej paste sa vypočíta podľa vzorca

$$\% X = \frac{A_s \cdot M_i}{f_s \cdot M_{sx} \cdot A_i} 100 \% = \frac{A_s \cdot M}{f_s \cdot A_i \cdot M_0 \cdot 100}$$

Kde

$\% X$ je obsah chloroformu v zubnej paste vyjadrený v hmotnostných percentách,

A_s je plocha píku chloroformu (6.3.4),

A_i je plocha píku acetonitrilu (6.3.4),

M_{sx} je množstvo vzorky uvedenej v 6.3.1 v mg ($1\ 000 M_0$),

M_i je množstvo acetonitrilu v mg na 10 ml roztoku pripravenom v súlade s 6.3.2 ($1/10 M$).

Zo zistených hladín úrovne obsahu sa s presnosťou na 0,1 % vypočíta priemerná hodnota.

8. OPAKOVATELNOSŤ²⁾

Pri obsahu chloroformu okolo 3 % rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelne uskutočnených stanovení na tej istej vzorke nesmie presiahnuť v absolútnej hodnote 0,3 %.

6. STANOVENIE ZINKU

(Podľa smernica Komisie 80/1335/EHS z 22. decembra 1980, zmenená a doplnená smernicou Komisie 87/143/EHS z 10. februára 1987)

1. ROZSAH A OBLASŤ POUŽITIA

Táto metóda je vhodná na stanovenie zinku, prítomného ako chlorid, síran alebo 4-hydroxybenzénsulfonát, alebo ako zmes niekoľkých týchto zinočnatých solí, v kozmetických výrobkoch.

2. DEFINÍCIA

Obsah zinku vo vzorke sa stanoví gravimetricky ako bis(2-metyl-8-chinolyloxid) a vyjadrí sa v hmotnostných percentách zinku vo vzorke.

3. PRINCÍP

Zinok prítomný vo vzorke sa vyzráža v kyslom prostredí ako bis(2-metyl-8-chinolyloxid) zinočnatý. Po odfiltrovaní sa zrazenina vysuší a odváži.

4. ČINIDLÁ

Všetky činidlá musia byť analyticky čisté.

4.1. 25 % (hmot.) koncentrovaný roztok amoniaku; $d \frac{20}{40} = 0,91$

4.2. Ľadová kyselina octová

4.3. Octan amónny

4.4. 2-Metylchinolín-8-ol

4.5. 6 % (m/v) roztok amoniaku - 240 g koncentrovaného amoniaku (4.1.) sa preniesie do 1 000 ml odmernej banky, doplní sa destilovanou vodou po značku a premieša sa.

4.6. 0,2 M roztok octanu amónneho - 15,4 g octanu amónneho (4.3.) sa rozpustí v destilovanej vode, doplní sa v 1 000 ml odmernej banke po značku a premieša sa.

4.7. Roztok 2-metylchinolín-8-olu - 5 g 2-metylchinolín-8-olu sa rozpustí v 12 ml ľadovej kyseliny octovej a destilovanou vodou sa preniesie do 100 ml odmernej banky. Doplní sa destilovanou vodou po značku a premieša sa.

5. PRÍSTROJE A POMÔCKY

5.1. Odmerné banky 100 a 1 000 ml

5.2. Kadičky 400 ml

5.3. Odmerné valce 50 a 150 ml

5.4. Delené pipety 10 ml

5.5. Sklenené filtračné tégly G-4

5.6. Vákuové banky 500 ml

5.7. Vodná výveva

5.8. Teplomer delený od 0 do 100 ° C

5.9. Exsikátor s vhodným sušidlom a indikátorom vlhkosti, napr. silikagél alebo ekvivalent

5.10. Sušička s reguláciou teploty na 150 ± 2 ° C

5.11. pH meter

5.12. Vyhrievacia platňa

6. POSTUP

Do 400 ml kadičky sa naváži 5 až 10 g („M“ v gramoch) vzorky určenej na analýzu, obsahujúcej približne 50 až 100 mg zinku, pridá sa 50 ml destilovanej vody a premieša sa.

- 6.1.1 Zmes sa podľa potreby prefiltruje pomocou vývevy a filtrát sa zachytí.
- 6.1.2 Extrakcia sa opakuje s ďalšími 50 ml destilovanej vody, prefiltruje sa a filtráty sa zlúčia.
- 6.2. Na každých 10 mg zinku prítomného v roztoku (6.1.2.) sa pridá 2 ml roztoku 2-metylchinolín-8-olu (4.7.) a premieša sa.
- 6.3. Zmes sa zriedi 150 ml destilovanej vody, zahreje sa na teplotu 60 ° C (5.12.) a za stáleho miešania sa pridá 45 ml 0,2 M roztoku octanu amónneho (4.6.).
- 6.4. pH roztoku sa upraví za stáleho miešania 6 % (hmot.) roztokom amoniaku (4.5.) na 5,7 až 5,9. Na meranie pH roztoku sa použije pH meter.
- 6.5. Roztok sa nechá stáť 30 minút. Prefiltruje sa pomocou vodnej vývevy cez G-4 filter téglíka, ktorý sa vopred vysuší (150 ° C) a po ochladení odváži („M₀“ v gramoch). Zrazenina sa premyje 150 ml 95 ° C destilovanej vody.
- 6.6. Téglík sa umiestni do sušičky, nastavenej na 150 ° C a suší sa jednu hodinu.
- 6.7. Téglík sa vyberie zo sušičky, umiestni sa do exsikatora (5.9.) a po ochladení na laboratórnu teplotu sa určí jej hmotnosť („M₁“ v gramoch).

7. VÝPOČTY

Obsah zinku vo vzorke v hmotnostných percentách sa vypočíta podľa vzorca

$$\% \text{ zinku} = \frac{(M_1 - M_0) \times 17,12}{M}$$

Kde

M je hmotnosť vzorky odobratej (6.1) v gramoch,

M₀ je hmotnosť prázdneho a suchého téglíka s filtrom (6.5) v gramoch,

M₁ je hmotnosť téglíka s filtrom a zrazeninou (6.7) v gramoch.

8. OPAKOVATELNOSŤ²⁾

Pri obsahu zinku okolo 1 % (hmot.) rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelne uskutočnených stanovení na tej istej vzorke nesmie presiahnuť v absolútnej hodnote 0,1 %.

7. DÔKAZ A STANOVENIE KYSELINY 4-HYDROXYBENZÉNSULFÓNOVEJ (Podľa smernice Komisie 80/1335/EHS z 22. decembra 1980)

1. ROZSAH A OBLASŤ POUŽITIA
Táto metóda je vhodná na dôkaz a stanovenie kyseliny 4-hydroxybenzénsulfónovej v kozmetických výrobkoch, ako sú aerosóly a pleťové lotiony.
2. DEFINÍCIA
Obsah kyseliny 4-hydroxybenzénsulfónovej, stanovený v súlade s touto metódou sa vyjadří v hmotnostných percentách bezvodého zinkium 4-hydroxybenzénsulfonátu vo výrobku.
3. PRINCÍP
Skúšobná vzorka sa zahustí za zníženého tlaku, rozpustí vo vode a prečistí extrakciou chloroformom. Stanovenie kyseliny 4-hydroxybenzénsulfónovej sa uskutoční jodometricky na alikvotnej časti prefiltrovaného vodného roztoku.
4. ČINIDLÁ
Všetky činidlá musia byť analyticky čisté.
 - 4.1. 36 % (hmot.) koncentrovaná kyselina chlorovodíková ($d \frac{20}{40} = 1,18$)
 - 4.2. Chloroform
 - 4.3. Bután-1-ol
 - 4.4. Ľadová kyselina octová
 - 4.5. Jodid draselný
 - 4.6. Bromid draselný
 - 4.7. Uhličitan sodný
 - 4.8. Kyselina sulfanilová
 - 4.9. Dusitan sodný
 - 4.10. 0,1 N roztok bromičnanu draselného
 - 4.11. 0,1 N roztok tiosíranu sodného
 - 4.12. 1 % (m/v) vodný roztok škrobu
 - 4.13. 2 % (m/v) vodný roztok uhličitanu sodného
 - 4.14. 4,5 % (m/v) vodný roztok dusitanu sodného
 - 4.15. 0,05 % (m/v) roztok ditizónu v chloroforme
 - 4.16. Vyvíjacie rozpúšťadlo - bután-1-ol/ľadová kyselina octová/voda (4:1:5 v objemových dieloch). Po zmiešaní v oddeľovacom lieviku sa odstráni dolná fáza.
 - 4.17. Paulyho činidlo - 4,5 g kyseliny sulfanilovej (4.8.) sa za zahrievania rozpustí v 45 ml koncentrovanej kyseliny chlorovodíkovej (4.1.) a roztok sa zriedi vodou do 500 ml. 10 ml roztoku sa ochladí v nádobe s ľadovou vodou a za stáleho miešania sa pridá 10 ml ochladeného roztoku dusitanu sodného (4.14.). Roztok sa nechá stáť 15 minút pri 0 °C (pri tejto teplote ostáva roztok stabilný jeden až tri dni) a tesne pred nanesením (7.5.) sa pridá 20 ml roztoku uhličitanu sodného (4.13.).
 - 4.18. Hotové celulózové platne pre tenkovrstvovú chromatografiu; rozmery 20 × 20 cm, hrúbka vrstvy adsorbentu 0,25 mm
5. PRÍSTROJE A POMÔCKY
 - 5.1. Banky s guľatým dnom so zábrusovou sklenenou zátkou 100 ml
 - 5.2. Oddeľovací lievik 100 ml
 - 5.3. Kuželovitá banka so zábrusovou sklenenou zátkou 250 ml

- 5.4. Byreta 25 ml
- 5.5. Nedelené pipety 1, 2 a 10 ml
- 5.6. Delená pipeta 5 ml
- 5.7. Mikrostriekačka 10 μ l, delená po 0,1 μ l
- 5.8. Teplomer, delený od 0 do 100 °C
- 5.9. Vodný kúpeľ, vybavený vyhrievacím telesom
- 5.10. Sušička s dobrým vetraním, nastaviteľná na 80 °C
- 5.11. Bežná aparátúra na uskutočnenie tenkovrstvovej chromatografie

6. PRÍPRAVA VZORKY

Pri nižšie opísanej metóde na dôkaz a stanovenie kyseliny 4-hydroxybenzén-sulfónovej v aerosóloch sa použije zvyšok, získaný uvoľnením tých rozpúšťadiel a hnacích plynov z aerosólu, ktoré sa môžu odpariť za normálneho tlaku.

7. DÔKAZ

- 7.1. S pomocou mikrostriekačky (5.7.) sa na každý zo šiestich bodov na čiare štartu, vo vzdialenosti 1 cm od spodného okraja tenkovrstvovej platne (4.18.), naniesie po 5 μ l odparku (6.) alebo vzorky.
- 7.2. Platňa sa umiestni do vyvíjacej komory, ktorá už obsahuje vyvíjacie rozpúšťadlo (4.16.) a vyvíja sa, kým čelo rozpúšťadla nedosiahne 15 cm od čiary štartu.
- 7.3. Platňa sa vyberie z kúpeľa a vysuší sa pri 80 °C, dovtedy, kým už nie sú vnímateľné pary kyseliny octovej. Platňa sa postrieka roztokom uhličitanu sodného (4.13) a vysuší sa na vzduchu.
- 7.4. Jedna polovica platne sa prikryje sklenenou platňou a neprikrytá časť sa postrieka 0,05 % roztokom ditizónu (4.15.). Objavenie sa fialovo červených škvŕn na chromatograme je dôkazom prítomnosti zinočnatých iónov.
- 7.5. Postriekaná polovica platne sa prikryje sklenenou platňou a druhá polovica sa postrieka Paulyho činidlom (4.17.). Dôkazom prítomnosti kyseliny 4-hydroxybenzénsulfónovej je objavenie sa žltu hnedých škvŕn s R_F hodnotou okolo 0,26, kým žlté škvŕny s R_F hodnotou okolo 0,45 na chromatograme sú dôkazom prítomnosti kyseliny 3-hydroxybenzénsulfónovej.

8. STANOVENIE

- 8.1. Do 100 ml banky s guľatým dnom sa naváži 10 g vzorky alebo zvyšku (6.) a odparí sa na vodnom kúpeli, vyhriatom na 40 °C na rotačnej vákuovej odparke za vákua takmer do sucha.
- 8.2. Do banky sa napipetuje 10,0 ml („ V_1 “ v mililitroch) vody a zvyšok po odparení (8.1.) sa za zahrievania rozpustí.
- 8.3. Roztok sa kvantitatívne prenesie do oddelovacieho lievika (5.2.) a vodný roztok sa extrahuje dvakrát 20 ml dávkami chloroformu (4.2.). Chloroformová fáza sa po každej extrakcii odstráni.
- 8.4. Vodný roztok sa prefiltruje cez skladaný filter. V závislosti od očakávaného obsahu kyseliny hydroxybenzénsulfónovej sa do 250 ml kužeľovitej banky (5.3.) napipetuje 1,0 až 2,0 ml („ V_2 “ v mililitroch) filtrátu a zriedi sa do 75 ml vodou.
- 8.5. Pridá sa 2,5 ml 36 % kyseliny chlorovodíkovej (4.1.) a 2,5 g bromidu draselného (4.6.), premieša sa a roztok sa na vodnom kúpeli zahreje na teplotu 50 °C.
- 8.6. Z byrety sa pridáva 0,02 N roztok bromičnanu draselného (4.10.), kým sa roztok zahriaty na 50 °C nesfarbí na žltu.
- 8.7. Pridajú sa ďalšie 3,0 ml roztoku bromičnanu draselného (4.10.), banka sa zazátkuje a nechá sa stáť 10 minút na vodnom kúpeli pri 50 °C. Ak roztok po 10 minútach

stratí sfarbenie, pridajú sa ďalšie 2,0 ml roztoku bromičnanu draselného (4.10.), banka sa zazátkuje a zahrieva sa 10 minút na vodnom kúpeli, zahriatom na 50 °C. Zaznamená sa celkové množstvo pridaného roztoku bromičnanu draselného (a).

- 8.8. Roztok sa ochladí na laboratórnu teplotu, pridajú sa 2,0 g jodidu draselného (4.5.) a premieša sa.
- 8.9. Vzniknutý jód sa titruje 0,1 N roztokom tiosíranu sodného (4.11.). Pred koncom titrácie sa pridá niekoľko kvapiek roztoku škrobu (4.12.), ako indikátor. Zaznamená sa spotrebované množstvo roztoku tiosíranu sodného (b).

9. VÝPOČET

Obsah zinkium-hydroxybenzénsulfonátu vo vzorke alebo vo zvyšku (6.) v hmotnostných percentách sa vypočíta podľa vzorca

$$\% \text{ zinkium hydroxybenzénsulfonátu} = \frac{(a - b) \times V_1 \times 0,00514 \times 100}{m \times V_2}$$

Kde

a je celkové množstvo pridaného 0,1 N roztoku bromičnanu draselného v mililitroch (8.7.),

b je množstvo 0,1 N roztoku tiosíranu sodného spotrebovaného na spätnú titráciu (8.9.), v mililitroch,

m je množstvo analyzovaného výrobku alebo odparku (8.1.), vyjadreného v miligramoch,

V_1 je objem roztoku získaného v súlade s 8.2, vyjadrený v mililitroch,

V_2 je objem rozpusteného zvyšku po odparení, použitého na analýzu (8.4.), vyjadrený v mililitroch.

V prípade aerosólov sa výsledok hmotnostných percent odparku (6.) musí vyjadriť vzhľadom na pôvodný výrobok. Za účelom tohto prepočtu sa uvedie odkaz na odber vzoriek z aerosólov.

10. OPAKOVATELNOSŤ ²⁾

Pri obsahu zinkium-hydroxybenzénsulfonátu okolo 5 %, nesmie rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelne uskutočnených stanovení na tej istej vzorke presiahnuť absolútnu hodnotu 0,5 %.

11. INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Podľa osobitného predpisu ³⁾ je najvyššie povolený obsah zinkium 4-hydroxybenzénsulfonátu v pleťových lotionoch a dezodorantoch 6 % (hmot.). Toto vyjadrenie znamená, že popri obsahu kyseliny hydroxybenzénsulfónovej sa musí stanoviť obsah zinku. Vynásobením vypočítaného obsahu zinkium-hydroxybenzénsulfonátu (9) faktorom 0,1588 sa získa minimálny obsah zinku v hmotnostných percentách, ktorý musí byť teoreticky prítomný vo výrobku vzhľadom na stanovený obsah kyseliny hydroxybenzénsulfónovej. Skutočný obsah zinku, stanovený gravimetricky, však môže byť vyšší, pretože v kozmetických výrobkoch môže byť použitý aj chlorid zinočnatý a síran zinočnatý.

³⁾ Vyhláška Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky č. 156/2004, ktorou sa ustanovujú požiadavky na kozmetické výrobky

8. DÔKAZ OXIDAČNÝCH ČINIDIEL A STANOVENIE PEROXIDU VODÍKA VO VÝROBKOCH VLASOVEJ KOZMETIKY

(Podľa smernica Komisie 82/434/EHS zo 14. mája 1982)

ÚČEL A OBLASŤ POUŽITIA

Jódometrické stanovenie peroxidu vodíka v kozmetike je možné len v neprítomnosti ostatných oxidačných činidiel, ktoré vytvárajú jód z jodidov. V dôsledku toho je pred jódometrickým stanovením peroxidu vodíka potrebné detekovať a identifikovať každé iné prítomné oxidačné činidlo. Tento dôkaz pozostáva z dvoch fáz, kde prvá zahŕňa peroxosíran, bromičnan a peroxid vodíka a druhá peroxid bárnatý.

A. DÔKAZ PEROXOSÍRANOV, BROMIČNANOV A PEROXIDU VODÍKA

1. PRINCÍP

Peroxosíran sodný, peroxosíran draselný a peroxosíran amónny; bromičnan draselný, bromičnan sodný a peroxid vodíka aj ten, ktorý pochádza z peroxidu bárnateho, sa dokazujú zostupnou papierovou chromatografiou s použitím dvoch vyvíjajúcich rozpúšťadiel.

2. ČINIDLÁ

Všetky činidlá musia byť analyticky čisté.

2.1. 0,5 % (m/v) vodné referenčné roztoky nasledovných zlúčenín

2.1.1. Peroxosíran sodný

2.1.2. Peroxosíran draselný

2.1.3. Peroxosíran amónny

2.1.4. Bromičnan draselný

2.1.5. Bromičnan sodný

2.1.6. Peroxid vodíka

2.2. Vyvíjacie rozpúšťadlo A - 80 % (obj.) etanol

2.3. Vyvíjacie rozpúšťadlo B - benzén/metanol/3-metylbután-1-ol/voda (v objemových dieloch 34:38:18:10)

2.4. Detekčné činidlo A - 10 % (m/v) vodný roztok jodidu draselného

2.5. Detekčné činidlo B - 1 % (m/v) vodný roztok škrobu

2.6. Detekčné činidlo C - 10 % (hmot.) roztok kyseliny chlorovodíkovej

2.7. 4 N roztok kyseliny chlorovodíkovej

3. PRÍSTROJE A POMÔCKY

3.1. Chromatografický papier (Whatman č. 3 a 4 alebo ich ekvivalent)

3.2. Mikropipeta 1 μ l

3.3. Odmerné banky 100 ml

3.4. Skladané filtre

3.5. Vyvíjacia komora na zostupnú papierovú chromatografiu

4. PRÍPRAVA VZORKY

4.1. Výrobky rozpustné vo vode

Z každej vzorky sa pripraví dva roztoky rozpustením 1g a 5g výrobku v 100 ml vody. 1 μ l každého z týchto roztokov sa použije na papierovú chromatografiu, opísanú v (5.).

- 4.2. *Výrobky málo rozpustné vo vode*
- 4.2.1. 1 g a 5 g vzorky sa disperguje v 50 ml vody, obidve disperzie sa doplnia do 100 ml vodou, premiešajú sa a prefiltrujú cez skladaný filter (3.4.). Na uskutočnenie papierovej chromatografie, opísanej v odseku 5 sa použije 1 μ l každého z filtrátov.
- 4.2.2. Ešte raz sa pripraví dve disperzie z každej vzorky, dispergovaním 1 g a 5 g v 50 ml vody. Okyslia sa zriedenou kyselinou chlorovodíkovou (2.7.), doplnia vodou do 100 ml a premiešajú sa. Disperzie sa prefiltrujú cez skladaný filter (3.4.) a na uskutočnenie papierovej chromatografie, opísanej v odseku 5, sa použije po 1 μ l každého z filtrátov.

4.3. **Krémy**

V 100 ml vody sa disperguje 5 g a 20 g každého výrobku a na uskutočnenie papierovej chromatografie, opísanej v odseku 5, sa použijú tieto disperzie.

5. METÓDA

- 5.1. Na uskutočnenie zostupnej papierovej chromatografie sa dá primerané množstvo rozpúšťadiel A (2.2.) a B (2.3.) do dvoch samostatných chromatografických vyvíjacích komôr.
- 5.2. Na štartovaciu čiaru pásu chromatografického papiera (Whatman č. 3 alebo jeho ekvivalent), dlhého 40 cm a širokého 20 cm (3.1.) alebo inej vhodnej veľkosti, sa naniesie 1 μ l jedného roztoku vzorky a jedného referenčného roztoku.
- 5.3. Tento pás chromatografického papiera (5.2.) sa umiestni do chromatografickej vyvíjacej komory, naplnenej rozpúšťadlom A (5.1.) a nechá sa vyvíjať, kým čelo rozpúšťadla nedosiahne 35 cm (asi 15 hodín).
- 5.4. S použitím ďalšieho pásu chromatografického papiera (Whatman č. 4 alebo jeho ekvivalent) (3.1.) a vyvíjacieho rozpúšťadla B sa zopakuje postup, opísaný v častiach (5.2. a 5.3.). Chromatogram sa nechá vyvíjať, kým čelo rozpúšťadla nedosiahne 35 cm (asi päť hodín).
- 5.5. Po vyvíjaní sa chromatogramy vyberú a vysušia na vzduchu.
- 5.6. Škvryny na chromatograme sa zviditeľnia ich postriekaním
- 5.6.1. Detekčným činidlom A (2.4.) a krátko na to, detekčným činidlom B (2.5.). Prvé sa na chromatograme objavia škvryny peroxosíranov, nasledované škvrynami peroxidu vodíka. Škvryny sa označia ceruzkou.
- 5.6.2. Detekčným činidlom C (2.6.) na chromatogram, získaný podľa 5.6.1. Prítomnosť bromičnanov sa preukáže sivo modrými škvrynami.
- 5.7. Za vyššie uvedeníých podmienok, vzťahujúcich sa na vyvíjacie rozpúšťadlá A (2.2.) a B (2.3), sú R_f hodnoty referenčných látok (2.1.) približne nasledovné

	Vyvíjacie činidlo A (2.2.)	Vyvíjacie činidlo B (2.3.)
Peroxosíran sodný	0,40	0,10
Peroxosíran draselný	0,40	0,02 + 0,05
Peroxosíran amónny	0,50	0,10 + 0,20
Bromičnan draselný	0,40	0,20
Bromičnan sodný	0,40	0,10 + 0,20
Peroxid vodíka	0,80	0,80

B. DÔKAZ PEROXIDU BÁRNATÉHO

1. PRINCÍP

Peroxid bárnatý sa dokáže na základe vzniku peroxidu vodíka po okyslení vzorky (A.4.2.) a na základe prítomnosti bárnateho iónu:

- a) v neprítomnosti peroxosíranov (A), pridaním zriedenej kyseliny sírovej k časti kyslého roztoku vzorky (B.4.1.), v dôsledku čoho sa vytvorí biela zrazenina síranu bárnateho. Prítomnosť bárnatých iónov vo vzorke (B.4.1.) sa opäť potvrdí papierovou chromatografiou nižšie opísaným spôsobom (B.5.).
- b) ak sú súčasne prítomné peroxid bárnatý a peroxosírany (B.4.2.), upravením zvyšku roztoku (B.4.2.) na alkalický. Po rozpustení v kyseline chlorovodíkovej sa prítomnosť bárnatých iónov potvrdí v roztoku taveniny (B.4.2.3.) papierovou chromatografiou a/alebo vyzrážaním síranu bárnateho.

2. ČINIDLÁ

- 2.1. Metanol
- 2.2. 36 % (hmot.) koncentrovaná kyselina chlorovodíková
- 2.3. 6 N kyselina chlorovodíková
- 2.4. 4 N kyselina chlorovodíková
- 2.5. Disodná soľ kyseliny rodizónovej
- 2.6. Chlorid bárnatý ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- 2.7. Bezvodý uhličitan sodný
- 2.8. 1 % (m/v) vodný roztok chloridu bárnateho
- 2.9. Vyvíjacie rozpúšťadlo, pozostávajúce z metanolu, koncentrovanej kyseliny chlorovodíkovej 36 % a vody (80 : 10 : 10 v objemových dieloch)
- 2.10. Detekčné činidlo, 0,1 % (m/v) vodný roztok disodnej soli kyseliny rodizónovej, čerstvo pripravený pred použitím

3. PRÍSTROJE A POMÔCKY

- 3.1. Mikropipeta 5 μl
- 3.2. Platinové téglíky
- 3.3. Odmerné banky 100 ml
- 3.4. Chromatografický papier Schleicher and Schull 2043 b alebo jeho ekvivalent Papier sa prečistí vyvíjaním cez noc vo vyvíjacej zostupnej chromatografickej komore (A.3.5.), obsahujúcej vyvíjacie rozpúšťadlo (B.2.9.) a potom sa vysuší.
- 3.5. Skladaný filtračný papier
- 3.6. Bežné zariadenie pre uskutočnenie vzostupnej papierovej chromatografie

4. PRÍPRAVA VZORKY

- 4.1. **Výrobky bez prítomnosti peroxosíranu**
 - 4.1.1. 2 g výrobku sa dispergujú v 50 ml vody a pH disperzie sa upraví kyselinou chlorovodíkovou (B.2.3) na približne 1.
 - 4.1.2. Vodná disperzia sa prenesie do 100 ml odmernej banky, doplní sa vodou po značku a premieša sa. Táto disperzia sa použije na papierovú chromatografickú analýzu, opísanú v odseku 5 a na dôkaz bária vyzrážaním síranu.
- 4.2. **Výrobky obsahujúce peroxosírany**
 - 4.2.1. 2 g výrobku sa dispergujú v 100 ml vody a prefiltrujú sa.
 - 4.2.2. K vysušenému zvyšku sa pridá 7 až 10-násobok jeho hmotnosti uhličitanu sodného (B.2.7.), premieša sa a zmes sa taví pol hodiny v platinovom téglíku (B.3.2.)

- 4.2.3. Tavenina sa ochladí na laboratórnu teplotu, rozpustí v 50 ml vody a prefiltruje (B.3.5.).
- 4.2.4. Zvyšok sa znova rozpustí v kyseline chlorovodíkovej (B.2.3.) a doplní vodou do 100 ml. Tento roztok sa použije na papierovú chromatografickú analýzu, opísanú v odseku 5 a na dôkaz bária vyzrážaním síranu.

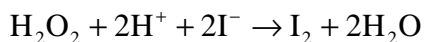
5. METÓDA

- 5.1. Primerané množstvo vyvíjacieho rozpúšťadla (B.2.9.) sa umiestni do vyvíjacej komory pre vzostupnú papierovú chromatografiu a nádoba sa nechá nasýtiť aspoň aspoň 15 hodín parami rozpúšťadla.
- 5.2. Na kus vopred upraveného chromatografického papiera, ako je opísané v B.3.4., sa naniesie na tri body na štartovacej čiare po 5 μ l každého z roztokov, pripravených podľa B.4.1.2. a B.4.2.4. a referenčný roztok B.2.8.
- 5.3. Škvrnky vzorky a štandardu sa vysušia na vzduchu. Chromatogram sa vyvíja, kým čelo rozpúšťadla nevystúpi o 30 cm.
- 5.4. Chromatogram sa vyberie z vyvíjacej nádoby a vysuší na vzduchu.
- 5.5. Škvrnky na chromatograme sa zviditeľnia postriekaním papiera detekčným činidlom B.2.10. V prítomnosti bária sa na chromatograme objavia červené škvrnky s R_f hodnotou okolo 0,10.

C. STANOVENIE PEROXIDU VODÍKA

1. PRINCÍP

Jodometrické stanovenie peroxidu vodíka je založené na nasledovnej reakcii



Konverzia prebieha pomaly, ale môže byť urýchlená pridaním molybdénanu amónneho. Vzniknutý jód sa stanoví titráciou tiosíranom sodným a zodpovedá obsahu peroxidu vodíka.

2. DEFINÍCIA

Obsah peroxidu vodíka, stanovený nižšie opísaným spôsobom, sa vyjadří ako hmotnostné percento (% hmotn.) výrobku.

3. ČINIDLÁ

Všetky činidlá musia byť analyticky čisté.

- 3.1. 2 N kyselina sírová
- 3.2. Jodid draselný
- 3.3. Molybdénan amónny
- 3.4. 0,1 N roztok tiosíranu sodného
- 3.5. 10 % (m/v) roztok jodidu draselného, pripravený tesne pred použitím
- 3.6. 20 % (m/v) roztok molybdénanu amónneho
- 3.7. 1 % (m/v) roztok škrobu

4. PRÍSTROJE A POMÔCKY

- 4.1. Kadičky 100 ml
- 4.2. Byreta 50 ml
- 4.3. Odmerné banky 250 ml
- 4.4. Odmerné valce 25 a 100 ml
- 4.5. Nedelené pipety 10 ml
- 4.6. Kuželovité banky 250 ml

5. METÓDA

- 5.1. Do 100 ml kadičky sa naváži 10 g (m gramov) výrobku, obsahujúceho približne 0,6 g peroxidu vodíka. Obsah sa s vodou prenesie do 250 ml odmernej banky, doplní sa vodou po značku a premieša sa.
- 5.2. Do 250 ml kužeľovitej banky (4.6.) sa napipetuje 10 ml roztoku vzorky (5.1.) a jeden po druhom sa pridá 100 ml 2 N kyseliny sírovej (3.1.), 20 ml roztoku jodidu draselného (3.5.) a tri kvapky roztoku molybdénanu amónneho (3.6.).
- 5.3. Vzniknutý jód sa ihneď titruje 0,1 N roztokom tiosíranu sodného (3.4.) a tesne pred dosiahnutím koncového bodom titrácie sa pridá niekoľko mililitrov roztoku škrobu (3.7.) ako indikátora. Zaznamená sa spotreba 0,1 N roztoku tiosíranu sodného (3.4.) v mililitroch (V).
- 5.4. Spôsobom podľa (5.2. a 5.3.), sa uskutoční slepý pokus, kde sa 10 ml roztoku vzorky nahradí 10 ml vody. Zaznamená sa spotreba 0,1 N roztoku tiosíranu sodného na slepú titráciu (V_0 ml).

6. VÝPOČET

Výpočet obsahu peroxidu vodíka vo výrobku v hmotnostných percentách % (hmot.) sa vypočíta podľa vzorca

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

Kde

m je množstvo analyzovaného výrobku v gramoch (5.1),

V_0 je spotreba 0,1 N roztoku tiosíranu sodného pri slepom pokuse v ml (5.4.),

V je spotreba 0,1 N roztoku tiosíranu sodného pri titrácii roztoku vzorky v ml (5.3.).

7. OPAKOVATELNOSŤ ²⁾

Pri obsahu peroxidu vodíka okolo 6 % hmot. nesmie rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelne uskutočnených stanovení na tej istej vzorke presiahnuť v absolútnej hodnote 0,2 %.

9. DŮKAZ A SEMIKVANTITATIVNE STANOVENIE URČITÝCH OXIDAČNÝCH FARBÍV VO FARBÁCH NA VLASY

(Podľa smernice Komisie 82/434/EHS zo 14. mája 1982)

1. ÚČEL A OBLASŤ POUŽITIA

Táto metóda je vhodná na dôkaz a semikvantitatívne stanovenie nasledovných látok vo farbách na vlasy vo forme krému alebo kvapaliny

Látky	Symbol
Fenyléndiamíny	
<i>o</i> -fenyléndiamín	(OPD)
<i>m</i> -fenyléndiamín	(MPD)
<i>p</i> -fenyléndiamín (príloha V)	(PPD)
Metylfenyléndiamíny	
4-metyl-1,2-fenyléndiamín (toluén-3,4-diamín)	(OTD)
4-metyl-1,3-fenyléndiamín (toluén-2,4-diamín)	(MTD)
2-metyl-1,4-fenyléndiamín (toluén-2,5-diamín)	(PTD)
Diaminofenoly	
2,4-diaminofenol	(DAP)
Hydrochinón	
Benzén-1,4-diol	(H)
α -naftol	
Naftalén-1-ol	(α -N)
Pyrogalol	
Benzén-1,2,3-triol	(P)
Rezorcinol	
Benzén-1,3-diol	(R)

2. PRINCÍP

Oxidačné farbivá sa extrahujú z farieb vo forme krému alebo kvapaliny pri pH 10 s 96 % etanolom a dokazujú sa tenkovrstvovou chromatografiou, či už jedno- alebo dvoj-rozmernou.

Pre semikvantitatívne stanovenie týchto látok sa chromatogramy vzoriek porovnávajú prostredníctvom štyroch vyvíjajúcich sústav, v ktorých sa vyvíjali chromatogramy referenčných látok v tom istom čase a za čo najbližších podmienok.

3. ČINIDLÁ

Všetky činidlá musia byť analyticky čisté.

- 3.1. Etanol bezvodý,
- 3.2. Acetón,
- 3.3. Etanol, 96 % obj.,
- 3.4. Roztok amoniaku, 25 % ($\rho_{20} = 0,91$ g/ml),
- 3.5. Kyselina L-(+)-askorbová,
- 3.6. Chloroform,
- 3.7. Cyklohexán,
- 3.8. Dusík, technický,
- 3.9. Toluén,
- 3.10. Benzén,
- 3.11. Bután-1-ol,
- 3.12. Bután-2-ol,

- 3.13. Kyselina fosforová, 50 % obj. roztok,
- 3.14. Diazóniové činidlo buď
- 3-nitrobenzéndiazónium-chlórbenzénsulfonát (vo forme stabilizovanej soli) ako v Červenej 2 JN – Francolor, alebo
 - 2-chlór-3-nitrobenzéndiazónium-naftalénbenzoát (vo forme stabilizovanej soli) ako v činidle NNCD – katalógové číslo 74 150 FLUKA, alebo ich ekvivalent,
- 3.15. Dusičnan strieborný,
- 3.16. 4-(Dimetylamino)benzaldehyd,
- 3.17. 2,5-Dimetylfenol,
- 3.18. Hexahydrát chloridu železitého,
- 3.19. Kyselina chlorovodíková, 10 % (m/v) roztok,
- 3.20. Referenčné látky
Referenčné látky sú tie, ktoré sú uvedené v odstavci 1 “Účel a oblasť použitia”. V prípade aminoszlúčenín, referenčné látky musia byť vo forme ich hydrochloridu (mono- alebo di-) alebo ako voľné zásady.
- 3.21. Referenčné roztoky, 0,5 % (m/v)
Pripravujú sa 0,5 % (m/v) roztoky každej z referenčných látok v odseku (3.20.). Do 10 ml odmernej banky sa naváži 50 mg ± 1 mg referenčnej látky. Pridá sa 5 ml 96 % etanolu (3.3.) a 250 mg kyseliny askorbovej (3.5.). Roztok sa pridaním roztoku amoniaku (3.4.) upraví na alkalický s pH 10 (overí sa indikátorovým papierikom). Pridá sa 10 ml 96 % etanolu (3.3.) a premieša sa. Roztoky môžu byť uchovávané jeden týždeň v chlade a bez prístupu svetla. V niektorých prípadoch po pridaní kyseliny askorbovej a amoniaku môže dôjsť k vzniku zrazeniny. V tom prípade musí pred pokračovaním nechať usadiť.
- 3.22. Vyvíjacie rozpúšťadlá
- 3.22.1. Acetón – chloroform – toluén (obj. diely 35 : 25 : 40)
- 3.22.2. Chloroform – cyklohexán – absolútny etanol - 25 % amoniak (obj. diely 80 : 10 : 10 : 1).
- 3.22.3. Benzén – bután-2-ol – voda (obj. diely 50 : 25 : 25). Poriadne sa premieša a po oddelení pri laboratórnej teplote (20 až 25 °C) sa použije vrchná fáza.
- 3.22.4. Bután-1-ol – chloroform – činidlo M (obj. diely 7 : 70 : 23). Opatrne sa oddelí pri laboratórnej teplote (20 až 25 °C) a použije sa spodná fáza.
- Príprava činidla M*
- | | |
|---------------------------------|----------------|
| roztok amoniaku, 25 % (obj.) | 24 obj. dielov |
| kyselina fosforová, 50 % (3.13) | 1 obj. diel |
| voda | 75 obj. dielov |
- Poznámka*
Vyvíjacie rozpúšťadlá obsahujúce amoniak sa tesne pred použitím riadne premiešajú.
- 3.23. Detekčné činidlá
- 3.23.1. *Diazóniové činidlo*
Pripraví sa 5 % (m/v) vodný roztok vybraného činidla (3.16.) v 100 ml 10 % (m/v) vodného kyseliny chlorovodíkovej (3.19.). Tento roztok sa musí vždy čerstvo pripraviť tesne pred použitím.
- 3.23.2. *Ehrlichovo činidlo*
2 g *p*-(dimetylamino)benzaldehydu (3.16.) sa rozpustia v 100 ml 10 % (m/v) vodného kyseliny chlorovodíkovej (3.19.).
- 3.23.3. *2,5-Dimetylfenol – hexahydrát chloridu železitého*
Roztok 1 g 2,5-dimetylfenolu (3.17.) v 100 ml 96 % etanolu (3.3.).

Roztok 2: 4 g hexahydrátu chloridu železitého (3.18.) sa rozpustia v 100 ml 96 % etanolu (3.3.).

Na viditeľnenie škvŕn sa týmito roztokmi postrekuje postupne, najprv roztokom 1, potom roztokom 2.

3.23.4. *Amoniakálny dusičnan strieborný*

25 % amoniak (3.4.) sa pridáva do 5 % (m/v) vodného roztoku dusičnanu strieborného (3.15.), kým sa zrazenina nerozpustí. Toto činidlo sa musí pripraviť tesne pred použitím. Neuchováva sa.

4. PRÍSTROJE A POMÔCKY

4.1. Bežné laboratórne vybavenie pre tenkovrstvovú chromatografiu.

4.1.1. Plastový alebo sklený kryt zostrojený tak, že chromatografická platňa je obklopená dusíkom počas vyvíjania škvŕn a sušenia. Toto opatrenie je nevyhnutné z dôvodu náchylnosti určitých farbív na oxidáciu.

4.1.2. Mikrostriekačka 10 µl, delená na 0,2 µl dieliky, s kolmo zrezanou ihlou alebo 50 µl viacnásobný dávkovač, pripevnený svorkou na stojan spôsobom, keď platňa môže byť udržiavaná pod dusíkom.

4.1.3. Silikagélové tenkovrstvové platne, pripravené na použitie, 0,25 mm hrubé, s rozmermi 20 × 20 cm (Macherey and Nagel, silikagél G-HR na plastovej podložke alebo ich ekvivalent).

4.2. Centrifúga, 4 000 ot./min.

4.3. Centrifugačné kvety, 10 ml s PTFE vyloženými skrutkovacími uzávermi alebo ich ekvivalenty.

5. POSTUP

5.1. *Spracovanie testovaných vzoriek*

Prvé 2 až 3 cm krému vytlačeného z tuby sa odhodia.

300 Do centrifugačnej kvety (4.3.) dopredu prečúknutej dusíkom sa vloží nasledovné mg kyseliny askorbovej s 3 g krému alebo 3 g homogenizovanej kvapaliny.

Po kvapkách sa pridá 25 % amoniak (3.4.), kým pH nie je 10. Doplní sa 96 % etanolom (3.3.) do 10 ml.

4 000 Zhomogenizuje sa po dusíkom (3.8.), zazátkuje sa a odstreduje na centrifúge pri ot./min. počas 10 min.

Použije sa kvapalný supernatant.

5.2. *Chromatografia*

5.2.1. Nanesenie škvŕn na platne

Na chromatografickú platňu (4.1.3.) sa pod dusíkovou atmosférou (3.8.) nanesie 1 µl každého z vyššie opísaných referenčných roztokov na deväť bodov umiestnených 1,5 cm od seba na čiare približne 1,5 cm od okraja platne.

Tieto škvŕny referenčných roztokov sa usporiadajú nasledovne.

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

Navyše, na body 10 a 11 sa nanesie po 2 µl testovaných roztokov vzoriek získaných podľa odseku 5.1.

Platňa sa uchováva po dusíkom (3.8.) až do chvíle, kým sa bude vyvíjať.

5.2.2. *Vyvíjanie*

Platňa sa umiestni do vyvíjacej komory prefúknutej dusíkom (3.8.), nasýtenej jedným zo štyroch vyvíjacích rozpúšťadiel (3.22.) a nechá sa vyvíjať pri laboratórnej teplote (20 až 25 °C) v tme, kým čelo rozpúšťadla nedosiahne 15 cm od štartovacej čiary. Platňa sa vyberie a vysuší pod dusíkom (3.8.) pri laboratórnej teplote.

5.2.3. *Postriekanie*

Platňa sa ihneď postrieka jedným zo štyroch roztokov špecifikovaných v 3.23.

5.2.4. *Dôkaz*

Porovnajú sa R_f hodnoty a farba škvŕn získaných zo vzorky so škvŕnami z chromatografovaných referenčných látok.

Tabuľka č. 1 udáva príklady R_f hodnôt a farieb pre každú látku v závislosti od použitého rozpúšťadla a detekčného činidla.

Potvrdenie nejednoznačnej identifikácie sa môže niekedy dosiahnuť klinovou metódou – pridaním príslušnej referenčnej látky do extraktu vzorky.

5.2.5. *Semikvantitatívny odhad*

Vizuálne sa porovná intenzita škvŕn pre každú látku identifikovanú v 5.2.4. v príslušnom rozsahu koncentrácií referenčných látok.

Ak je zistené, že koncentrácia jednej alebo viacerých látok je nadmerná, extrakt vzorky sa zriedi a stanovenie sa zopakuje.

R_f hodnoty a farby škvŕn získaných ihneď po postriekaní

Tabuľka č. 1

Referenčná látka (3.20)	Vyvíjacie rozpúšťadlo				Detekčné činidlá			
	R_f hodnoty				Výsledné farby			
	(3.22.1.)	(3.22.2.)	(3.22.3.)	(3.22.4.)	Diazóniové (3.23.1.)	Ehrlichove (3.23.2.)	Dimetylfenol (3.23.3.)	AgNO ₃ (3.23.4.)
OPD	0,62	0,60	0,30	0,57	svetlohnedá	—	—	svetlohnedá
MPD	0,40	0,60	0,47	0,48	fialovo-hnedá (*)	žltá	svetlohnedá	svetlohnedá
PPD	0,20	0,50	0,30	0,48	hnedá	jasnočervená (*)	fialová	sivá
OTD	0,60	0,60	0,53	0,60	hnedá (*)	svetlooranžová	svetlohnedá	sivasto-hnedá
MTD	0,40	0,67	0,45	0,60	červenasto-hnedá (*)	žltá	hnedá	čierna
PTD	0,33	0,65	0,37	0,70	hnedá	oranžová	fialová (*)	sivá
DAP	0,07	—	0	0,05	hnedá (*)	oranžová	fialová	hnedá
H	0,50	0,35	0,80	0,20	—	oranžová	fialová	čierna (*)
α-N	0,90	0,80	0,90	0,75	oranžovo-hnedá	—	fialová (*)	čierna
P	0,37	—	0,67	0,05	hnedá	fialovkastá	nahnedkastá	hnedá (*)
R	0,50	0,37	0,80	0,17	oranžová (*)	svetlofialová	nahnedkastá	svetlohnedá

Poznámky

1. OPD sa málo výrazne prejavuje; musí sa použiť rozpúšťadlo (3.22.3.), aby sa jasne oddelil od OTD.
2. (*) Označuje najlepšie vyvinutú farbu.

6. PRESKÚMANIE DVOJROZMERNOU TENKOVRSŤOVOU CHROMATO- GRAFIOU

Pre tento postup pre dvojrozmernú chromatografiu sú potrebné prídavné štandardy a činidlá.

6.1. *Prídavné referenčné roztoky a látky*

- 6.1.1. Naftalén-2-ol (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-fenyléndiamín (2-NPPD),
- 6.1.6. 4-nitro-1,2-fenyléndiamín (2-NPPD).

Pripravujú sa 0,5 % (m/v) roztoky každej z prídavných referenčných látok spôsobom opísaným v 3.21.

6.2. *Prídavné vyvíjacie rozpúšťadlo*

- 6.2.1. Etyl-acetát - cyklohexán - 25 % roztok amoniaku (obj. diely 65 : 30 : 0,5).

6.3. *Prídavná detekčná sústava*

Do vyvíjacej komory pre tenkovrstvovú chromatografiu sa umiestni sklenená nádoba, do nej sa dajú asi 2 g kryštalického jódu a vyvíjacia komora sa uzavrie primeraným záverom.

6.4. *Chromatografia*

- 6.4.1. Na povrch adsorbentu tenkovrstvovej platne (4.1.3.) sa nakreslia dve čiary, ako je zobrazené na obr. 1.
- 6.4.2. Pod dusíkovou atmosférou (4.1.1.) sa na základný bod 1 (obr. č. 1), asi 2 cm od oboch okrajov, nanesú 1 až 4 μ l extraktu (5.1.) Množstvo extraktu závisí od intenzity škvŕn na chromatogramoch 5.2.
- 6.4.3. Medzi body 2 a 3 (obr. č. 1) rozdelia oxidujúce sa farbivá, indentifikované alebo predpokladane indentifikované v bode 5.2. (so vzdialenosťou medzi bodmi 1,5 cm). Nanesú sa 2 μ l príslušných referenčných roztokov – okrem DAP, ktorého sa musí naniesť 6 μ l. Táto operácia sa robí pod dusíkom (6.4.2.).
- 6.4.4. Operácia v 6.4.3. sa zopakuje na základných bodoch 4 a 5 (obr. č. 1) a platňa sa uchováva pod dusíkom až do chvíle, kým sa bude vyvíjať (vzdialenosť medzi bodmi 1,5 cm).
- 6.4.5. Chromatografická vyvíjacia komora sa prefúkne dusíkom (3.8.) a naleje sa do nej primerané množstvo vyvíjacieho rozpúšťadla 3.22.2. Platňa (6.4.4.) sa umiestni do vyvíjacej komory a nechá sa vyvíjať v prvom elučnom smere (obr. č. 1) v tme. Eluuje sa, kým čelo rozpúšťadla nedosiahne čiaru vyznačenú na platni (približne 13 cm).
- 6.4.6. Platňa sa vyberie z vyvíjacej komory a umiestni sa do chromatografickej vyvíjacej komory dopredu prefúknutej dusíkom, aby sa odparilo rozpúšťadlo a to aspoň na 60 minút.
- 6.4.7. Pomocou delenej skúmavky sa do vyvíjacej komory prefúknutej dusíkom (3.8.) sa umiestni primerané množstvo elučného rozpúšťadla (6.2.), do vyvíjacej komory (6.4.6.) sa umiestni platňa pootočená o 90° a nechá sa vyvíjať druhým elučným smerom (tiež v tme), kým čelo rozpúšťadla nedosiahne čiaru nakreslenú na povrchu

adsorbentu. Platňa sa vyberie z vyvíjacej komory a elučné rozpúšťadlo sa nechá odpariť na vzduchu.

- 6.4.8. Platnička sa na 10 minút umiestni do chromatografickej vyvíjacej komory s parami jódu (6.3.) a dvojrozmerný chromatogram sa interpretuje na základe R_f hodnôt a farby škvŕn súčasne chromatografovaných referenčných látok (tab. č. 2 udáva prehľad R_f hodnôt a farieb).

Poznámka

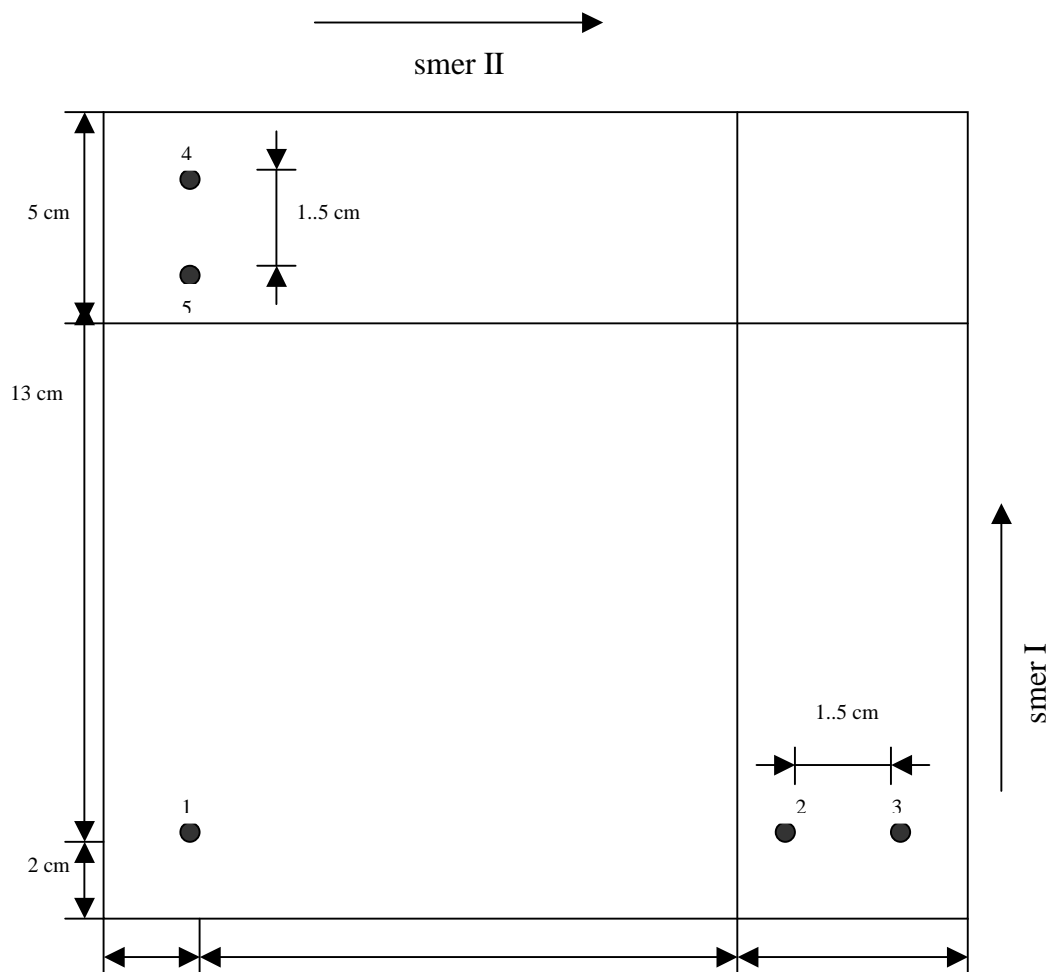
Na získanie maximálneho vyfarbenia škvŕn sa chromatogram nechá na vzduchu pol hodiny po vyvolaní.

- 6.4.9. Prítomnosť oxidujúcich sa farbív zistených v 6.4.8. môže byť definitívne potvrdená zopakovaním operácií opísaných v 6.4.1. až 6.4.8. a pridaním na základný bod 1 na škvŕnu množstva extraktu uvedeného v 6.4.2. ešte 1 μ l referenčnej látky identifikovanej v 6.4.8. Ak sa pri porovnaní s chromatogramom získaným v 6.4.8. nenájde žiadna ďalšia škvŕna, interpretácia chromatogramu 6.4.8. je správna. Farby škvŕn referenčných látok po chromatografii a vyvolaní v parách jódu

Tabuľka č. 2

Referenčná látka	Farba po vyvolaní v parách jódu
R	běžová
P	hnedá
α -N	fialová
β -N	svetlohnedá
H	fialovohnedá
MPD	žltkastohnedá
PPD	fialovohnedá
MTD	tmavohnedá
PTD	žltkastohnedá
DAP	tmavohnedá
OAP	oranžová
MAP	žltkastohnedá
PAP	fialovohnedá
2-NPPD	hnedá
4-NOPD	oranžová

Obrázok 1



10. DÔKAZ A STANOVENIE DUSITANOV

(Podľa smernica Komisie 82/434/EHS zo 14. mája 1982)

A. DÔKAZ

1. ÚČEL A OBLASŤ POUŽITIA

Táto metóda je vhodná na dôkaz dusitanov v kozmetických výrobkoch, predovšetkým v krémoch a pastách.

2. PRINCÍP

Prítomnosť dusitanov sa indikuje vznikom farebných derivátov reakciou s 2-aminobenzaldehyd-fenylhydrazónom (Nitrin®).

3. ČINIDLÁ

Všetky činidlá musia byť analyticky čisté.

3.1. Zriedená kyselina sírová 1 ml koncentrovanej kyseliny sírovej ($\rho_{20} = 1,84$ g/ml) sa zriedi 11 ml destilovanej vody.

3.2. Zriedená kyselina chlorovodíková 1 ml koncentrovanej kyseliny chlorovodíkovej ($\rho_{20} = 1,19$ g/ml) sa zriedi 11 ml destilovanej vody.

3.3. Metanol.

3.4. Roztok 2-aminobenzaldehyd-fenylhydrazónu (čínidla Nitrin®) v metanole.

Naváži sa 2,0 g Nitrinu® a kvantitatívne sa prenesie do 100 ml odmernej banky. Po kvapkách sa pridajú 4 ml koncentrovanej kyseliny chlorovodíkovej (3.2.) a premieša sa. Doplní sa metanolom po značku a mieša sa, kým sa roztok úplne nevyčíri. Roztok sa uschová vo fľaši z tmavého skla.

4. PRÍSTROJE A POMÔCKY

4.1. Kadičky, 50 ml,

4.2. Odmerná banka, 100 ml,

4.3. Fľaša z tmavého skla, 125 ml,

4.4. Sklenená platnička, 10 × 10 cm,

4.5. Plastová špachtľa,

4.6. Filtračný papier, 10 × 10 cm.

5. POSTUP

5.1. Časť vzorky určená na analýzu sa rovnomerne rozmiestni na povrchu sklenenej platničky (4.4.) tak, aby pokryla plochu vrstvou s hrúbkou nepresahujúcou 1 cm.

5.2. Filtračný papier sa (4.6.) sa namočí destilovanou vodou. Položí sa na vzorku a filtračný papier sa popritláča plastovou špachtľou (4.5.).

5.3. Počká sa asi jednu minútu a do stredu filtračného papiera sa nanesú

- dve kvapky zriedenej kyseliny sírovej (3.1),

- nasledované dvoma kvapkami roztoku Nitrin-u® (3.4).

5.4. Po piatich až desiatich sekundách sa filtračný papier sníme a preskúma sa na dennom svetle. Prítomnosť dusitanov sa prejaví červenkastopurpurovým sfarbením.

V prípade nízkeho obsahu dusitanov sa červenkastopurpurové sfarbenie zmení po piatich až 15 sekundách na žlté. K tejto farebnej zmene dôjde až po jednej až dvoch minútach, ak bol obsah dusitanov vysoký.

6. POZNÁMKA
Intenzita červenkastopurpurového sfarbenia a čas, ktorý uplynie do jeho zmeny na žlté môže poskytnúť informáciu o obsahu dusitanov vo vzorke.
- B. STANOVENIE
1. ÚČEL
Táto metóda opisuje stanovenie dusitanov v kozmetických výrobkoch.
2. DEFINÍCIA
Obsah dusitanov vo vzorke, stanovený touto metódou, sa vyjadrí v hmotnostných % dusitanu sodného.
3. PRINCÍP
Po zriedení vzorky vodou a jej vyčírení, prítomné dusitany reagujú so sulfanilamidom a *N*-(1-naftyl)etyléndiamínom a intenzita získaného sfarbenia sa meria pri 538 nm.
4. ČINIDLÁ
Všetky činidlá musia byť analyticky čisté.
- 4.1. Číriace činidlá tieto činidlá sa nemôžu použiť dlhšie ako jeden týždeň od ich prípravy.
- 4.1.1. Carrezovo činidlo I 106 g hexakynoželeznatanu draselného, $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$, sa rozpustí v destilovanej vode a zriedi sa vodou do 1 000 ml.
- 4.1.2. Carrezovo činidlo II 219,5 g octanu zinočnatého, $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ a 30 ml ľadovej kyseliny octovej sa rozpustí v destilovanej vode a zriedi sa vodou do 1 000 ml.
- 4.2. Roztok dusitanu sodného V 1 000 ml odmernej banke sa v destilovanej vode rozpustí 0,500 g dusitanu sodného sa a zriedi sa vodou po značku. 10,0 ml tohto zásobného štandardného roztoku sa zriedi do 500 ml; 1 ml takéhoto roztoku = 10 mikrogramov $NaNO_2$.
- 4.3. 1 N roztok hydroxidu sodného.
- 4.4. 0,2 % roztok hydrochloridu sulfanilamidu.
Za tepla sa rozpustí 2,0 g sulfanilamidu v 800 ml vody. Ochladí sa a za miešania pridá sa 100 ml koncentrovanej kyseliny chlorovodíkovej. Zriedi sa vodou do 1 000 ml.
- 4.5. 5 N kyselina chlorovodíková.
- 4.6. *N*-1-naftylové činidlo. Tento roztok musí byť pripravený v deň jeho použitia. 0,1 g dihydrochloridu *N*-(1-naftyl)etyléndiamínu sa rozpustí vo vode a zriedi sa vodou do 100 ml.
5. PRÍSTROJE A POMÔCKY
- 5.1. Analytické váhy,
- 5.2. 100, 250, 500 a 1 000 ml odmerné banky,
- 5.3. Nedelené alebo delené pipety,
- 5.4. 100 ml odmerné valce,
- 5.5. Skladané filtračné papiere, bez dusitanov, s priemerom 15 cm,
- 5.6. Vodný kúpeľ,
- 5.7. Spektrofotometer s kyvetami s optickou dráhou dlhou 1 cm,
- 5.8. pH meter,

- 5.9. 10 ml mikrobyreta,
5.10. 250 ml kadičky.

6. POSTUP

- 6.1. S presnosťou na 0,1 mg sa naváži približne 0,5 g (m gramov) homogenizovanej vzorky, s horúcou destilovanou vodou sa kvantitatívne prenesie do 250 ml kadičky (5.10.) a objem sa doplní horúcou destilovanou vodou približne na 150 ml. Kadička (5.10.) sa umiestni vodného kúpeľa (5.6.) pri 80 °C na pol hodiny. Počas zahrievania sa občas pretrepe.
- 6.2. Ochladí sa na laboratórnu teplotu a jeden po druhom sa za miešania pridajú 2 ml Carrezovho činidla I (4.1.1.) a 2 ml Carrezovho činidla II (4.1.2.).
- 6.3. Na úpravu pH na 8.3 sa pridá 1 N roztok hydroxidu sodného (4.3.) (s použitím pH metra (5.8.)). Obsah sa kvantitatívne prenesie do 250 ml odmernej banky a doplní sa destilovanou vodou po značku.
- 6.4. Obsah sa premieša a prefiltruje cez skladaný filtračný papier (5.5.).
- 6.5. Do 100 ml odmernej banky (5.2.) sa pipetou (5.3.) prenesie primeraný podiel (V ml) číreho filtrátu, ale nie viac ako 25 ml a pridá sa destilovaná voda do objemu 60 ml.
- 6.6. Po premiešaní sa pridá 10,0 ml roztoku hydrochloridu sulfanilamidu (4.4.) a potom 6,0 ml 5 N kyseliny chlorovodíkovej (4.5.). Premieša sa a nechá sa stáť päť minút. Pridajú sa 2,0 ml *N*-1-naftylového činidla (4.6.), premieša sa a nechá sa stáť tri minúty. Zriedi sa vodou po značku a premieša sa.
- 6.7. Zopakovaním operácií 6.5. a 6.6. bez pridania *N*-1-naftylového činidla (4.6.) sa pripraví slepý pokus.
- 6.8. Pri 538 nm sa zmeria (5.7.) absorbancia roztoku získaného pod 6.6. s použitím slepeho pokusu (6.7.) ako štandardu.
- 6.9. Z kalibračného grafu (6.10.) sa odčíta obsah dusitanu sodného v mikrogramoch na 100 ml roztoku (m_1 mikrogramov), ktorý zodpovedá absorbancii nameranej v 6.8.
- 6.10. S použitím roztoku obsahujúceho 10 µg dusitanu sodného na 100 ml (4.2.) sa pripraví kalibračný graf s koncentraciami 0, 20, 40, 60, 80 a 100 µg dusitanu sodného na 100 ml.

7. VÝPOČET

Obsah dusitanu sodného vo vzorke v hmotnostných percentách sa vypočíta pomocou nasledovného vzorca

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

kde

m je hmotnosť vzorky v gramoch, vzatej na analýzu (6.1.),

m_1 je obsah dusitanu sodného v mikrogramoch, zisteného v 6.9,

V je počet mililitrov filtrátu použitého na meranie (6.5.).

8. OPAKOVATELNOSŤ ²⁾

Pri obsahu dusitanu sodného okolo 0,2 % hmot. nesmie rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelne uskutočnených stanovení na tej istej vzorke presiahnuť v absolútnej hodnote 0,005 %.

11. DÔKAZ A STANOVENIE VOĽNÉHO FORMALDEHYDU

(Podľa smernice Komisie 82/434/EHS zo 14. mája 1982 v znení smernice Komisie 90/207/EHS)

1. ÚČEL A OBLASŤ POUŽITIA
Táto metóda opisuje dôkaz a dve stanovenia podľa toho, či sú prítomné donory formaldehydu (zlúčeniny uvoľňujúce formaldehyd). Je použiteľná na všetky kozmetické výrobky.
 - 1.1. Dôkaz
 - 1.2. Všeobecné kolorimetrické stanovenie s pentán-2,4-diónom
Táto metóda sa použije, ak sa formaldehyd používa samotný alebo spolu s inými konzervačnými látkami, ktoré nie sú donormi formaldehydu.
V ostatných prípadoch a keď výsledok prevyšuje najvyššiu prípustnú koncentráciu, musí sa použiť pre potvrdenie nasledujúca metóda.
 - 1.3. Stanovenie v prítomnosti donorov formaldehydu
Pri vyššie opísanej metóde (1.2.) sa počas derivatizácie štiepia donory formaldehydu, čo vedie k príliš vysokým výsledkom (polymerizovaný formaldehyd a formaldehyd viazaný v zlúčeninách). Voľný formaldehyd je potrebné oddeliť kvapalinovou chromatografiou.
2. DEFINÍCIA
Obsah voľného formaldehydu vo vzorke sa stanovený podľa tejto metódy sa vyjadří v hmotnostných percentách.
3. DÔKAZ
 - 3.1. **Princíp**
Voľný alebo viazaný formaldehyd v prostredí kyseliny sírovej zmení farbu Schiffovho činidla na ružovú alebo svetlofialovú.
 - 3.2. **Činidlá**
Všetky činidlá musia byť analyticky čisté a voda musí byť demineralizovaná,
 - 3.2.1. Fuchsín,
 - 3.2.2. Heptahydrát siričitanu sodného,
 - 3.2.3. Koncentrovaná kyselina chlorovodíková (d = 1,19),
 - 3.2.4. Kyselina sírová, približne 1 M,
 - 3.2.5. *Schiffovo činidlo*
Do kadičky sa naváži 100 mg fuchsínu (3.2.1.) a rozpustí sa v 75 ml vody pri 80 °C. Po ochladení sa pridá 2,5 g siričitanu sodného (3.2.2.). Doplní sa do 100 ml.
Používa sa do dvoch týždňov odo dňa prípravy.
 - 3.3. **Postup**
 - 3.3.1. Do 10 ml kadičky sa navážia 2 g vzorky.
 - 3.3.2. Pridajú sa dve kvapky kyseliny sírovej (3.2.4.) a 2 ml Schiffovho činidla (3.2.5.). Toto činidlo musí byť pred pridaním úplne bezfarebné.
Pretrepe sa nechá sa stáť päť minút.
 - 3.3.3. Ak sa do piatich minút pozoruje ružové alebo svetlofialové sfarbenie, obsah formaldehydu je vyšší ako 0,01 % a stanoví sa všeobecnou metódou (4.) a ak je to potrebné, podľa postupu (5.).

4. VŠEOBECNÉ KOLORIMETRICKÉ STANOVENIE S PENTÁN-2,4-DIÓNOM
- 4.1. **Princíp**
Formaldehyd reaguje s pentán-2,4-diónom v prítomnosti octanu amónneho za vzniku 3,5-diacetyl-1,4-dihydrolutidínu. Tento sa extrahuje bután-1-olom a meria sa absorbanca extraktu pri 410 nm.
- 4.2. **Činidlá**
Všetky činidlá musia byť analyticky čisté a voda musí byť demineralizovaná.
- 4.2.1. Bezvodý octan amónny,
- 4.2.2. Koncentrovaná kyselina octová ($\rho_{20} = 1,05$ g/ml),
- 4.2.3. Pentán-2,4-dión čerstvo predestilovaný za zníženého tlaku 25 mm Hg 25° – nesmie vykazovať akúkoľvek absorbančiu pri 410 nm,
- 4.2.4. Bután-1-ol,
- 4.2.5. Kyselina chlorovodíková, 1 M,
- 4.2.6. Kyselina chlorovodíková, približne 0,1 M,
- 4.2.7. Hydroxid sodný, 1 M,
- 4.2.8. Roztok škrobu čerstvo pripravený podľa *European Pharmacopoeia* (1 g/50 ml vody), 2. vydanie, časť I-VII-1-1,
- 4.2.9. 37 až 40 % (m/v) formaldehyd,
- 4.2.10. Štandardný roztok jódu, 0,05 M,
- 4.2.11. Štandardný roztok tiosíranu sodného, 0,1 M,
- 4.2.12. *Pentán-2,4-diónové činidlo*
V 1 000 ml odmernej banke sa rozpustí
150 g octanu amónneho (4.2.1),
2 ml pentán-2,4-diónu (4.2.3),
3 ml kyseliny octovej (4.2.2).
Doplní sa vodou do 1 000 ml (pH roztoku okolo 6,4).
Toto činidlo sa musí pripravovať čerstvé.
- 4.2.13. Činidlo (4.2.12) bez pentán-2,4-diónu,
- 4.2.14. *Štandard formaldehydu - zásobný roztok*
5 g formaldehydu (4.2.9.) sa vleje do 1 000 ml odmernej banky a doplní sa vodou do 1 000 ml.
Obsah formaldehydu v tomto roztoku sa stanoví takto
Odoberie sa 10,00 ml; pridá sa 25,00 ml štandardného roztoku jódu (4.2.10) a 10,00 ml roztoku hydroxidu sodného (4.2.7.).
Nechá sa stáť päť minút.
Okyslí sa 11,00 ml HCl (4.2.5.) a nadbytok jódu sa stanoví štandardným roztokom tiosíranu sodného (4.2.11.) s použitím roztoku škrobu (4.2.8.) ako indikátora.
1 ml spotrebovaného 0,05 M roztoku jódu (4.2.10.) zodpovedá 1,5 mg formaldehydu.
- 4.2.15. *Štandard formaldehydu - zriedený roztok*
Zásobný roztok formaldehydu sa postupne zriedi vodou najprv v pomere 1:20 a potom 1:100.
1 ml tohto roztoku obsahuje približne 1 µg formaldehydu.
Vypočíta sa presný obsah formaldehydu.
- 4.3. **Prístroje a pomôcky**
- 4.3.1. Bežné laboratórne vybavenie,
- 4.3.2. Filtračný papier na oddelenie fáz, Whatman 1 PS (alebo jeho ekvivalent).
- 4.3.3. Centrifúga,
- 4.3.4. Vodný kúpeľ nastavený na 60 °C,
- 4.3.5. Spektrofotometer,

4.3.6. Sklené kvety s optickou dráhou dlhou 1 cm.

4.4. **Postup**

4.4.1. *Roztok vzorky*

Do 100 ml odmernej banky sa s presnosťou na 0,001 g naváži také množstvo (v g) analyzovanej vzorky, aby odhadovaný obsah formaldehydu bol asi 150 µg. Doplní sa vodou do 100 ml a premieša sa (roztok S). (Overí sa, či pH je blízke 6; ak nie je, zriedi sa v roztoku kyseliny chlorovodíkovej (4.2.6.)).

Do 50 ml Erlenmeyerovej banky sa pridá

- 10,00 ml roztoku S,
- 5,00 ml pentán-2,4-diónového činidla (4.2.12),
- Demineralizovaná voda do celkového objemu 30 ml.

4.4.2. *Referenčný roztok*

Možné rušivé vplyvy spôsobené sfarbením pozadia testovanej vzorky sa vylúčia použitím tohto referenčného roztoku.

Do 50 ml Erlenmeyerovej banky sa pridá

- 10,00 ml roztoku S,
- 5,00 ml činidla (4.2.13.),
- Demineralizovaná voda do celkového objemu 30 ml.

4.4.3. *Roztok na slepý pokus*

Do 50 ml Erlenmeyerovej banky sa pridá

- 5,00 ml pentán-2,4-diónového činidla (4.2.12.),
- Demineralizovaná voda do celkového objemu 30 ml.

4.4.4. *Stanovenie*

4.4.4.1. Zmesi zo 4.4.1., 4.4.2. a 4.4.3. sa pretrepú. Erlenmeyerove banky sa ponoria do vodného kúpeľa zahriateho na 60 °C presne na 10 minút. Počas dvoch minút sa nechajú ochladiť v kúpeli z ľadovej vody.

4.4.4.2. Ich obsah sa preniesie do 50 ml oddeľovacích lievikov obsahujúcich 10 ml bután-1-olu (4.2.4.). Každá banka sa opláchne 3 až 5 ml vody. Zmesi sa intenzívne pretrepú presne 30 sekúnd. Nechajú sa oddeliť.

4.4.4.3. Cez filtračný papier na oddelenie fáz sa bután-1-olové fázy prefiltrujú do meracích kyviet (4.3.2.). Tiež sa môže použiť odstredovanie na centrifúge (3 000 g_n na päť minút).

4.4.4.4. Pri 410 nm sa zmeria absorbanca A₁ extraktu roztoku vzorky zo 4.4.1. oproti extraktu referenčného roztoku 4.4.2.

4.4.4.5. Podobne sa zmeria absorbanca A₂ extraktu slepého pokusu z 4.4.3. oproti bután-1-olu.

Poznámka

Všetky tieto operácie sa musia uskutočniť do 25 minút od momentu umiestnenia Erlenmeyerových baniek do vodného kúpeľa pri 60 °C.

4.4.5. *Kalibračná krivka*

4.4.5.1. Do 50 ml Erlenmeyerovej banky sa umiestni

- 5,00 ml zriedeného štandardného roztoku z 4.2.15,
- 5,00 ml pentán-2,4-diónového činidla (4.2.12),
- Demineralizovaná voda do celkového objemu 30 ml.

4.4.5.2. Pokračuje sa, ako je opísané v 4.4.4 a zmeria sa absorbanca oproti bután-1-olu (4.2.4.).

4.4.5.3. Postup sa zopakuje s 10, 15, 20 a 25 ml zriedeného štandardného roztoku (4.2.15.).

4.4.5.4. Na získanie nulovej hodnoty (zodpovedajúcej sfarbeniu činidiel) sa postupuje ako v 4.4.4.5.

4.4.5.5. Po odčítaní nulovej hodnoty od každej z absorpcií získaných v 4.4.5.1. a 4.4.5.3. sa zostrojí kalibračná krivka. Beerov zákon platí do 30 µg formaldehydu.

4.5. Výpočty

4.5.1. Od A_1 sa odpočíta A_2 a z kalibračnej krivky (4.4.5.5.) sa odčíta množstvo C formaldehydu v roztoku vzorky (4.4.1), v µg.

4.5.2. Obsah formaldehydu vo vzorke (% hmotn.) sa vypočíta pomocou nasledujúceho vzorca

$$\text{obsah formaldehydu v \%} = \frac{C}{10^3 \times m},$$

kde

m je hmotnosť skúšobnej vzorky (4.4.1.) v g.

4.6. **Opakovateľnosť**²⁾

Pri obsahu formaldehydu 0,2 % pre kolorimetrické stanovenie s pentán-2,4-diómom rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelne uskutočnených stanovení na tej istej vzorke nesmie presiahnuť 0,005 %.

Ak stanovenie voľného formaldehydu poskytne výsledky väčšie, ako je maximálny obsah podľa osobitného predpisu³⁾, t.j.

(a) medzi 0,05 % a 0,2 % v neoznačených výrobkoch;

(b) väčšie ako 0,2 % vo výrobkoch, označených aj neoznačených

musí sa použiť nižšie opísaný postup v 5.

5. STANOVENIE V PRÍTOMNOSTI DONOROV FORMALDEHYDU

5.1. Princíp

Oddelený formaldehyd sa reakciou s pentán-2,4-diómom v reaktore zaradenom za kolónou prevedie na žltý lutidínový derivát a získaný derivát sa detekuje absorpciou pri 420 nm.

5.2. Činidlá

Všetky činidlá musia byť analyticky čisté a voda musí byť demineralizovaná.

5.2.1. Voda čistoty pre HPLC alebo rovnocennej kvality,

5.2.2. Bezvodý octan amónny,

5.2.3. Koncentrovaná kyselina octová,

5.2.4. Pentán-2,4-dión (uskladnený pri 4 °C),

5.2.5. Bezvodý hydrogenfosforečnan sodný,

5.2.6. 85 % kyselina trihydrogenfosforečná ($\rho_{20} = 1,7$ g/ml),

5.2.7. Metanol čistoty pre HPLC,

5.2.8. Dichlórmetán,

5.2.9. 37 až 40 % (m/v) formaldehyd,

5.2.10. Hydroxid sodný, 1 M,

5.2.11. Kyselina chlorovodíková, 1 M,

5.2.12. Kyselina chlorovodíková, 0,002 M,

5.2.13. Roztok škrobu čerstvo pripravený podľa *European Pharmacopoeia* (4.2.8),

5.2.14. Štandardný roztok jódu, 0,05 M,

5.2.15. Štandardný roztok tiosíranu sodného, 0,1 M,

5.2.16. *Mobilná fáza*

0,006 M vodný roztok hydrogenfosforečnanu sodného (5.2.5.) upravený na pH 2,1 kyselinou trihydrogenfosforečnou (5.2.6.),

5.2.17. *Činidlo na reakciu po chromatografii*

V 1 000 ml odmernej banke sa rozpustí

- 62,5 g octanu amónneho (5.2.2.),

- 7,5 ml kyseliny octovej (5.2.3.),

- 5 ml pentán-2,4-diónu (5.2.4.).
Doplní sa vodou (5.2.1) do 1 000 ml.
Toto činidlo sa uschová v tme.
Doba skladovania: maximálne tri dni pri 25 °C.
Nesmie byť pozorovaná zmena sfarbenia.
- 5.2.18. *Štandard formaldehydu - zásobný roztok*
10 g formaldehydu (5.2.9.) sa vleje do 1 000 ml odmernej banky a doplní sa vodou do 1 000 ml.
Obsah formaldehydu v tomto roztoku sa stanoví takto
Odoberie sa 5,0 ml; pridá sa 25,00 ml štandardného roztoku jódu (5.2.14.) a 10,00 ml roztoku hydroxidu sodného (5.2.10.).
Nechá sa stáť päť minút.
Okyslí sa 11,00 ml HCl (5.2.11.) a nadbytok štandardného roztoku jódu (5.2.14.) sa titruje štandardným roztokom tiosíranu sodného (5.2.15.) s použitím roztoku škrobu (5.2.13.) ako indikátora.
1 ml roztoku jódu (5.2.14.) zodpovedá 1,5 mg formaldehydu.
- 5.2.19. *Štandard formaldehydu - zriedený roztok*
Zásobný roztok sa zriedi mobilnou fázou (5.2.16.) na 1/100 jeho pôvodnej koncentrácie.
1 ml tohto roztoku obsahuje približne 37 mg formaldehydu.
Vypočíta sa jeho presný obsah.
- 5.3 ***Prístroje a pomôcky***
- 5.3.1. Bežné laboratórne vybavenie,
- 5.3.2. HPLC pumpa, bezpulzná,
- 5.3.3. Nízkotlaková bezpulzná pumpa pre činidlo (alebo druhá HPLC pumpa),
- 5.3.4. Dávkovací ventil s 10 µl slučkou,
- 5.3.5. Reaktor na zaradenie za kolónu z nasledujúcich súčastí
 - jedna 1-litrová trojhrdlová banka,
 - vyhrievacie hniezdo pre 1-litrovú banku,
 - dve Vigreuxove kolóny minimálne s 10 etážami, dve vzduchom chladené,
 - rúrka z nehrdzavejúcej ocele (na výmenu tepla) 1,6 mm – vnútorný priemer 0,23 mm, dĺžka = 400 mm,
 - teflónová hadica 1,6 mm – vnútorný priemer 0,30 mm, dĺžka 5 m (francúzske háčkovanie, pozri dodatok č. 1),
 - jedna spojka T bez akéhokoľvek mŕtveho objemu (Valco alebo ekvivalent),
 - tri spojky bez akéhokoľvek mŕtveho objemu,

Alebo jedna súprava Applied Biosystems PCRS 520 na zaradenie za kolónu alebo ekvivalent, vybavená 1-ml reaktorom,
- 5.3.6. Membránový filter, veľkosť pórov 0,45 µm.,
- 5.3.7. Náplň SEP-PAK[®] C₁₈ alebo ekvivalent,
- 5.3.8. *Hotové komerčné kolóny*
 - Bischoff hypersil RP 18 (typ NC, katalógové číslo C 25.46 1805) (5 µm, dĺžka = 250 mm, vnútorný priemer = 4,6 mm),
 - alebo Dupont, Zorbax ODS (5 µm, dĺžka = 250 mm, vnútorný priemer = 4,6 mm),
 - alebo Phase SEP, spherisorb ODS 2 (5 µm, dĺžka = 250 mm, vnútorný priemer = 4,6 mm).
- 5.3.9. *Predkolóna*
Bischoff K₁ hypersil RP 18 (katalógové číslo K1 G 6301 1805) (5 µm, dĺžka = 10 mm alebo ekvivalent).

- 5.3.10. Kolóna a predkolóna sa spoja prostredníctvom systému Ecotube (katalógové číslo A 15020508 Bischoff) alebo ekvivalentu.
- 5.3.11. Aparatúra (5.3.5.) sa zostaví podľa blokovej schémy v dodatku č. 2. Prepojenia za dávkovacím ventilom musia byť čo najkratšie. V tomto prípade je rúrka z nehrdzavejúcej ocele medzi výstupom z reaktora a vstupom detektora určená na ochladenie zmesi pred detekciou a teplota detektora nie je známa, ale je konštantná.
- 5.3.12. UV-VIS detektor,
- 5.3.13. Zapisovač,
- 5.3.14. Centrifúga,
- 5.3.15. Ultrazvukový kúpeľ,
- 5.3.16. Vibračné miešadlo (vortex alebo ekvivalent).

5.4. **Postup**

5.4.1. *Kalibračná krivka*

Táto sa zostrojí nanosením plôch píkov ako funkcie koncentrácie roztokov zriedeného štandardu formaldehydu.

Zriedením referenčného roztoku formaldehydu (5.2.19.) mobilnou fázou (5.2.16.) sa pripravujú štandardné roztoky

- 1,00 ml roztoku (5.2.19.) sa zriedi do 20,00 ml (približne 185 µg/100 ml),
- 2,00 ml roztoku (5.2.19.) sa zriedi do 20,00 ml (približne 370 µg/100 ml),
- 5,00 ml roztoku (5.2.19.) sa zriedi do 25,00 ml (približne 740 µg/100 ml),
- 5,00 ml roztoku (5.2.19.) sa zriedi do 20,00 ml (približne 925 µg/100 ml).

Štandardné roztoky sa uchovávajú jednu hodinu pri laboratórnej teplote a musia byť čerstvo pripravené.

Linearita kalibračnej krivky je dobrá pre koncentrácie medzi 1,00 a 15,00 µg/ml.

5.4.2. *Príprava vzorky*

5.4.2.1. Emulzie (krémy, základy pre make-up, očné linky)

Do zazátkovanej 100 ml banky sa s presnosťou na 0,001 g naváži množstvo skúšobnej vzorky (m g) zodpovedajúce odhadovanému obsahu 100 µg formaldehydu. Pridá sa presne odmeraných 20,00 ml dichlórmetánu (5.2.8.) a 20,00 ml kyseliny chlorovodíkovej (5.2.12.). Fázy sa oddelia odstredením na centrifúge (3 000 g_n na dve minúty). Zatiaľ sa kolóna (5.3.7.) premyje 2 ml metanolu (5.2.7.), potom sa upraví 5 ml vody (5.2.1.). Cez upravenú náplň sa nechajú pretiecť 4 ml vodnej fázy obsahujúcej extrakt, prvé 2 ml sa vylejú a zachytáva sa nasledujúca frakcia.

5.4.2.2. Lotiony, šampóny

Do zazátkovanej 100 ml banky sa s presnosťou na 0,001 g naváži množstvo skúšobnej vzorky (m g) zodpovedajúce odhadovanému obsahu okolo 500 µg formaldehydu. Doplní sa mobilnou fázou (5.2.16.) do 100 ml. Prefiltruje sa cez filter (5.3.6.) a nadávkuje sa alebo sa nechá pretiecť náplňou (5.3.7.) upravenou ako v predchádzajúcom prípade (5.4.2.1.). Všetky roztoky sa musia nadávkať hneď po príprave.

5.4.3. *Podmienky pre chromatografiu*

- prietoková rýchlosť mobilnej fázy: 1 ml/min,
- prietoková rýchlosť činidla: 0,5 ml/min,
- celková prietoková rýchlosť cez výstup detektora: 1,5 ml/min,
- dávkovaný objem: 10 µl,
- elučná teplota: v prípade komplikácie pri separácii, kolóna sa ponorí do kúpeľa z topiaceho sa ľadu počká sa, kým sa teplota ustáli (15 - 20 min),
- teplota reaktora zaradeného za kolónu: 100 °C,

- detekcia: 420 nm.

Celá sústava na chromatografiu a následnú reakciu sa po použití musí prepláchnuť vodou (5.2.1.). Ak sa sústava nepoužije dlhšie ako dva dni, po premytí vodou musí nasledovať premytie metanolom (5.2.7.). Pred opätovným pripravením na použitie sa cez sústavu nechá pretiecť voda, aby sa zabránilo kryštalizácii.

5.5. **Výpočet**

Emulzie (5.4.2.1)

Obsah formaldehydu v % (hmot.)

$$\frac{C \times 10^{-6} \times 100}{5 \text{ m}} = \frac{C \times 10^{-4}}{5 \text{ m}}$$

Lotiony, šampóny

Podľa vzorca

$$\frac{C \times 10^{-6} \times 100}{m} = \frac{C \times 10^{-4}}{m},$$

kde

m je hmotnosť analyzovanej vzorky v g (5.4.2.1),

C je koncentrácia formaldehydu odčítaná z kalibračnej krivky (5.4.1), v $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$.

5.6. **Opakovateľnosť**²

Pri obsahu formaldehydu 0,05 % rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelne uskutočnených stanovení na tej istej vzorke nesmie presiahnuť 0,001 %.

Pri obsahu formaldehydu 0,2 % rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelne uskutočnených stanovení na tej istej vzorke nesmie presiahnuť 0,005 %.

Dodatok č. 1

NÁVOD NA „FRANCÚZSKE HÁČKOVANIE“

POTREBNÉ POMÔCKY

- Jedna drevená cievka

vonkajší priemer 5 cm s kruhovým otvorom s priemerom 1,5 cm v strede cievky. Vsunú sa štyri oceľové klince (podľa zobrazenia na obrázkoch 1 a 2). Vzdialenosť medzi dvoma klincami musí byť 1,8 cm a musia byť vzdialené 0,5 cm od kruhového otvoru.

- jedna neohybná ihla (háčkovacieho typu) do slučky teflónovej hadice,

- 5 m teflónovej hadice s vonkajším priemerom 1,6 mm, vnútorným 0,3 mm.

POSTUP

Pri „francúzskom háčkovaní“ sa teflónová hadica najprv prevlečie cez kruhový otvor v strede cievky zvrchu nadol (asi 10 cm hadice sa nechá vyčnievať z dolného otvoru cievky, aby bolo možné naň prichytiť reťaz počas procesu háčkovania); potom sa hadica striedavo ovinie okolo štyroch klincov podľa zobrazenia na obrázku 3.

Vrch a spodok francúzskeho háčkovania sa ochráni kovovými krúžkami a prítlačnými skrútkami; treba dať pozor, aby sa neprerazil teflón pri uťahovaní. Hadica sa ovinie okolo každého klinca po druhý raz a podľa nasledujúceho postupu sa spravia „očká“

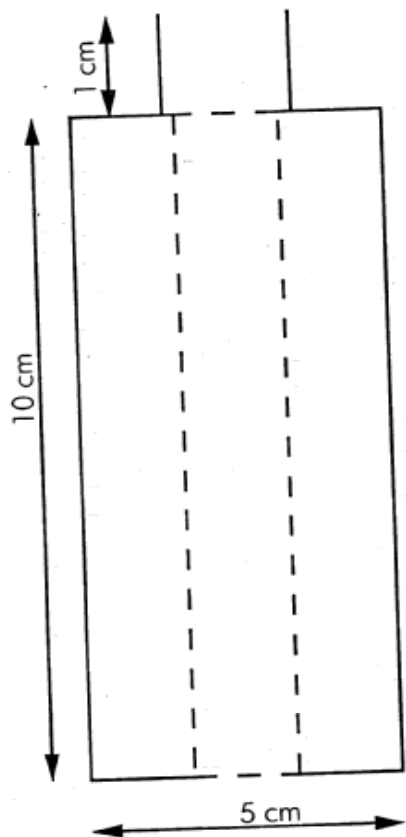
- dolná hadica sa háčikom preloží ponad hornú hadicu (obrázok 4). Tento proces sa zopakuje postupne na každom klinci (1, 2, 3, 4 proti smeru hodinových ručičiek), kým sa nevytvorí 5 m alebo iná požadovaná dĺžka háčkovania.

Okolo 10 cm hadice sa nechá na ukončenie háčkovania. Na ukončenie reťaze sa hadica prevlečie cez každú zo štyroch slučiek a jemne sa pritiahne.

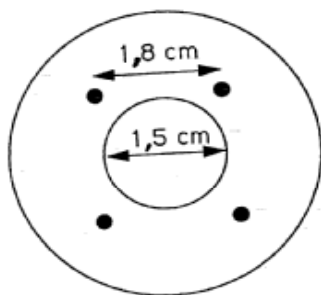
Poznámka Vyrábané francúzske háčkovanie pre reaktory na zaradenie za kolónu je dostupné na trhu (Supelco).

Schematický náčrt cievky

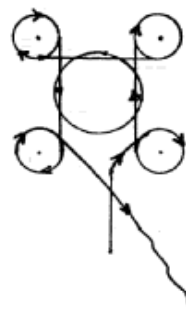
Obrázok 1



Obrázok 2

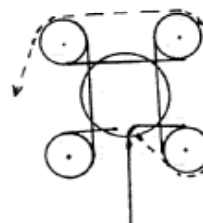


Obrázok 3



Prvá hadica

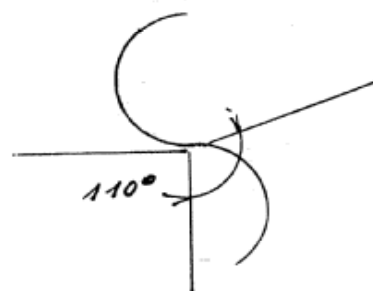
Obrázok 4



Druhá hadica

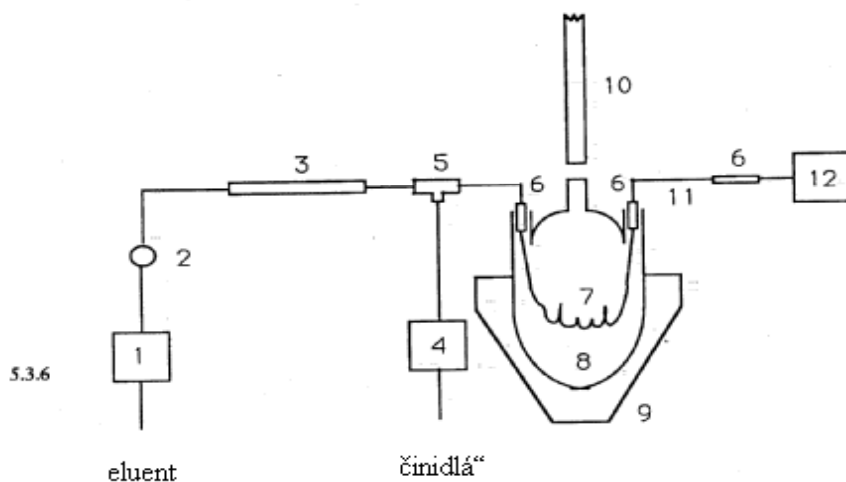
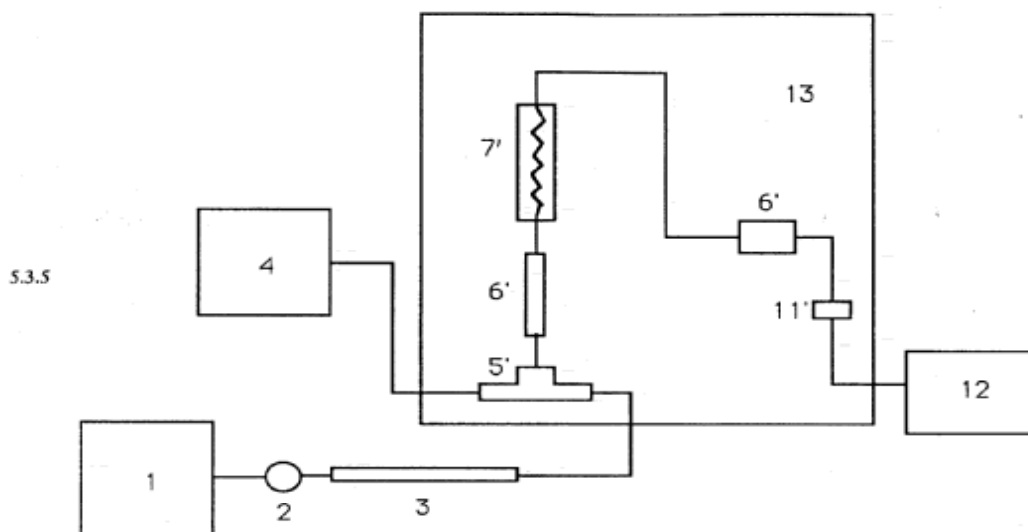
Na vytvorenie "očka" sa dolná hadica (plná čiara) preloží ponad hornú hadicu (prerušovaná čiara)

Obrázok 5



Dodatok č. 2

- 1 HPLC pumpa
- 2 dávkovací ventil
- 3 kolóna s predkolónou
- 4 pumpa na činidlo
- 5 T-spojka bez mŕtveho objemu
- 5' T-spojka (Vortex)
- 6-6' spojka bez mŕtveho objemu
- 7 "francúzske háčkovanie "
- 7' reaktor
- 8 trojhrdlová banka s vriacou vodou
- 9 vyhrievacie hniezdo
- 10 chladiivo
- 11 rúrka z nehrdzavejúcej ocele na výmenu tepla
- 11' výmenník tepla
- 12 UV-VIS detektor
- 13 jedna súprava PCRS 520 na zaradenie za kolónu



12. STANOVENIE REZORCINOLU V ŠAMPÓNOCH A VLASOVÝCH LOTIONOCH

(Podľa smernice Komisie 82/434/EHS zo 14. mája 1982)

1. ÚČEL A OBLASŤ POUŽITIA

Táto metóda presne určuje stanovenie rezorcinolu v šampónoch a vlasových lotionoch pomocou plynovej chromatografie. Táto metóda je vhodná pri jeho obsahu vo vzorke od 0,1 do 2,0 % hmotnosti.

2. DEFINÍCIA

Obsah rezorcinolu vo vzorke stanovený touto metódou sa vyjadří v hmotnostných percentách.

3. PRINCÍP

Rezorcinol a 3,5-dihydroxytoluén (5-metylbenzén-1,3-diol), pridaný do vzorky ako vnútorný štandard sa oddeľia od vzorky tenkovrstvovou chromatografiou. Obe zlúčeniny sa izolujú zoškrabaním ich škvrn z tenkovrstvovej platne a extrakciou metanolom. Nakoniec sa extrahované zlúčeniny vysušia, nasilylujú a stanovia sa plynovou chromatografiou.

4. ČINIDLÁ

Všetky činidlá musia byť analyticky čisté.

4.1. 25 % (hmot.) kyselina chlorovodíková,

4.2. Metanol,

4.3. 96 % (obj.) etanol,

4.4. Hotové komerčné silikagélové TLC platne (na plastovom alebo hliníkovom podklade) s fluorescenčným indikátorom. Deaktivujú sa nasledovne Platne potiahnuté silikagélom sa postriekajú vodou do lesklého vzhľadu. Platne sa nechajú vysušiť na vzduchu pri laboratórnej teplote jednu až tri hodiny.

Poznámka

Ak platne nie sú deaktivované, môže dochádzať k ireverzibilnej adsorpcii rezorcinolu na silikagél.

4.5. Vytváracie rozpúšťadlo: acetón – chloroform – kyselina octová (obj. diely 20 : 75 : 5).

4.6. Referenčný roztok rezorcinolu: 400 mg rezorcinolu sa rozpustí v 100 ml 96 % etanolu (4.3.) (1 ml zodpovedá 4 000 µg rezorcinolu).

4.7. Roztok vnútorného štandardu: 400 mg 3,5-dihydroxytoluénu (DHT) sa rozpustí v 100 ml 96 % etanolu (4.3.) (1 ml zodpovedá 4 000 µg DHT).

4.8. Štandardná zmes: v 100 ml odmernej banke sa zmieša 10 ml roztoku 4.6 a 10 ml roztoku 4.7., doplní sa 96 % etanolom po značku (4.3.) a premieša sa (1 ml zodpovedá 400 µg rezorcinolu a 400 µg DHT).

4.9. Silylačné činidlá

4.9.1. *N,O*-bis(trimetylsilyl)trifluóracetamid (BSTFA).

4.9.2. Hexametyldisilazán (HMDS).

4.9.3. Trimetylchlórsilán (TMCS).

5. PRÍSTROJE A POMÔCKY

5.1. Bežné zariadenie na tenkovrstvovú a plynovú chromatografiu.

5.2. Laboratórne sklo.

6. POSTUP

6.1. *Príprava vzorky*

- 6.1.1. Do 150 ml kadičky sa presne naváži časť výrobku (m gramov), ktorá obsahuje približne 20 až 50 mg rezorcinolu.
- 6.1.2. Okyslí sa kyselinou chlorovodíkovou (4.1.), kým zmes nie je kyslá (potrebné sú približne 2 až 4 ml), pridá sa 10 ml (40 mg DHT) roztoku vnútorného štandardu (4.7.) a premieša sa. S etanolom (4.3.) sa preniesie do 100 ml odmernej banky, etanolom sa doplní po značku a premieša sa.
- 6.1.3. 250 µl roztoku (6.1.2.) sa nanesie na deaktivovanú silikagélovú platňu (4.4.) vo forme súvislej čiary dlhej približne 8 cm. Treba si dať pozor, aby bola čiara čo najtenšia.
- 6.1.4. Na tú istú platňu sa rovnakým spôsobom (6.1.3.) nanesie 250 µl referenčného roztoku (4.8.).
- 6.1.5. Na dva body štartovacej čiary sa nanesie po 5 µl z každého z roztokov 4.6. a 4.7. na uľahčenie lokalizácie po vyvinutí platne.
- 6.1.6. Platňa sa nechá vyvinúť v parami nenasýtenej vyvíjacej komore naplnenej vyvíjacím rozpúšťadlom 4.5., kým čelo rozpúšťadla nedosiahne úroveň 12 cm od štartovacej čiary; to zvyčajne trvá 45 minút. Platňa sa vysuší na vzduchu a oblasť rezorcinolu/DHT sa lokalizuje pod krátkovlnným UV žiarením (254 nm). Tieto dve zlúčeniny majú približne rovnaké R_f hodnoty. Škvrnky sa označia ceruzkou vo vzdialenosti 2 mm od vonkajšej tmavej línie ohraničujúcej škvrny. Označené oblasti sa zoškrabú a adsorbent z každej škvrny sa zozbiera do 10 ml fľaše.
- 6.1.7. Adsorbent obsahujúci vzorku a adsorbent obsahujúci referenčnú zmes sa extrahuje nasledovným spôsobom
Pridajú sa 2 ml metanolu (4.2.) a extrahuje sa jednu hodinu za stáleho miešania. Prefiltruje sa a extrakcia sa opakuje s 2 ml metanolu ďalších 15 minút.
- 6.1.8. Extrakty sa spoja a rozpúšťadlo sa odparí do sucha cez noc vo vákuovom exsikátore naplnenom vhodným sušidlom. Nesmie sa použiť nijaký zdroj tepla.
- 6.1.9. Zvyšok (6.1.8.) sa silyluje spôsobom uvedeným pod 6.1.9.1. a 6.1.9.2.
- 6.1.9.1. Mikrostriekačkou sa pridá 200 µl BSTFA (4.9.1.) a zmes sa nechá v uzavretej nádobe počas 12 hodín pri laboratórnej teplote.
- 6.1.9.2. Jeden po druhom sa mikrostriekačkou pridá 200 µl HMDS (4.9.2.) a 100 µl TMCS (4.9.3.) a zmes sa zahrieva 30 minút na 60 °C v uzavretej nádobe. Zmes sa ochladí.

6.2. Plynová chromatografia

6.2.1. *Chromatografické podmienky*

Kolóna musí poskytovať rozlíšenie R minimálne 1,5, kde

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

kde

r_1 a r_2 sú retenčné časy dvoch píkov v minútach,

r_1 a r_2 je šírka tých istých píkov v polovičnej výške v mm,

d' je rýchlosť zapisovača v mm za minútu.

Zistilo sa, že je vhodná nasledovná kolóna a podmienky pre plynovú chromatografiu

Kolóna

materiál: nehrdzavejúca oceľ

dĺžka: 200 cm

vnútorný priemer: ~ 3 mm

náplň: 10 % OV-17 na Chromosorbe WAW, 100 až 120 mesh

Plameňovo-ionizačný detektor

Teploty

Kolóna 185 °C (izotermicky)

Detektor 250 °C

Vstrekovací ventil 250 °C

Nosný plyn dusík

Prietok 45 ml/min.

Prietok vodíka a vzduchu nastavte podľa pokynov výrobcu.

- 6.2.2. Do plynového chromatografu sa vstrekuje 1 až 3 µl roztoku získaného v 6.1.9. Pre každý roztok (6.1.9.) sa uskutoční päť nástrekov; meria sa plocha pík, vypočíta sa priemerná hodnota a vypočíta sa pomer plochy pík: $S = \text{plocha píku rezorcinolu} / \text{plocha píku DHT}$.

7. VÝPOČET

Obsah rezorcinolu vo vzorke sa vyjadří v hmotnostných % (% hmotn.) je daný

$$\% \text{ rezorcinolu} = \frac{4}{M} \times \frac{S_{\text{vzorky}}}{S_{\text{standardnej zmesi}}},$$

kde

M je testovaný podiel výrobku v gramoch (6.1.1.),

S_{vzorky} je priemerný pomer plochy pík podľa 6.2.2. pre roztok vzorky,

$S_{\text{standardnej zmesi}}$ je priemerný pomer plochy pík podľa 6.2.2. pre štandardnú zmes.

8. OPAKOVATEĽNOSŤ ²

Pri obsahu rezorcinolu okolo 0,5 % nesmie rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelne uskutočnených stanovení na tej istej vzorke presiahnuť v absolútnej hodnote 0,025 %.

13. STANOVENIE METANOLU V POMERE K ETANOLU ALEBO PROPÁN-2-OLU (Podľa smernice Komisie 82/434/EHS zo 14. mája 1982)

1. ÚČEL A OBLASŤ POUŽITIA

Táto metóda opisuje analýzu metanolu plynovou chromatografiou vo všetkých druhoch kozmetických výrobkov (vrátane aerosólov).
Môže byť stanovený relatívny obsah 0 až 10 %.

2. DEFINÍCIA

Obsah metanolu stanovený touto metódou sa vyjadrí v hmotnostných % metanolu v pomere k etanolu a propán-2-olu.

3. PRINCÍP

Stanovenie sa uskutoční plynovou chromatografiou.

4. ČINIDLÁ

Použijú sa iba analyticky čisté činidlá.

4.1. Metanol,

4.2. Absolútny etanol,

4.3. Propán-2-ol,

4.4. Chloroform, zbavený alkoholov premytím vodou.

5. PRÍSTROJE A POMÔCKY

5.1. Plynový chromatograf

s tepelnovodivostným detektorom (katarometrom) pre aerosólové vzorky,
s plameňovo-ionizačným detektorom pre neaerosólové vzorky.

5.2. Odmerné banky, 100 ml,

5.3. Pipety, 2 ml, 20 ml, 0 až 1 ml,

5.4. Mikrostriekačky 0 až 100 μ l a 0 až 5 μ l a (iba pre aerosólové vzorky) špeciálna vzduchotesná striekačka so zasúvacím ventilom (postup prípravy vzorky na obr. č. 5).

6. POSTUP

6.1. *Príprava vzorky*

Z aerosólových vzoriek sa pripravujú vzorky podľa časti 2. tejto prílohy a potom sa analyzujú plynovou chromatografiou za podmienok v 6.2.1.

Z neaerosólových vzoriek sa pripravujú vzorky podľa vyššie uvedenej časti 2, zriedia sa vodou na hladinu 1 až 2 % etanolu alebo propán-2-olu a potom sa analyzujú plynovou chromatografiou za podmienok v 6.2.2.

6.2. *Plynová chromatografia*

6.2.1. Pre aerosólové vzorky sa používa tepelnovodivostný detektor (katarometer).

6.2.1.1. Použije sa kolóna naplnená 10 % Hallcomid-om M18 na Chromosorbe WAW, 100 až 200 mesh.

6.2.1.2. Kolóna musí poskytovať rozlíšenie R minimálne 1,5, kde

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

kde

r_1 a r_2 sú retenčné časy dvoch pík v minútach,

r_1 a r_2 je šírka tých istých pík v polovičnej výške v mm,

d' je rýchlosť zapisovača v mm za minútu.

6.2.1.3. Nasledujúce podmienky umožňujú dosiahnuť uvedené rozlíšenie

Kolóna	
Materiál	nehrdzavejúca oceľ
Dĺžka	3,5 m
Priemer	3 mm
Prúd cez mostík katarometra	150 mA
Nosný plyn	hélium
Tlak	2,5 bar
Prietok	45 ml/min.
Teploty	
Vstrekovací ventil	150 °C
Detektor	150 °C
Ohrev kolóny	65 °C

6.2.2. Pre neaerosólové vzorky

6.2.2.1. Použije sa kolóna naplnená Chromosorbom 105 alebo Porapakom QS a plameňovo-ionizačný detektor.

6.2.2.2. Kolóna musí poskytovať rozlíšenie R minimálne 1,5, kde:

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

kde

r_1 a r_2 sú retenčné časy dvoch pík v minútach,

r_1 a r_2 je šírka tých istých pík v polovičnej výške v mm,

d' je rýchlosť zapisovača v mm za minútu.

6.2.2.3. Nasledujúce podmienky umožňujú dosiahnuť uvedené rozlíšenie

Kolóna	
materiál	nehrdzavejúca oceľ
dĺžka	2 metre
priemer	3 mm
Citlivosť elektrometra	8×10^{-10} A
Plyny	
nosný:	dusík
tlak:	2,1 bar
prietok:	40 ml/min.
Pomocný plyn:	vodík
tlak:	1,5 bar
prietok:	20 ml/min.
Teploty	
vstrekovací ventil:	150 °C
detektor:	230 °C
ohrev kolóny :	120 až 130 °C

7. KALIBRAČNÝ GRAF

7.1. Pri postupe pre plynovú chromatografiu 6.2.1. (kolóna Hallcomid M18) sa použijú nasledovné referenčné zmesi. Tieto zmesi sa pripravujú meraním pipetami, ale presné množstvo sa zistí okamžitým vážením pipety alebo banky po každom pridaní.

Relatívny obsah (% hmotn.)	Metanol (ml)	Etanol alebo propán-2-ol (ml)	Chloroform pridaný do objemu
približne 2,5 %	0,5	20	100 ml
približne 5,0 %	1,0	20	100 ml
približne 7,5 %	1,5	20	100 ml
približne 10,0 %	2,0	20	100 ml

Do chromatografu sa nastreknú 2 až 3 μ l za podmienok v 6.2.1.

Vypočíta sa pomer plôch pík (metanol/etanol alebo metanol/propán-2-ol) pre každú zmes. Zostrojí sa kalibračný graf, kde sa vynesie na os X: % metanolu v pomere k etanolu alebo propán-2-olu, os Y: pomer plochy pík (metanol/etanol alebo metanol/propán-2-ol).

- 7.2. Pri postupe pre plynovú chromatografiu 6.2.2. (Porapak QS alebo Chromosorb 105) sa použijú nasledovné referenčné zmesi. Tieto zmesi sa pripravujú meraním mikrostriekačkou a pipetou, ale presné množstvo sa zistí okamžitým vážením pipety alebo banky po každom pridaní.

Relatívny obsah (% hmotn.)	Metanol (ml)	Etanol alebo propán-2-ol (ml)	Chloroform pridaný do objemu
približne 2,5 %	50	2	100 ml
približne 5,0 %	100	2	100 ml
približne 7,5 %	150	2	100 ml
približne 10,0 %	200	2	100 ml

Do chromatografu sa nastreknú 2 až 3 μ l za podmienok v 6.2.2.

Vypočíta sa pomer plôch pík (metanol/etanol alebo metanol/propán-2-ol) pre každú zmes. Zostrojí sa kalibračný graf, kde sa vynesie na os X: % metanolu v pomere k etanolu alebo propán-2-olu, os Y: pomer plochy pík (metanol/etanol alebo metanol/propán-2-ol).

- 7.3. Kalibračný graf musí byť priamka.

8. OPAKOVATELNOSŤ ²⁾

Pri obsahu metanolu 5 % v pomere k etanolu alebo propán-2-olu nesmie rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelne uskutočnených stanovení na tej istej vzorke presiahnuť 0,25 %.

14. STANOVENIE DICHLÓRMETÁNU A 1,1,1-TRICHLÓRETÁNU

(Podľa smernice Komisie 83/514/EHS z 27. septembra 1983)

1. ROZSAH A OBLASŤ POUŽITIA

Táto metóda opisuje stanovenie dichlórmetánu (metylénchloridu) a 1,1,1-trichlórretánu (metylchlorformu) vo všetkých kozmetických výrobkoch, ktoré môžu obsahovať tieto rozpúšťadlá.

2. DEFINÍCIA

Obsah dichlórmetánu a 1,1,1-trichlórretánu stanovený vo vzorke podľa tejto metódy sa vyjadrí v hmotnostných percentách.

3. PRINCÍP

Táto metóda využíva plynovú chromatografiu s chloroformom ako vnútorným štandardom.

4. ČINIDLÁ

Všetky činidlá musia byť analyticky čisté.

- 4.1. Chloroform (CHCl_3),
- 4.2. Chlorid uhličitý (CCl_4),
- 4.3. Dichlórmetán (CH_2Cl_2),
- 4.4. 1,1,1-trichlórretán (CH_3CCl_3),
- 4.5. Acetón,
- 4.6. Dusík.

5. PRÍSTROJE A POMÔCKY

- 5.1. Bežné laboratórne vybavenie.
- 5.2. Plynový chromatograf vybavený tepelnovodivostným detektorom.
- 5.3. Fľaša na prenesenie vzorky, 50 až 100 ml (podľa 5.3 metódy uvedenej v časti 2 Laboratórna príprava skúšobných vzoriek).
- 5.4. Tlaková injekčná striekačka, 25 až 50 μl (podľa 5.4.2.2 metódy uvedenej v časti 2 Laboratórna príprava skúšobných vzoriek).

6. POSTUP

- 6.1. Vzorka, ktorá nie je pod tlakom: vzorka sa presne naváži do kónickej banky so zátkou. Pridá sa presne navážené množstvo chloroformu (4.1.) ako vnútorného štandardu zodpovedajúce predpokladanému množstvu dichlórmetánu a 1,1,1-trichlórretánu obsiahnutému vo vzorke. Dôkladne sa premieša.
- 6.2. Vzorka pod tlakom: použije sa metóda na prípravu vzoriek opísaná v príslušnej kapitole, ale s nasledujúcimi upresneniami
 - 6.2.1. Po prenesení vzorky do fľaše (5.3.) sa ďalej do tejto fľaše pridá objem chloroformu (4.1.), ako vnútorného štandardu, zodpovedajúci predpokladanému množstvu dichlórmetánu a/alebo 1,1,1-trichlórretánu obsiahnutému vo vzorke. Dôkladne sa premieša. Mŕtvy objem ventilu sa prepláchnie 0,5 ml chloridu uhličitého (4.2.). Po vysušení sa z rozdielu hmotnosti presne stanoví hmotnosť pridaného vnútorného štandardu.
 - 6.2.2. Po naplnení striekačky vzorkou by sa špička striekačky mala vypláchnuť prúdom dusíka (4.6.) tak, že v nej pred nástrekom vzorky do chromatografu nezostane žiadny zvyšok.

- 6.2.3. Po odobratí každej vzorky by sa povrch ventilu a prenášacej časti mal niekoľkokrát prepláchnuť acetónom (4.5.) (ak sa vyžaduje, s použitím injekčnej striekačky) a potom sa dôkladne vysušiť dusíkom (4.6.).
- 6.2.4. Za každú analýzu sa uskutočnia merania s použitím dvoch rôznych fliaš na prenášanie vzoriek a za každú fliašu sa vykoná päť meraní.

7. PODMIENKY PRE CHROMATOGRAFIU

7.1. **Predkolóna**

Materiál kolóny nehrdzavejúca oceľ.
 Dĺžka 300 mm.
 Priemer: 3 až 6 mm.
 Náplň: rovnaký materiál, akým je naplnená analytická kolóna.

7.2. **Kolóna**

Stacionárna fáza vyrobená z Hallcomidu M 18 na chromosorbe. Kolóna musí poskytovať rozlíšenie „R“ rovnaké alebo lepšie ako 1,5, kde

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

kde

r_1 a r_2 sú retenčné časy (v minútach),
 W_1 a W_2 je šírka pík v polovičnej výške píku (v milimetroch),
 d' je rýchlosť zapisovača (v milimetroch za minútu).

- 7.3. Ako príklady sú uvedené kolóny, ktoré poskytujú dané výsledky

<i>Kolóna</i>	<i>I</i>	<i>II</i>
Materiál:	nehrdzavejúca oceľ	nehrdzavejúca oceľ
Dĺžka:	350 cm	400 cm
Priemer:	3 mm	6 mm
Nosič:		
chromosorb:	WAW	WAW-DMCS-HP
zrornosť:	100 – 120 mesh	60 – 80 mesh
Stacionárna fáza:	Hallcomid M 18, 10 %	Hallcomid M 18, 20 %

Teplotné podmienky sa môžu líšiť v závislosti od použitého prístroja. Na príkladoch boli nastavené takto

<i>Kolóna</i>	<i>I</i>	<i>II</i>
Teploty:		
kolóna:	65 °C	75 °C
dávkovací ventil:	150 °C	125 °C
detektor:	150 °C	200 °C
Nosný plyn:		
prietoková rýchlosť hélia:	45 ml/min.	60 ml/min.
vstupný tlak:	2,5 bar	2 bar
Nástrek:	15 µl	15 µl

8. ZMES NA STANOVENIE ODOZVOVÉHO FAKTORA

Do kónickej banky so zátkou sa presným navážením pripraví nasledujúca zmes dichlórmétán (4.3.), 30 % (hmot.), 1,1,1-trichlóretán (4.4.), 35 % (hmot.), chloroform (4.1.), 35 % (hmot.).

9. VÝPOČTY

9.1. **Výpočet odozvového faktora látky „p“ vo vzťahu k látke „a“ zvolenej ako vnútorný štandard**

Nech prvá látka je „p“, potom

k_p jej odozvový faktor,

m_p jej hmotnosť v zmesi,

A_p plocha jej píku.

Nech druhá látka je „a“, potom

k_a jej odozvový faktor (zvolený ako rovný jednej),

M_a jej hmotnosť v zmesi,

A_a plocha jej píku.

Potom

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

Na príkladoch boli získané nasledovné hodnoty odozvových faktorov (pre chloroform $k = 1$)

dichlórmétán $k_1 = 0,78 \pm 0,03$,

1,1,1-trichlóretán $k_2 = 1,00 \pm 0,03$.

9.2. **Výpočet % (hmot.) dichlórmétánu a 1,1,1-trichlóretánu prítomných v analyzovanej vzorke**

Nech

m_a je hmotnosť pridaného chloroformu (v gramoch),

M_s je hmotnosť analyzovanej vzorky (v gramoch),

A_a je plocha píku chloroformu,

A_1 je plocha píku dichlórmétánu,

A_2 je plocha píku 1,1,1-trichlóretánu,

potom

$$\% \text{ (hmot.) } \text{CH}_2\text{Cl}_2 = \frac{m_a \times A_1 \times k_1 \times 100}{A_a \times M_s},$$

$$\% \text{ (hmot.) } \text{CH}_3\text{CCl}_3 = \frac{m_a \times A_2 \times k_2 \times 100}{A_a \times M_s}.$$

10. OPAKOVATELNOSŤ ²⁾

Pri obsahu dichlórmétánu a/alebo 1,1,1-trichlóretánu 25 % (hmot.) rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelne uskutočnených stanovení na tej istej vzorke nesmie presiahnuť absolútnu hodnotu 2,5 % (hmot.).

**15. DÔKAZ A STANOVENIE CHINOLÍN-8-OLU
A BIS(8-HYDROCHINOLÍNÍUM)-SULFÁTU**
(Podľa smernice Komisie 83/514/EHS z 27. septembra 1983)

1. ROZSAH A OBLASŤ POUŽITIA
Táto metóda opisuje dôkaz a kvantitatívne stanovenie chinolín-8-olu a jeho sulfátu.
2. DEFINÍCIA
Obsah chinolín-8-olu a bis(8-hydroxychinolínium)-sulfátu stanovený vo vzorke podľa tejto metódy sa vyjadří v hmotnostných percentách chinolín-8-olu.
3. PRINCÍP
 - 3.1. Dôkaz
Dokazujú sa tenkovrstvovou chromatografiou.
 - 3.2. Stanovenie
Stanovenie sa uskutoční spektrofotometriou komplexu získaného reakciou s Fehlingovým roztokom pri 410 nm.
4. ČINIDLÁ
Všetky činidlá majú byť analyticky čisté.
 - 4.1. Chinolín-8-ol.
 - 4.2. Benzén. Vzhľadom na jeho jedovatosť je potrebné pracovať s benzénom veľmi opatrne.
 - 4.3. Chloroform.
 - 4.4. Vodný roztok hydroxidu sodného, 50 % (hmot.) roztok.
 - 4.5. Pentahydrát síranu meďnatého.
 - 4.6. Vínan draselno-sodný.
 - 4.7. 1 M kyselina chlorovodíková.
 - 4.8. 0,5 M kyselina sírová.
 - 4.9. 1 M roztok hydroxidu sodného.
 - 4.10. Etanol.
 - 4.11. Bután-1-ol.
 - 4.12. Ľadová kyselina octová.
 - 4.13. 0,1 M kyselina chlorovodíková.
 - 4.14. „Celit 545“ alebo jeho ekvivalent.
 - 4.15. *Štandardné roztoky*
 - 4.15.1. Do 100 ml odmernej banky sa naváži 100 mg chinolín-8-olu (4.1.). Rozpustí sa v malom množstve kyseliny sírovej (4.8.). Doplní sa kyselinou sírovou (4.8.) po značku.
 - 4.15.2. Do 100 ml odmernej banky sa naváži 100 mg chinolín-8-olu. Rozpustí sa v etanole (4.10.). Doplní sa etanolom (4.10.) po značku a premieša sa.
 - 4.16. *Fehlingov roztok*
 - Roztok A*
Do 100 ml odmernej banky sa naváži 7 g pentahydrátu síranu meďnatého (4.5.). Rozpustí sa v malom množstve vody. Doplní sa vodou po značku a premieša sa.
 - Roztok B*
Do 100 ml odmernej banky sa naváži 35 g vínanu draselno-sodného (4.6.). Rozpustí sa v 50 ml vody. Pridá sa 20 ml roztoku hydroxidu sodného (4.4.). Doplní sa vodou po značku a premieša sa. Tesne pred použitím sa do 100 ml odmernej banky pipetou

prenesie 10 ml roztoku A a 10 ml roztoku B. Doplní sa vodou po značku a premieša sa.

- 4.17. *Elučné zmesi pre tenkovrstvovú chromatografiu*
I : Bután-1-ol (4.11) / kyselina octová (4.12.) / voda (obj. diely 80 : 20 : 20).
II : Chloroform (4.13 / kyselina octová (4.12.) (obj. diely 95 : 5).
- 4.18. 2,6-Dichlór-4-(chlórimino)cyclohexa-2,5-dienón, 1 % (hmot./objem) roztok v etanole (4.10.).
- 4.19. Uhličitan sodný, 1 % (hmot.) roztok vo vode.
- 4.20. Etanol (4.10.), 30 % (obj.) roztok vo vode.
- 4.21. Dinátrium-dihydrogen-etyléndiamíntetraacetát, 5 % (hmot.) roztok vo vode.
- 4.22. *Tlmivý roztok, pH 7*
Do jednolitrovej odmernej banky sa naváži 27 g bezvodého dihydrogenfosforečnanu draselného a 70 g trihydrátu hydrogenfosforečnanu didraselného. Doplní sa vodou po značku.
- 4.23. *Príprava tenkovrstvových platničiek*
Hotové tenkovrstvové chromatografické platne o hrúbke 0,25 mm (napr. Merck Kieselgel 60 alebo ich ekvivalent). Pred použitím sa postrieka 10 ml činidla (4.21.) a vysuší pri 80 °C.

5. PRÍSTROJE A POMÔCKY

- 5.1. 100 ml banka s guľatým dnom a zábrusovým skleneným hrdlom
- 5.2. Odmerné banky
- 5.3. Delené pipety, 10 a 5 ml
- 5.4. Nedelené pipety, 20, 15, 10 a 5 ml
- 5.5. Oddel'ovacie lieviky, 100, 50 a 25 ml
- 5.6. Skladaný filtračný papier, priemer 90 mm
- 5.7. Rotačná vákuová odparka
- 5.8. Spätný chladič so zábrusovým skleneným hrdlom
- 5.9. Spektrofotometer
- 5.10. Kývety s optickou dráhou dlhou 10 mm
- 5.11. Miešadlo s výhrevnou platňou
- 5.12. Sklenená chromatografická kolóna rozmerov: dĺžka 160 mm s priemerom 8 mm, na spodnom, zúženom konci so zátkou zo sklenej vaty a s nadstavcom na možnú aplikáciu tlaku na hornom konci.

6. POSTUP

6.1. *Dôkaz*

6.1.1. *Kvapalné vzorky*

- 6.1.1.1. Hodnota pH časti testovanej vzorky sa upraví na 7. Na štartovaciu čiaru na predpripravenej silikagélovej tenkovrstvovej platničke (4.23.) sa nanesie 5 a 10 µl vzorky.
- 6.1.1.2. Na dva ďalšie body na štartovacej čiare sa nanesie 10 a 30 µl štandardného roztoku (4.15.2.); potom sa platnička nechá vyvíjať v jednej z dvoch elučných zmesí (4.17.).
- 6.1.1.3. Keď čelo rozpúšťadla dosiahne 150 mm, platnička sa vysuší pri 110 °C (počas 15 minút). Škvrný chinolín-8-olu fluoreskujú pod UV lampou (366 nm) na žltlo.
- 6.1.1.4. Platnička sa postrieka roztokom uhličitanu sodného (4.19.). Vysuší sa a postrieka sa roztokom 2,6-dichlór-4-(chlórimino)cyclohexa-2,5-dienónu (4.18.). Chinolín-8-ol sa zviditeľní ako modrá škvrna.

6.1.2. *Tuhé vzorky alebo krémy*

- 6.1.2.1. 1 g vzorky sa disperguje v 5 ml tlmivého roztoku (4.22.). Potom sa preniesie s 10 ml chloroformu (4.3.) do oddeľovacieho lievika a pretrepe sa. Po oddelení chloroformovej vrstvy sa vodná vrstva ešte dvakrát extrahuje 10 ml chloroformu (4.3.). Spojené a prefiltrované chloroformové extrakty sa v 100 ml banke s guľatým dnom (5.1.) odparia na rotačnej vákuovej odparke (5.7.) takmer do sucha. Odparok sa rozpustí v 2 ml chloroformu (4.3.) a 10 a 30 µl škvrný získaného roztoku sa nanesú na silikagélovú platňu na chromatografiu na tenkej vrstve (4.23.) podľa metódy opísanej vyššie v 6.1.1.1. a ďalej.
- 6.1.2.2. Na platničku sa nanesie 10 a 30 µl štandardného roztoku (4.15.2.) a pokračuje sa, ako je opísané v 6.1.1.2. až 6.1.1.4.

6.2. *Stanovenie*

6.2.1. *Kvapalné vzorky*

- 6.2.1.1. Do 100 ml banky s guľatým dnom sa naváži 5 g vzorky. Pridá sa 1 ml roztoku kyseliny sírovej (4.8.) a zmes sa odparí za zníženého tlaku pri 50 °C takmer dosucha.
- 6.2.1.2. Tento zvyšok sa rozpustí v 20 ml teplej vody. Prenesie sa do 100 ml odmernej banky. Opláchne sa trikrát 20 ml vody. Doplní sa vodou do 100 ml a premieša sa.
- 6.2.1.3. Do 50 ml oddeľovacieho lievika (5.5.) sa pipetou preniesie 5 ml tohto roztoku. Pridá sa 10 ml Fehlingovho roztoku (4.16.). Získaný meďnatý komplex chinolín-8-olu (oxín-kuprium (ISO)). sa extrahuje trikrát 8 ml chloroformu (4.3.).
- 6.2.1.4. Chloroformové vrstvy sa prefiltrujú a zachytávajú do 25 ml odmernej banky (5.2.). Doplnia sa chloroformom (4.3.) po značku a premiešajú sa. Meria sa absorbancia žltého roztoku voči chloroformu pri 410 nm.

6.2.2. *Tuhé vzorky alebo krémy*

- 6.2.2.1. Do 100 ml banky s guľatým dnom (4.1.) sa naváži 0,500 g vzorky. Pridá sa 30 ml benzénu (4.2.) a 20 ml kyseliny chlorovodíkovej (4.7.). Obsah sa za miešania zahrieva na reflux počas 30 minút.
- 6.2.2.2. Obsah banky sa preniesie do 100 ml oddeľovacieho lievika (5.5.). Opláchne sa 5 ml 1 M HCl (4.7.). Vodná fáza sa preniesie do banky s guľatým dnom (5.1.) a benzénová fáza sa premyje 5 ml kyseliny chlorovodíkovej (4.7.).
- 6.2.2.3. V prípade vytvorenia emulzií, čo bráni ďalšiemu postupu, sa zmieša 0,500 g vzorky s 2 g Celitu 545 (4.14.), čím sa vytvorí voľne sypký prášok. Zmes sa po malých častiach preniesie do sklenenej chromatografickej kolóny (5.12.). Po každom pridaní pritlačte náplň kolóny. Hneď ako sa do kolóny preniesie celá zmes, eluuje sa kyselinou chlorovodíkovou (4.13.) takým spôsobom, aby sa 10 ml eluátu získalo približne za 10 minút (ak je to potrebné, elúcia môže byť uskutočnená pod miernym tlakom dusíka). Počas elúcie sa musí zabezpečiť, aby nad vrstvou náplne kolóny vždy bolo nejaké množstvo kyseliny chlorovodíkovej. Prvých 10 ml eluátu sa ďalej spracuje, ako je opísané v 6.2.2.4.
- 6.2.2.4. Zachytené vodné fázy (6.2.2.2.) alebo eluát (6.2.2.3.) sa odparia na vákuovej rotačnej odparke za zníženého tlaku takmer do sucha.
- 6.2.2.5. Zvyšok sa rozpustí v 6 ml roztoku hydroxidu sodného (4.9.). Pridá sa 20 ml Fehlingovho roztoku (4.16.) a obsah banky sa preniesie do 50 ml oddeľovacieho lievika (5.5.). Banka sa premyje 8 ml chloroformu (4.3.). Pretrepe sa a chloroformová fáza sa prefiltruje do 50 ml odmernej banky (5.2.).
- 6.2.2.6. Extrakcia sa zopakuje trikrát s 8 ml chloroformu (4.3.). Chloroformové fázy sa prefiltrujú a zachytávajú do 50 ml odmernej banky. Doplní sa chloroformom (4.3.)

po značku a premieša sa. Meria sa absorbanca žltého roztoku voči chloroformu (4.3.) pri 410 nm.

7. KALIBRAČNÁ KRIVKA

Do štyroch 100 ml baniek s guľatým dnom (5.1), každá obsahuje 3 ml 30 % vodného etanolu (4.20), sa napipetuje 5, 10, 15 a 20 ml štandardného roztoku (4.15.1), odpovedajúce 5, 10, 15 a 20 mg chinolín-8-olu. Postupuje sa, ako je opísané v 6.2.1.

8. VÝPOČET

8.1. *Kvapalné vzorky*

$$\text{Obsah chinolín-8-olu (v \% (hmot.))} = \frac{a}{m} \times 100,$$

kde

a = miligramy chinolín-8-olu odčítané z kalibračnej krivky (7),

m = hmotnosť testovanej časti vzorky (6.2.1.1) (v miligramoch).

8.2. *Tuhé vzorky alebo krémy*

$$\text{Obsah chinolín-8-olu (v \% (hmot.))} = \frac{2a}{m} \times 100,$$

kde

a = miligramy chinolín-8-olu odčítané z kalibračnej krivky (7),

m = hmotnosť testovanej časti vzorky (6.2.1.1) (v miligramoch).

9. OPAKOVATELNOSŤ²

Pri obsahu chinolín-8-olu okolo 0,3 % by rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelne uskutočnených stanovení na tej istej vzorke nemal presiahnuť absolútnu hodnotu 0,02 %.

16. STANOVENIE AMONIAKU

(Podľa smernice Komisie 83/514/EHS z 27. septembra 1983)

1. ROZSAH A OBLASŤ POUŽITIA
Táto metóda opisuje stanovenie voľného amoniaku v kozmetických výrobkoch.
2. DEFINÍCIA
Obsah amoniaku stanovený vo vzorke podľa tejto metódy sa vyjadří v hmotnostných percentách amoniaku.
3. PRINCÍP
Roztok chloridu bárnateho sa pridá do testovanej časti kozmetických výrobkov zriedenej vo vodnom roztoku metanolu. Akákoľvek zrazenina, ktorá by vznikla sa odfiltruje alebo odstredí na centrifúge. Tento postup zabraňuje stratám amoniaku počas destilácie s vodnou parou z niektorých solí amoniaku, ako napríklad uhličitan alebo hydrogenuhličitan amónny a soli mastných kyselín, s výnimkou octanu amónneho.
Z filtrátu alebo supernatantu sa amoniak oddelí destiláciou s vodnou parou a stanoví sa potenciometrickou alebo inou titráciou.
4. ČINIDLÁ
Všetky činidlá majú byť analyticky čisté,
 - 4.1. Metanol,
 - 4.2. Dihydrát chloridu bárnateho, 25 % (m/v) roztok,
 - 4.3. Kyselina trihydrogenboritá, 4 % (m/v) roztok,
 - 4.4. Kyselina sírová, 0,25 M štandardný roztok,
 - 4.5. Kvapalina obmedzujúca penenie,
 - 4.6. Hydroxid sodný, 0,5 M štandardný roztok,
 - 4.7. Indikátor, ak je potrebný: 5 ml 0,1 % (m/v) roztoku metylčervene v etanole sa zmieša s 2 ml 0,1 % (m/v) roztoku metylénovej modrej vo vode.
5. PRÍSTROJE A POMÔCKY
 - 5.1. Bežné laboratórne vybavenie,
 - 5.2. Centrifúga so 100 ml uzavierateľnými odstredivkovými skúmavkami,
 - 5.3. Aparatúra na destiláciu s vodnou parou,
 - 5.4. Potenciometer,
 - 5.5. Indikátorová sklenená elektróda a kalomelová (s chloridom ortuťným) referenčná elektróda.
6. POSTUP
 - 6.1. Do 100 ml odmernej banky sa naváži vzorka o hmotnosti (m) zodpovedajúca maximálne 150 mg amoniaku.
 - 6.2. K vzorke sa pridá 10 ml vody, 10 ml metanolu (4.1.) a 10 ml roztoku chloridu bárnateho (4.2.). Doplní sa metanolom (4.1.) do 100 ml.
 - 6.3. Roztok sa premieša a nechá sa stáť cez noc v chladničke (5 °C).
 - 6.4. Potom sa ešte chladný roztok prefiltruje alebo odstredí na centrifúge v uzavretých kyvetách počas 10 minút, tak aby sa získal číry filtrát alebo vrstva supernatantu.
 - 6.5. 40 ml tohto číreho roztoku sa pipetou preniesie do aparatúry na destiláciu s vodnou parou (5.3.) s prídavkom 0,5 ml kvapaliny obmedzujúcej penenie (4.5.), ak je to potrebné.

- 6.6. Predestiluje sa a 200 ml destilátu sa zachytáva do 250 ml kadičky obsahujúcej 10 ml štandardného roztoku kyseliny sírovej (4.4.) a 0,1 ml indikátora (4.7).
- 6.7. Nadbytok kyseliny sa spätne titruje so štandardným roztokom hydroxidu sodného (4.6.).
- 6.8. *Poznámka* pre potenciometrické stanovenie sa 200 ml destilátu zachytáva do 250 ml kadičky obsahujúcej 25 ml roztoku kyseliny trihydrogenboritej (4.3.) a titruje sa štandardným roztokom kyseliny sírovej (4.4.); zostrojí sa titračná krivka.

7. VÝPOČTY

7.1. *Výpočet v prípade spätnej titrácie*

nech

V_1 je objem spotrebovaného roztoku hydroxidu sodného (4.6.) (v mililitroch)

M_1 je jeho skutočná molarita (4.6.),

M_2 je skutočná molarita roztoku kyseliny sírovej (4.4.),

m je hmotnosť naváženej časti vzorky (6.1.) (v miligramoch),

potom

$$\% \text{ (hmot.) amoniaku} = \frac{(20 M_2 - V_1 M_1) \times 17 \times 100}{0,4 m} = \frac{(20 M_2 - V_1 M_1) \times 4250}{m}$$

7.2. *Výpočet v prípade priamej potenciometrickej titrácie*

Nech

V_2 je objem spotrebovaného roztoku kyseliny sírovej (4.4.) (v mililitroch)

M_2 je jeho skutočná molarita (4.4.),

m je hmotnosť naváženej časti vzorky (6.1.) (v miligramoch),

potom

$$\% \text{ (hmot.) amoniaku} = \frac{V_2 \times M_2 \times 17 \times 100}{0,4 m} = \frac{4250 V_2 M_2}{m}$$

8. OPAKOVATELNOSŤ²⁾

Pri obsahu amoniaku okolo 6 % rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelne uskutočnených stanovení na tej istej vzorke nesmiel presiahnuť absolútnu hodnotu 0,6 %.

17. DÔKAZ A STANOVENIE NITROMETÁNU

(Podľa smernice Komisie 83/514/EHS z 27. septembra 1983)

1. **ROZSAH A OBLASŤ POUŽITIA**

Táto metóda je vhodná na dôkaz a stanovenie nitrometánu až do približne 0,3 % v kozmetických výrobkoch balených v aerosólových rozprašovačoch.
2. **DEFINÍCIA**

Obsah nitrometánu stanovený vo vzorke podľa tejto metódy sa vyjadří v hmotnostných percentách nitrometánu v celkovom obsahu aerosólového rozprašovača.
3. **PRINCÍP**

Nitrometán sa dokazuje farebnou reakciou. Nitrometán sa stanoví plynovou chromatografiou po pridaní vnútorného štandardu.
4. **DÔKAZ**
 - 4.1. **Činidlá**

Všetky činidlá majú byť analyticky čisté.

 - 4.1.1. Hydroxid sodný, 0,5 M roztok.
 - 4.1.2. *Folinovo činidlo*

0,1 g natrium-3,4-dihydro-3,4-dioxonaftalén-1-sulfonátu sa rozpustí vo vode a zriedi sa do 100 ml.
 - 4.2. **Postup**

K 1 ml vzorky sa pridá 10 ml 4.1.1. a 1 ml 4.1.2. Fialové sfarbenie indikuje prítomnosť nitrometánu.
5. **STANOVENIE**
 - 5.1. **Činidlá**

Všetky činidlá musia byť analyticky čisté.

 - 5.1.1. Chloroform (vnútorný štandard 1).
 - 5.1.2. 2,4-dimetylheptán (vnútorný štandard 2).
 - 5.1.3. Etanol, 95 %.
 - 5.1.4. Nitrometán.
 - 5.1.5. *Referenčný roztok chloroformu*

Do odváženej 25 ml odmernej banky sa pridá približne 650 mg chloroformu (5.1.1.). Banka s obsahom sa znova presne odváži. Doplní sa 95 % etanolom (5.1.3.) do 25 ml. Odváži sa a vypočíta sa hmotnostné percento chloroformu v tomto roztoku.
 - 5.1.6. *Referenčný roztok 2,4-dimetylheptánu*

Pripraví sa podobným spôsobom ako referenčný roztok chloroformu, ale do 25 ml odmernej banky sa naváži 270 mg 2,4-dimetylheptánu (5.1.2.).
 - 5.2. **Prístroje a pomôcky**
 - 5.2.1. Plynový chromatograf s plameňovo-ionizačným detektorom.
 - 5.2.2. Zariadenie na prípravu vzoriek z aerosólov (prečerpávacía fľaša, mikrostriekačkové spoje, atď.), podľa časti 2 tejto prílohy.
 - 5.2.3. Bežné laboratórne vybavenie.

5.3. **Postup**

5.3.1. *Príprava vzorky*

Do 100 ml odváženej fľaše na prenesenie vzorky, prefúknutej alebo evakuovanej podľa postupu opísaného v (5.4 kapitoly časť 2 Laboratórna príprava skúšobných vzoriek), sa pridá 5 ml jedného z dvoch roztokov vnútorných štandardov (5.1.5. alebo 5.1.6.). Použije sa 10 alebo 20 ml sklenená striekačka bez ihly, upravenej na pripojenie k spojke, postupujúc podľa techniky opísanej v 5. odseku časť 2 Laboratórna príprava skúšobných vzoriek. Znova sa odváži, aby sa stanovilo prenesené množstvo. S použitím tej istej techniky sa do tejto fľaše prenesie asi 50 g obsahu vzorky z aerosólového rozprašovača. Opäť sa odváži, aby sa určilo množstvo prenesenej vzorky. Dôkladne sa premieša.

Nastrekuje sa okolo 10 µg s použitím špeciálnej mikrostriekačky (5.2.2.). Uskutoční sa päť nástrekov.

5.3.2. *Príprava štandardu*

Do 50 ml odmernej banky sa presne naváži približne 500 mg nitrometánu (5.1.4.) a buď 500 mg chloroformu (5.1.1.) alebo 210 mg 2,4-dimetylheptánu (5.1.2.). Doplní sa 95 % etanolom (5.1.3.) po značku. Dôkladne sa premieša a 5 ml tohto roztoku sa umiestni do 20 ml odmernej banky. Doplní sa 95 % etanolom (5.1.3.) po značku.

Nastrekuje sa okolo 10 µg s použitím špeciálnej mikrostriekačky (5.2.2.). Uskutoční sa päť nástrekov.

5.3.3. *Podmienky pre plynovú chromatografiu*

5.3.3.1. Kolóna

Skladá sa z dvoch častí, prvá časť obsahuje ako náplň didecyl-ftalát na Gas Chrom-e Q, druhá obsahuje ako náplň Ucon 50 HB 280X na Gas Chrom-e Q. Pripravená kombinovaná kolóna musí poskytovať rozlíšenie „R“ rovné alebo lepšie ako 1,5, kde

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

nech

r_1 a r_2 sú retenčné časy (v minútach),

W_1 a W_2 je šírka pík v polovičnej výške píku (v milimetroch),

d' je rýchlosť zapisovača (v milimetroch za minútu).

Nasledujúce údaje sú uvedené ako príklady kolóny spĺňajúcej vyššie uvedené požiadavky

Kolóna A

Materiál nehrdzavejúca oceľ.

Dĺžka 1,5 m.

Priemer: 3 mm.

Náplň: 20 % didecyl-ftalát na Gas Chrom-e Q (100 až 120 mesh).

Kolóna B

Materiál: nehrdzavejúca oceľ.

Dĺžka: 1,5 m.

Priemer: 3 mm.

Náplň: 20 % Ucon 50 HB 280X na Gas Chrom-e Q (100 až 120 mesh).

5.3.3.2. Detektor

Vhodné nastavenie citlivosti na elektrometri plameňovo-ionizačného detektora je 8×10^{-10} A.

- 5.3.3.3. Teplotné podmienky
 Ako vhodné sa ukázali nasledujúce podmienky
 Dávkovací ventil: 150 °C.
 Detektor: 150 °C.
 Kolóna: 50 až 80 °C v závislosti od konkrétnych kolón a prístrojov.
- 5.3.3.4. Vhodné zdroje plynu
 Nosný plyn: dusík.
 Tlak: 2,1 bar.
 Prietoková rýchlosť: 40 ml/min.
 Plyn pre detektor: podľa špecifikácie výrobcu detektora.

6. VÝPOČET

6.1. *Odozvoový faktor nitrometánu, vypočítaný vo vzťahu k použitému vnútornému štandardu*

Ak „n“ označuje nitrometán
 nech

k_n je jeho odozvoový faktor,
 m'_n je jeho hmotnosť v zmesi (v gramoch),
 S'_n je plocha jeho píku.

Ak „c“ označuje vnútorný štandard, chloroform alebo 2,4-dimetylheptán
 nech

m'_c je jeho hmotnosť v zmesi (v gramoch),
 S'_c je plocha jeho píku,
 potom

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

(k_n závisí od prístroja).

6.2. *Koncentrácia nitrometánu vo vzorke*

Ak „n“ označuje nitrometán
 nech

k_n je jeho odozvoový faktor,
 S_n je plocha jeho píku.

Ak „c“ označuje vnútorný štandard, chloroform alebo 2,4-dimetylheptán
 nech

m_c je jeho hmotnosť v zmesi (v gramoch),
 S_c je plocha jeho píku,
 M je hmotnosť preneseného aerosólu (v gramoch),
 potom

% (hmot.) nitrometánu vo vzorke je

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

7. OPAKOVATELNOSŤ ²

Pri obsahu nitrometánu okolo 0,3 % (hmot.) by rozdiel medzi výsledkami dvoch 0,03 % (hmot.).

18. DÔKAZ A STANOVENIE KYSELINY MERKAPTOOCTOVEJ VO VÝROBKOCH NA ONDULÁCIU VLASOV, NA NAROVNÁVANIE VLASOV A NA DEPILÁCIU

(Podľa smernice Komisie 83/514/EHS z 27. septembra 1983)

1. **ROZSAH A OBLASŤ POUŽITIA**
Táto metóda opisuje dôkaz a stanovenie kyseliny sulfanyloctovej vo výrobkoch na onduláciu vlasov, na narovnávanie vlasov a na depiláciu, v ktorých môžu byť prítomné iné redukčné činidlá.
2. **DEFINÍCIA**
Obsah kyseliny sulfanyloctovej stanovenej vo vzorke podľa tejto metódy sa vyjadří v hmotnostných percentách kyseliny sulfanyloctovej.
3. **PRINCÍP**
Kyselina sulfanyloctová sa dokazuje bodovými testami a tenkovrstvovou chromatografiou a stanoví sa jodometricky alebo plynovou chromatografiou.
4. **DÔKAZ**
 - 4.1. **Dôkaz bodovými testami**
 - 4.1.1. **Činidlá**
Všetky činidlá musia byť analyticky čisté.
 - 4.1.1.1. Indikačný papier napustený octanom olovnatým.
 - 4.1.1.2. Roztok kyseliny chlorovodíkovej (jeden objemový diel koncentrovanej kyseliny chlorovodíkovej plus jeden objemový diel vody).
 - 4.1.2. **Postup**
 - 4.1.2.1. Dôkaz kyseliny sulfanyloctovej prostredníctvom farebnej reakcie s octanom olovnatým
Kvapka analyzovanej vzorky sa umiestni na indikačný papier napustený octanom olovnatým (4.1.1.1.). Ak sa objaví intenzívna žltá škvrna, pravdepodobne je prítomná kyselina sulfanyloctová.
Citlivosť 0,5 %.
 - 4.1.2.2. Dôkaz anorganických sulfidov za vzniku sulfánu po okyslení
Do skúmavky sa vnesie niekoľko kvapiek analyzovanej vzorky. Pridajú sa 2 ml destilovanej vody a 1 ml kyseliny chlorovodíkovej (4.1.1.2.). Uvoľní sa sulfán, rozpoznateľný podľa jeho zápachu a na indikačnom papieriku napustenom octanom olovnatým (4.1.1.1.) vznikne čierna zrazenina sulfidu olovnateho.
Citlivosť 50 ppm.
 - 4.1.2.3. Dôkaz siričitanov za vzniku oxidu siričitého po okyslení
Postupuje sa, ako je opísané v 4.1.2.2. Obsah sa zahreje do varu. Oxid siričitý sa dá rozpoznať podľa jeho zápachu a podľa jeho redukčných vlastností, pri styku napríklad s iónmi manganistanu.
 - 4.2. **Dôkaz tenkovrstvovou chromatografiou**
 - 4.2.1. **Činidlá**
Všetky činidlá, ak nie je uvedené inak, majú byť analyticky čisté.
 - 4.2.1.1. Kyselina sulfanyloctová (kyselina tioglykolová), minimálne 98 % čistoty testovanej jodometricky.
 - 4.2.1.2. Kyselina 2,2'-disulfándiyl-di(octová), minimálnej čistoty 99 %, stanovenej jodometricky.

- 4.2.1.3. Kyselina 2-sulfanylpropánová (kyselina tiomliečna), minimálnej čistoty 95 %, stanovenej jodometricky.
- 4.2.1.4. Kyselina 3-sulfanylpropánová, minimálnej čistoty 98 % stanovenej jodometricky.
- 4.2.1.5. 3-Sulfanylpropán-1,2-diol (1-tioglycerol), minimálnej čistoty 98 % stanovenej jodometricky.
- 4.2.1.6. Hotové silikagélové platne na tenkovrstvovú chromatografiu o hrúbke 0,25 mm.
- 4.2.1.7. Hotové platne na tenkovrstvovú chromatografiu s oxidom hliníovým, Merck F 254 E alebo ekvivalentné.
- 4.2.1.8. Kyselina chlorovodíková, koncentrovaná, $\rho_{20} = 1,19$ g/ml.
- 4.2.1.9. Etyl-acetát (octan etylový).
- 4.2.1.10. Chloroform.
- 4.2.1.11. Diizopropyléter.
- 4.2.1.12. Chlorid uhličitý.
- 4.2.1.13. Kyselina octová, ľadová.
- 4.2.1.14. Jodid draselný, 1 % (m/v) roztok vo vode.
- 4.2.1.15. Chlorid platičitý, 0,1 % (m/v) roztok vo vode.
- 4.2.1.16. Elučné zmesi
 - 4.2.1.16.1. Etyl-acetát (4.2.1.9.), chloroform (4.2.1.10.), diizopropyléter (4.2.1.11.), kyselina octová (4.2.1.13.) (obj. diely 20 : 20 : 10 : 10).
 - 4.2.1.16.2. Chloroform (4.2.1.10.), kyselina octová (4.2.1.13.) (obj. diely 90 : 20).
- 4.2.1.17. Detekčné činidlá
 - 4.2.1.17.1. Tesne pred použitím sa zmiešajú rovnaké objemy roztoku 4.2.1.14. a roztoku 4.2.1.15.,
 - 4.2.1.17.2. Roztok brómu, 5 % (m/v)
 - 5 g brómu sa rozpustí v 100 ml chloridu uhličitého (4.2.1.12.),
 - 4.2.1.17.3. Roztok fluoresceínu, 0,1 % (m/v)
 - 100 mg fluoresceínu sa rozpustí v 100 ml etanolu,
 - 4.2.1.17.4. Heptamolybdénan hexaamónny, 10 % (m/v) roztok vo vode.
- 4.2.1.18. Referenčné roztoky
 - 4.2.1.18.1. Kyselina sulfanyloctová (4.2.1.1.), 0,4 % (m/v) roztok vo vode,
 - 4.2.1.18.2. Kyselina 2,2'-disulfándiyl-di(octová) (4.2.1.2.), 0,4 % (m/v) roztok vo vode,
 - 4.2.1.18.3. Kyselina 2-sulfanylpropánová (4.2.1.3.), 0,4 % (m/v) roztok vo vode,
 - 4.2.1.18.4. Kyselina 3-sulfanylpropánová (4.2.1.4.), 0,4 % (m/v) roztok vo vode,
 - 4.2.1.18.5. 3-Sulfanylpropán-1,2-diol (4.2.1.5.), 0,4 % (m/v) roztok vo vode.
- 4.2.2. *Prístroje a pomôcky*
Bežné vybavenie na tenkovrstvovú chromatografiu.
- 4.2.3. *Postup*
 - 4.2.3.1. Spracovanie vzoriek
Okyslí sa niekoľkými kvapkami kyseliny chlorovodíkovej (4.2.1.8.) na pH 1 a v prípade potreby sa prefiltruje.
V niektorých prípadoch je výhodné vzorku zriediť. Vtedy sa pred zriedením okyslí kyselinou chlorovodíkovou.
 - 4.2.3.2. Elúcia
Na platničku sa naniesie 1 μ l roztoku vzorky (4.2.3.1.) a jeden mikroliter každého z piatich referenčných roztokov (4.2.1.18.). Opatrne sa vysuší pod miernym prúdom dusíka a platnička sa eluuje elučnou zmesou (4.2.1.16.1. alebo 4.2.1.16.2.). Platnička sa vysuší čo najrýchlejšie, aby sa minimalizovala oxidácia tiolov.

4.2.3.3. Detekcia

Platnička sa postrieka jedným z troch činidiel (4.2.1.17.1., 4.2.1.17.3. alebo 4.2.1.17.4.). Ak sa platnička postrieka činidlom 4.2.1.17.3., ďalej sa pôsobí parami brómu (napr. v uzavretej nádobe obsahujúcej malú kadičku s činidlom 4.2.1.17.2.), kým sa škvry nezviditeľnia. Detekcia postrekovacím činidlom 4.2.1.17.4. bude uspokojivá, len ak čas sušenia platničky nepresiahne 30 minút.

4.2.3.4. Interpretácia

Porovnajú sa R_f hodnoty a farby škvŕn referenčných roztokov a vzorky. Nižšie uvedené R_f hodnoty slúžia len na porovnanie. Závisia od

- úrovne aktivácie vrstvy silikagélu v dobe chromatografie,
- teploty v chromatografickej komore.

Príklady R_f hodnôt získaných na silikagélovej vrstve

	Elučné zmesi	
	4.2.1.16.1	4.2.1.16.2
Kyselina sulfanyloctová	0,25	0,80
Kyselina 2-sulfanylpropánová	0,40	0,95
Kyselina 2,2'-disulfándiylidi(octová)	0,00	0,35
Kyselina 3-sulfanylpropánová	0,45	0,95
3-sulfanylpropán-1,2-diol	0,45	0,35

5. STANOVENIE

Stanovenie má vždy začínať jodometriou a aby sa predišlo oxidácii, stanovenie sulfanyloctovej kyseliny sa musí uskutočniť s nepoužitým výrobkom z čerstvo otvoreného obalu.

5.1. **Jodometria**

5.1.1. *Princíp*

Stanovenie je založené na oxidácii „-SH“ skupiny jódom v kyslom prostredí podľa rovnice



5.1.2. *Činidlá*

Jód, 0,05 M štandardný roztok.

5.1.3. *Prístroje a pomôcky*

Bežné laboratórne vybavenie.

5.1.4. *Postup*

Do 150 ml kónickej banky zo zátkou obsahujúcej 50 ml destilovanej vody sa presne naváži 0,5 až 1 g vzorky. Pridá sa 5 ml kyseliny chlorovodíkovej (4.1.1.2.) (na úpravu pH roztoku okolo 0) a titruje sa roztokom jódu (5.1.2.), kým sa neobjaví žlté sfarbenie. Ak je to potrebné, použije sa indikátor (napr. roztok škrobu alebo chlorid uhličitý).

5.1.5. *Výpočet*

Obsah kyseliny sulfanyloctovej sa vypočíta podľa vzorca

$$\% (\text{hmot.}) = \frac{92 \times n \times 100}{1000 \times 10 \times m} = \frac{0,92 n}{m},$$

kde

m je hmotnosť testovaného podielu vzorky (v gramoch),

n je objem spotrebovaného roztoku jódu (5.1.2.).

5.1.6. *Poznámky*

Ak je výsledok vypočítaný na kyselinu sulfanyloctovú 0,1 % alebo ešte menej pod maximálnou povolenou koncentráciou, nemá význam uskutočňovať ďalšie stanovenia. Ak je výsledok rovnaký alebo vyšší ako maximálne povolená koncentrácia a dôkaz preukázal prítomnosť niekoľkých redukčných činidiel, je potrebné uskutočniť stanovenie plynovou chromatografiou.

5.2. ***Plynová chromatografia***

5.2.1. *Princíp*

Kyselina sulfanyloctová sa oddelí od pomocných látok vyzrážaním roztokom octanu kademnatého. Po metylácii diazometánom, pripraveným buď *in situ* alebo dopredu ako roztok v dietyléri, sa metylderivát kyseliny sulfanyloctovej stanoví plynovo/kvapalinovou chromatografiou, s použitím metyl-oktanoátu ako vnútorného štandardu.

5.2.2. *Činidlá*

Všetky činidlá musia byť analyticky čisté.

5.2.2.1. Kyselina sulfanyloctová, 98 %,

5.2.2.2. Kyselina chlorovodíková, $d_4^{20} = 1,19$ g/ml,

5.2.2.3. Metanol,

5.2.2.4. Dihydrát octanu kademnatého, 10 % (m/v) roztok vo vode,

5.2.2.5. Metyl-oktanoát, 2 % (m/v) roztok v metanole,

5.2.2.6. Octanový tlmivý roztok (pH 5)

Trihydrát octanu sodného, 77 g,

Kyselina octová (ľadová), 27,5 g,

Demineralizovaná voda do celkového objemu jeden liter,

5.2.2.7. Kyselina chlorovodíková, čerstvo pripravený 3 M roztok v metanole (5.2.2.3),

5.2.2.8. 1-Metyl-3-nitro-1-nitrózoguanidín,

5.2.2.9. Hydroxid sodný, 5 M roztok,

5.2.2.10. Jód, 0,05 M štandardný roztok,

5.2.2.11. Dietyléter,

5.2.2.12. Roztok diazometánu pripravený z *N*-metyl-*N*-nitrózotoluén-4-sulfónamidu (Fieser, Reagents for Organic Synthesis, Wiley, 1967)

Získaný roztok obsahuje asi 1,5 g diazometánu v 100 ml dietyléteri. Pretože diazometán je toxický a veľmi nestabilný plyn, je potrebné všetky operácie vykonávať v dobre odťahujúcom digestóriu, a je potrebné sa vyvarovať použitia sklenenej zábrusovej aparatúry (na tento účel sú k dispozícii špeciálne súpravy).

5.2.3. *Prístroje a pomôcky*

5.2.3.1. Bežné laboratórne vybavenie.

5.2.3.2. Aparatúra na prípravu diazometánu metyláciou *in situ* (pozri Fales, H. M.; Jaouni, T. M.; Babashak, J. F. *Analyt. Chem.* 1973, 45, 2302).

5.2.3.3. Prístroj na prípravu diazometánu dopredu (Fieser).

5.2.4. *Príprava vzorky*

Do 50 ml centrifugačnej skúmavky sa presne naváži také množstvo vzorky, aby obsahovalo odhadom 50 až 70 mg kyseliny sulfanyloctovej. Okyslí sa niekoľkými kvapkami kyseliny chlorovodíkovej (5.2.2.2.) na dosiahnutie pH okolo 3.

Pridá sa 5 ml demineralizovanej vody a 10 ml octanového tlmivého roztoku (5.2.2.6.).

Pomocou pH papierika sa overí, že je pH okolo 5. Potom sa pridá 5 ml roztoku octanu kademnatého (5.2.2.4.).

Počká sa 10 minút a odstredí sa na centrifúge aspoň 15 minút pri 4 000 g. Odstráni sa kvapalný supernatant, ktorý môže obsahovať nerozpustný tuk (v prípade

krémových výrobkov). Tento tuk si nemožno zamieňať s tiolmi, ktoré sa hromadia v kompaktnej hmote na dne skúmavky. Overí sa, či po pridaní niekoľkých kvapiek roztoku octanu kademnatého (5.2.2.4.) k supernatantu nevzniká zrazenina.

Ak predchádzajúci dôkaz nepreukázal prítomnosť iných redukčných činidiel ako tiolov, jodometricky sa overí, či obsah tiolov prítomných v kvapalnom supernatante nepresahuje 6 až 8 % ich pôvodného obsahu.

Do centrifugačnej skúmavky obsahujúcej zrazeninu sa dá 40 ml metanolu (5.2.2.3.) a zrazenina sa na jemno disperguje miešacou tyčinkou. Opäť sa odstredzuje na centrifúge aspoň 15 minút pri 4 000 g. Supernatant sa zleje a overí sa, či neobsahuje tioly.

Zrazenina sa po druhý raz premyje tým istým postupom.

Do tej istej centrifugačnej skúmavky sa pridá

- 2 ml roztoku metyl-oktanoátu (5.2.2.5.)
- 5 ml kyseliny chlorovodíkovej v metanole (5.2.2.7.)

Tioly sa úplne rozpustia (môže ostávať malé množstvo nerozpustného zvyšku pomocných látok). Toto je roztok „S“.

V alikvotnom podiele tohto roztoku sa jodometricky overí, že obsah tiolov je aspoň 90 % oproti obsahu stanovenému v 5.1.

5.2.5. *Metylácia*

Metylácia sa uskutoční buď pomocou prípravy *in situ* (5.2.5.1.) alebo dopredu pripraveným roztokom diazometánu (5.2.5.2.).

5.2.5.1. *Metylácia in situ*

Do aparatury na metyláciu (5.2.3.2.) obsahujúcej 1 ml éteru (5.2.2.11.) sa preniesie 50 µl roztoku „S“ a metyluje sa metódou (5.2.3.2.) asi s 300 mg 1-metyl-3-nitro-1-nitrózoguanidínu (5.2.2.8.). Po 15 minútach (éterový roztok má byť žltý, čo indikuje nadbytok diazometánu) sa roztok vzorky preniesie do 2 ml fľaštičky s vzduchotesným uzáverom. Umiestni sa do chladničky a nechá sa tam cez noc. Súbežne sa metylujú dve vzorky.

5.2.5.2. *Metylácia s vopred pripraveným roztokom diazometánu*

Do 5 ml banky s uzáverom sa preniesie 1 ml roztoku diazometánu (5.2.2.12.) a potom 50 µl roztoku „S“. Nechá sa cez noc v chladničke.

5.2.6. *Príprava štandardu*

Pripraví sa štandardný roztok kyseliny sulfanyloctovej (5.2.2.1.) o známej koncentrácii obsahujúci v 2 ml asi 60 mg čistej kyseliny sulfanyloctovej (5.2.2.1.).

Toto je roztok „E“.

Vyvráža sa, otestuje a metyluje, ako je opísané v 5.2.4. a 5.2.5.

5.2.7. *Podmienky pre plynovú chromatografiu*

5.2.7.1. Kolóna

Typ: nehrdzavejúca oceľ.

Dĺžka: 2 m.

Priemer: 3 mm.

5.2.7.2. N á p l ň

20 % didecyl-ftalát/chromosorb, WAW 80 až 100 mesh.

5.2.7.3. Detektor

Plameňovo-ionizačný. Vhodné nastavenie citlivosti elektrometra plameňovo-ionizačného detektora je 8×10^{-10} A.

5.2.7.4. Zdroje plynu

Nosný plyn: dusík.

tlak: 2 bar.

prietoková rýchlosť: 35 ml/min.

Pomocný plyn: vodík
tlak: 1,8 bar.
prietoková rýchlosť: 15 ml/min.
Plyn pre detektor: podľa špecifikácie výrobcu prístroja.

5.2.7.5. Teplotné podmienky

Dávkovací ventil: 200 °C.

Detektor: 200 °C.

Kolóna: 90 °C.

5.2.7.6. Rýchlosť posunu zapisovača: 5 mm/min.

5.2.7.7. Nastrekované množstvo: 3 µl.

Uskutoční sa päť nástrekov.

5.2.7.8. Uvedené chromatografické podmienky sú len orientačné. Umožňujú dosiahnutie rozlíšenia „R“ rovného alebo lepšieho ako 1,5, kde

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

nech

r_1 a r_2 sú retenčné časy (v minútach),

W_1 a W_2 je šírka píkov v polovičnej výške píku (v milimetroch),

d' je rýchlosť posunu zapisovača (v milimetroch za minútu).

Odporúča sa, aby sa na záver chromatografického merania regulovala teplota z 90 na 150 °C pri rýchlosti 10 °C za minútu, aby sa odstránili látky, u ktorých sa predpokladá, že by rušili ďalšie stanovenie.

5.2.8. Výpočty

5.2.8.1. Koeficient proporcionality pre kyselinu sulfanyloctovú

Vypočíta sa vo vzťahu k metyl-oktanoátu na základe štandardného roztoku.

Ak „t“ označuje kyselinu sulfanyloctovú

nech

k_t je jej odozvoový faktor,

m'_t je jej hmotnosť v zmesi (v miligramoch),

S'_t je jej plocha píku,

Ak „c“ označuje metyl-oktanoát

nech

m'_c je jeho hmotnosť v zmesi (v miligramoch),

S'_c je jeho plocha píku,

potom

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

Koeficient závisí od použitého prístroja.

5.2.8.2. Koncentrácia kyseliny sulfanyloctovej prítomnej vo vzorke

Ak „t“ označuje kyselinu sulfanyloctovú

nech

k_t je jej odozvoový faktor,

S_t je jej plocha píku.

Ak „c“ označuje metyl-oktanoát

nech

m_c je jeho hmotnosť v zmesi (v miligramoch),

S_c je plocha jeho píku,

M je hmotnosť počiatočnej testovanej vzorky (v miligramoch),

potom

% (hmot.) kyseliny sulfanyloctovej vo vzorke je

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

6. OPAKOVATEĽNOSŤ²

Pri obsahu kyseliny sulfanyloctovej 8 % (hmot.) rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelne uskutočnených stanovení na tej istej vzorke nesmie presiahnuť absolútnu hodnotu 0,8 % (hmot.).

19. DÔKAZ A STANOVENIE HEXACHLOROFÉNU (INN)

(Podľa smernice Komisie 83/514/EHS z 27. septembra 1983)

A. DÔKAZ

1. ROZSAH A OBLASŤ POUŽITIA

Táto metóda je vhodná pre všetky kozmetické výrobky.

2. PRINCÍP

Hexachlorofén sa extrahuje zo vzorky etyl-acetátom a dokazuje sa tenkovrstvovou chromatografiou.

3. ČINIDLÁ

Všetky činidlá musia byť analyticky čisté.

3.1. Kyselina sírová, 4 M roztok,

3.2. Celit AW,

3.3. Etyl-acetát (octan etylový),

3.4. Elučné rozpúšťadlo: benzén obsahujúci 1 % (obj.) ľadovej kyseliny octovej,

3.5. Detekčné činidlo I

Roztok rodamínu B: 100 mg rodamínu B sa rozpustí v zmesi 150 ml dietyléteru, 70 ml absolútneho etanolu a 16 ml vody,

3.6. Detekčné činidlo II

Roztok 2,6-dibróm-4-(chlórimino)cyklohexa-2,5-dienónu: 400 mg 2,6-dibróm-4-(chlórimino)cyklohexa-2,5-dienónu sa rozpustí v 100 ml metanolu (pripravuje sa denne čerstvé).

Roztok uhličitanu sodného. 10 g uhličitanu sodného sa rozpustí v 100 ml demineralizovanej vody.

3.7. Referenčný roztok

Hexachlorofén, 0,05 % (m/v) roztok v etyl-acetáte.

4. PRÍSTROJE A POMÔCKY

4.1. TLC silikagélové platne 254 nm, 200 × 200 mm (alebo ich ekvivalent).

4.2. Bežné vybavenie na TLC.

4.3. Kúpeľ termostatovaný na 26 °C na kontrolu teploty v chromatografickej vyvíjacej nádobe.

5. PRÍPRAVA TESTOVANEJ VZORKY

5.1. 1 g homogenizovanej vzorky sa dôkladne premieša s 1 g Celitu AW (3.2.) a 1 ml kyseliny sírovej (3.1.).

5.2. Suší sa dve hodiny pri 100 °C.

5.3. Nechá sa ochladiť a vysušený zvyšok sa rozdrví na jemný prášok.

5.4. Extrahuje sa dvakrát, zakaždým 10 ml etyl-acetátu (3.3.), po každej extrakcii sa odstredí na centrifúge a etyl-acetátové vrstvy sa spoja.

5.5. Odparia sa pri 60 °C.

5.6. Odparok sa rozpustí v 2 ml etyl-acetátu (3.3.).

6. POSTUP

6.1. 2 µl roztoku testovanej vzorky (5.6) a 2 µl referenčného roztoku (3.7.) sa nanesú na TLC platničku (4.1.).

6.2. Vyvíjacia nádoba (4.3) sa nasýti elučného rozpúšťadla (3.4.).

- 6.3. TLC platnička sa umiestni do vyvíjacej nádoby a eluuje sa do vzdialenosti čela 150 mm.
- 6.4. TLC platnička sa vyberie a vysuší sa v sušiarňi s nútenou cirkuláciou vzduchu pri teplote okolo 105 °C.
- 6.5. *Detekcia*
Škvry hexachlorofénu na tenkovrstvovej platničke sa vizualizujú, ako je uvedené pod 6.5.1. alebo 6.5.2.
- 6.5.1. Platnička sa rovnomerne postrieka detekčným činidlom I (3.5.). Po 30 minútach sa platnička pozoruje pod UV svetlom pri 254 nm.
- 6.5.2. Platnička sa rovnomerne postrieka roztokom 2,6-dibróm-4-(chlórimino)cyklohexa-2,5-dienónu detekčného činidla II (3.6.). Následne sa platnička postrieka roztokom uhličitanu sodného (3.6.). Po 10 minútach sušenia pri laboratórnej teplote sa platnička pozoruje pod denným svetlom.

7. INTERPRETÁCIA

- 7.1. Detekčné činidlo I (3.5.)
Hexachlorofén sa prejaví ako modrastá škvrna na žlto-oranžovom fluoreskujúcom pozadí s R_f hodnotou približne 0,5.
- 7.2. Detekčné činidlo II (3.6.)
Hexachlorofén sa prejaví ako nebovomodro alebo tyrkysovo sfarbená škvrna na bielom pozadí s R_f hodnotou približne 0,5.

B. STANOVENIE

1. ROZSAH A OBLASŤ POUŽITIA

Táto metóda je vhodná pre všetky kozmetické výrobky.

2. DEFINÍCIA

Obsah hexachlorofénu stanovený vo vzorke podľa tejto metódy sa vyjadří v hmotnostných percentách hexachlorofénu.

3. PRINCÍP

Hexachlorofén sa stanoví po premene na metylový derivát plynovou chromatografiou s detektorom elektrónového záchytu.

4. ČINIDLÁ

Všetky činidlá musia byť analyticky čisté.

- 4.1. Etyl-acetát (octan etylový).
- 4.2. *N*-Metyl-*N*-nitroso-*p*-toluénsulfónamid (diazald),
- 4.3. Dietyléter,
- 4.4. Metanol,
- 4.5. 2-(2-Etoxyetoxy)etanol (karbitol),
- 4.6. Kyselina mravčia,
- 4.7. Hydroxid draselný, 50 % (hmot.) vodný roztok (pripravuje sa denne čerstvý),
- 4.8. Hexán pre spektroskopiu,
- 4.9. Brómchlór-fén (štandard č. 1),
- 4.10. 4,4',6,6'-Tetrachlór-2,2'-tiodifenol (štandard č. 2),
- 4.11. 2-Hydroxy-2,4,4'-trichlórdifenyléter (štandard č. 3),
- 4.12. Acetón.

- 4.13. 4 M kyselina sírová,
 4.14. Celit AW,
 4.15. 10 % (obj.) roztok kyseliny mravčej v etyl-acetáte,
 4.16. Hexachlorofén.
5. PRÍSTROJE A POMÔCKY
- 5.1. Bežné laboratórne sklo,
 5.2. Miniaparátúra na prípravu diazometánu (*Analyt. Chem.* 1973, 45, 2302-2),
 5.3. Plynový chromatograf vybavený detektorom elektrónového záchytu so zdrojom Ni 63.
6. POSTUP
- 6.1. *Príprava referenčného roztoku*
 Štandard sa vyberie tak, aby neinterferoval so žiadnou látkou obsiahnutou v analyzovanom výrobku ako pomocná látka. Zvyčajne je najvhodnejší štandard č. 1 (4.9.).
- 6.1.1. Do 100 ml odmernej banky sa presne naváži približne 50 mg štandardu č. 1, 2 alebo 3 (4.9., 4.10. alebo 4.11.) a 50 mg hexachlorofénu (4.16.). Doplní sa roztokom etyl-acetátu (4.1.) po značku (roztok A). 10 ml roztoku A sa zriedi roztokom etyl-acetátu (4.1.) do 100 ml (roztok B).
- 6.1.2. Do 100 ml odmernej banky sa presne naváži približne 50 mg štandardu č. 1, 2 alebo 3 (4.9, 4.10 alebo 4.11.). Doplní sa roztokom etyl-acetátu (4.1.) po značku (roztok C).
- 6.2. *Príprava vzorky*⁴
 Presne navážený 1 g homogenizovanej vzorky sa dôkladne premieša s 1 ml kyseliny sírovej (4.13.), 15 ml acetónu (4.12.) a 8 g Celitu AW (4.14.). Zmes sa vysuší na vzduchu počas 30 minút na parnom kúpeli, potom sa počas hodiny a pol v sušiarňi s ventiláciou. Nechá sa ochladiť, rozotrie sa na jemný prášok a prenesie sa do sklenenej kolóny. Eluuje sa etyl-acetátom (4.1.) a zachytáva sa 100 ml. Pridajú sa 2 ml roztoku vnútorného štandardu (roztoku C) (6.1.2.).
- 6.3. *Metylácia vzorky*
 Všetky činidlá a aparátúra sa vychladia počas dvoch hodín pri teplote medzi 0 a 4 °C. Do vonkajšej časti diazometánovej aparátúry sa prenesie 1,2 ml roztoku získaného v 6.2. a 0,1 ml metanolu (4.4.). Do stredného zásobníka sa umiestni okolo 200 mg diazaldu (4.2.), pridá sa 1 ml karbitolu (4.5.) a 1 ml dietyléru (4.3.) a nechá sa rozpustiť. Aparátúra sa zostaví, aparátúra sa do polovice ponorí do kúpeľa pri 0 °C a do stredného zásobníka sa striekačkou pridá asi 1 ml ochladeného roztoku hydroxidu draselného (4.7.). Je potrebné presvedčiť sa, že vzniknuté žlté sfarbenie v dôsledku tvorby diazometánu pretrváva. Ak žlté sfarbenie nepretrváva, metylácia sa opakuje s ďalšími 200 mg diazaldu (4.2.)⁵.
 Po 15 minútach sa aparátúra vyberie z chladiaceho kúpeľa a potom sa nechá 12 hodín uzatvorená pri laboratórnej teplote. Aparátúra sa otvorí, nadbytok

⁴) Pretože hexachlorofén môže byť prítomný v širokom spektre typov výrobkov, je dôležité pred zaznamenávaním výsledkov najprv stanoviť výtlačok hexachlorofénu zo vzorky podľa tohto postupu. Ak sú výtlačky nízke, môžu byť so súhlasom zainteresovaných strán zavedené modifikácie, ako napríklad zmena rozpúšťadla (benzén namiesto etyl-acetátu).

⁵) Zotrvávanie tohto žltého sfarbenia indikuje nadbytok diazometánu, ktorý je potrebný na zabezpečenie úplnej metylácie vzorky.

diazometánu sa odstráni prídavkom niekoľkých kvapiek 10 % (obj.) roztoku kyseliny mravečej v etyl-acetáte (4.15.) a organický roztok sa prenesie do 25 ml odmernej banky. Doplní sa hexánom (4.8.) po značku.

1,5 µl tohto roztoku sa nastrekne do chromatografu.

6.4. **Metylácia štandardu**

Všetky činidlá a aparátúra sa vychladia počas dvoch hodín pri teplote medzi 0 a 4 °C. Do vonkajšieho zásobníka diazometánovej aparátúry sa pridá

0,2 ml roztoku B (6.1.1.),

1 ml etyl-acetátu (4.1.),

0,1 ml metanolu (4.4.).

V metylácii sa pokračuje, ako je opísané v 6.3. 1,5 µl výsledného roztoku sa nastrekne do chromatografu.

7. PLYNOVÁ CHROMATOGRÁFIA

Kolóna musí poskytovať rozlíšenie „R“ rovné alebo lepšie ako 1,5, kde

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

nech

r_1 a r_2 sú retenčné časy (v minútach),

W_1 a W_2 je šírka pík v polovičnej výške píku (v milimetroch),

d' je rýchlosť posunu zapisovača (v milimetroch za minútu).

Ako vhodné sa ukázali nasledujúce podmienky pre plynovú chromatografiu

Kolóna: nehrdzavejúca oceľ.

Dĺžka: 1,7 m.

Priemer: 3 mm.

Nosič:

Chromosorb: WAW,

Zrornosť: 80 až 100 mesh.

Stacionárna fáza: 10 % OV 17.

Teploty:

Kolóna: 280 °C,

Dávkovací ventil: 280 °C,

Detektor: 280 °C.

Nosný plyn: dusík zbavený kyslíka.

Tlak: 2,3 bar.

Prietoková rýchlosť: 30 ml/min.

8. VÝPOČET

8.1. **Odozvoový faktor hexachlorofénu**

Tento sa vypočíta vo vzťahu k zvolenému štandardu a voči referenčnej zmesi.

Nech

h je hexachlorofén,

k_h je jeho odozvoový faktor,

m'_h je jeho hmotnosť v zmesi (v miligramoch),

A'_h je plocha jeho píku,

s je zvolený štandard,

m'_s je jeho hmotnosť v zmesi (v miligramoch),

A'_s je plocha jeho píku,

potom

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

8.2. **Obsah hexachlorofénu vo vzorke**

Nech

h je hexachlorofén,

k_h je jeho odozvový faktor,

A_h je plocha jeho píku.

s je zvolený štandard,

m_s je jeho hmotnosť v zmesi (v gramoch),

A_s je plocha jeho píku,

M je hmotnosť odobratej vzorky (v gramoch),

potom

% (hmot.) hexachlorofénu vo vzorke je

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

9. **OPAKOVATELNOSŤ²**

Pri obsahu hexachlorofénu 0,1 % (hmot.) rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelne uskutočnených stanovení na tej istej vzorke nesmie presiahnuť absolútnu hodnotu 0,005 % (hmot.).

20. STANOVENIE TOSYLCHLÓRAMIDU SODNÉHO (INN)

(Podľa smernice Komisie 83/514/EHS z 27. septembra 1983)

1. ROZSAH A OBLASŤ POUŽITIA

Táto metóda opisuje stanovenie tosylchlóramidu sodného (chlóramínu-T) v kozmetických výrobkoch tenkovrstvovou chromatografiou.

2. DEFINÍCIA

Obsah chlóramínu-T stanovený vo vzorke podľa tejto metódy sa vyjadrí v hmotnostných percentách (hmot.).

3. PRINCÍP

Chlóramín-T úplne zhydrolyzuje na 4-metylbenzénsulfónamid povarením s kyselinou chlorovodíkovou.

Množstvo vzniknutého 4-metylbenzénsulfónamidu sa stanoví po chromatografii na tenkej vrstve fotodenzitometricky.

4. ČINIDLÁ

Všetky činidlá majú byť analyticky čisté.

4.1. Tosylchlóramid sodný (chlóramín-T).

4.2. Štandardný roztok 4-metylbenzénsulfónamidu (4-toluénsulfónamidu) 50 mg 4-metylbenzénsulfónamidu v 100 ml etanolu (4.5.).

4.3. Kyselina chlorovodíková, 37 % (hmot.), $d_4^{20} = 1,18$ g/ml.

4.4. Dietyléter.

4.5. Etanol, 96 % (obj.).

4.6. Vyvíjacie *rozpušťač*

4.6.1. Bután-1-ol / etanol (4.5) / voda (40 : 4 : 9; obj. diely), alebo

4.6.2. Chloroform / acetón (6 : 4; obj. diely).

4.7. Hotové platne na tenkovrstvovú chromatografiu, silikagél 60, bez fluorescenčného indikátora.

4.8. Manganistan draselný.

4.9. Kyselina chlorovodíková, 15 % (hmot.).

4.10. Detekčné činidlo: 2-toluidín, 1 % (m/v) roztok v etanole (4.5.).

5. PRÍSTROJE A POMÔCKY

5.1. Bežné laboratórne vybavenie.

5.2. Bežné vybavenie na tenkovrstvovú chromatografiu.

5.3. Fotodenzitometer.

6. POSTUP

6.1. *Hydrolyza*

Do 50 ml banky s guľatým dnom sa presne naváži približne 1 g vzorky (m). Pridá sa 5 ml vody a 5 ml kyseliny chlorovodíkovej (4.3.) a varí sa jednu hodinu s použitím spätného chladiča. Horúca suspenzia sa ihneď preniesie vodou do 50 ml odmernej banky. Nechá sa ochladiť a doplní sa vodou po značku. Odstreduje sa päť minút na centrifúge pri aspoň 3 000 ot./min. a kvapalný supernatant sa prefiltruje.

6.2. **Extrakcia**

6.2.1. Vezme sa 30 ml filtrátu a extrahuje sa trikrát s 15 ml dietyléteru (4.4.). Ak je to potrebné, éterové fázy sa vysušia a zachytávajú sa do 50 ml odmernej banky. Doplní sa dietyléterom (4.4.) po značku.

6.2.2. Odoberie sa 25 ml vysušeného éterového extraktu a odparí sa do sucha v prúde dusíka. Odparok sa znova rozpustí v 1 ml etanolu (4.5.).

6.3. **Tenkovrstvová chromatografia**

6.3.1. 20 µl etanolového roztoku odparku (6.2.) sa nanesie na tenkovrstvovú platničku (4.7.).

Súčasne sa rovnakým spôsobom nanesie 8, 12, 16 a 20 µl štandardného roztoku 4-metylbenzénsulfónamidu (4.2.).

6.3.2. Nechá sa vyvíjať vo vyvíjacom rozpúšťadle (4.6.1. alebo 4.6.2.) do výšky približne 150 mm.

6.3.3. Po úplnom odparení vyvíjacieho rozpúšťadla sa platnička umiestni na dve až tri minúty do atmosféry pár chlóru, ktorá je vytvorená naliatím asi 100 ml kyseliny chlorovodíkovej (4.9.) na asi 2 g manganistanu draselného (4.8.) v uzatvorenej nádobe. Nadbytok chlóru sa odstráni zahrievaním platničky päť minút na 100 °C. Potom sa platnička postrieka detekčným činidlom (4.10.).

6.4. **Meranie**

Približne po jednej hodine sa intenzita fialových škvŕn zmeria pomocou fotodenzitometra pri 525 nm.

6.5. **Zostrojenie kalibračnej krivky**

Zistené maximálne hodnoty výšky píkov stanovených pre štyri škvŕny 4-metylbenzénsulfónamidu sa vynesú oproti príslušným množstvám 4-metylbenzénsulfónamidu (t.j. 4, 6, 8 a 10 µg 4-metylbenzénsulfónamidu na škvŕnu).

7. **POZNÁMKA**

Metóda sa môže overiť s použitím 0,1 alebo 0,2 % (hmot./objem) roztoku chlórámínu-T (4.1) spracovaného rovnakým spôsobom ako vzorka (6).

8. **VÝPOČET**

Obsah chlórámínu-T vo vzorke vyjadrený v hmotnostných percentách sa vypočíta takto

$$\% \text{ (hmot.) tosylchlórámidu sodného} = \frac{1,33 \times a}{60 \times m},$$

kde

1,33 je koeficient konverzie chloramínu-T na 4-metylbenzénsulfónamid,

a je množstvo 4-metylbenzénsulfónamidu vo vzorke (v µg) odčítané z kalibračnej krivky,

m je hmotnosť odobratej analyzovanej vzorky (v gramoch).

9. **OPAKOVATELNOSŤ²**

Pri obsahu chlórámínu-T okolo 0,2 % (hmot.) rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelne uskutočnených stanovení na tej istej vzorke nesmie presiahnuť absolútnu odnotu 0,03 % (hmot.).

21. STANOVENIE CELKOVÉHO OBSAHU FLUÓRU V ZUBNÝCH PASTÁCH (Podľa smernice Komisie 83/514/EHS z 27. septembra 1983)

1. ROZSAH A OBLASŤ POUŽITIA
Táto metóda je určená na stanovenie celkového obsahu fluóru v zubných pastách. Je vhodná pre obsah fluóru neprevyšujúci 0,25 %.
2. DEFINÍCIA
Obsah fluóru stanovený vo vzorke podľa tejto metódy sa vyjadří v hmotnostných percentách.
3. PRINCÍP
Stanovenie fluóru sa uskutoční plynovou chromatografiou. Fluór obsiahnutý v zlúčeninách fluóru sa prevedie na trietylfluórsilán (TEFS) priamou reakciou s trietylchlórsilánom (TECS) v kyslom prostredí a súčasne sa extrahuje xylénom obsahujúcim cyklohexán ako vnútorný štandard.
4. ČINIDLÁ
Všetky činidlá musia byť analyticky čisté.
 - 4.1. Fluorid sodný, vysušený pri 120 °C do konštantnej hmotnosti,
 - 4.2. Voda, dvakrát destilovaná alebo podobnej kvality,
 - 4.3. Kyselina chlorovodíková, $d^{20} = 1,19$ g/ml,
 - 4.4. Cyklohexán (CH),
 - 4.5. Xylén bez ďalších píkov v chromatograme pred píkom rozpúšťadla pri chromatografii za rovnakých podmienok ako sú uvedené pre vzorku (6.1.). Ak je to potrebné, prečistí sa destiláciou (5.8.),
 - 4.6. Trietylchlórsilán (TECS Merck alebo ekvivalentný).
 - 4.7. *Štandardné roztoky fluóru*
 - 4.7.1. Zásobný roztok, 0,250 mg F/ml. Presne sa naváži 138,1 mg fluoridu sodného (4.1.) a rozpustí sa vo vode (4.2.). Roztok sa kvantitatívne preniesie do 250 ml odmernej banky (5.5.). Zriedi sa vodou (4.2.) po značku a premieša sa.
 - 4.7.2. Zriedený zásobný roztok, 0,050 mg F/ml. Do 100 ml odmernej banky (5.5.) sa pipetou preniesie 20 ml zásobného roztoku (4.7.1.). Zriedi sa vodou po značku a premieša sa.
 - 4.8. *Roztok vnútorného štandardu*
Zmieša sa 1 ml cyklohexánu (4.4.) a 5 ml xylénu (4.5.).
 - 4.9. *Roztok trietylchlórsilánu/ vnútorný štandard*
Do 10 ml odmernej banky s pipetou (5.7) preniesie 0,6 ml TECS (4.6.) a 0,12 ml roztoku vnútorného štandardu (4.8.). Zriedi sa xylénom (4.5.) po značku a premieša sa. Pripravuje sa denne čerstvý.
 - 4.10. Kyselina chloristá, 70 % (m/v),
 - 4.11. Kyselina chloristá, 20 % (m/v) roztok vo vode (4.2).
5. PRÍSTROJE A POMÔCKY
 - 5.1. Bežné laboratórne vybavenie,
 - 5.2. Plynový chromatograf vybavený plameňovo-ionizačným detektorom,
 - 5.3. Miešadlo Vortex alebo ekvivalentné,
 - 5.4. Trepačka Bühler, typ SMB1 alebo ekvivalentná,
 - 5.5. Odmerné banky, 100 a 250 ml, vyrobené z polypropylénu,

- 5.6. Centrifugačné kyvety (sklené), 20 ml so závitovým uzáverom potiahnutým teflónom, typu Sovirel 611-56 alebo ekvivalentné. Kyvety a uzávery sa prečistia lúhovaním niekoľko hodín v kyseline chloristej (4.11.), potom sa päťkrát opláchnu vodou (4.2.) a nakoniec sa vysušia pri 100 °C,
- 5.7. Pipety, nastaviteľné na prenášanie objemov od 50 do 200 µl, s jednorázovými plastovými špičkami,
- 5.8. Destilačná aparátúra, vybavená s trojdielnou Schneiderovou kolónou alebo ekvivalentnou Vigreuxovou kolónou.

6. POSTUP

6.1. *Analýza vzorky*

- 6.1.1. Vyberie sa ešte neotvorená tuba zubnej pasty, tuba sa rozreže a vyberie sa celý obsah. Prenesie sa do plastovej nádoby, dôkladne sa premieša a uchováva sa za podmienok, ktoré zabraňujú jej znehodnoteniu.
- 6.1.2. Do centrifugačnej kyvety (5.6.) sa presne naváži 150 mg (m) vzorky, pridá sa 5 ml vody (4.2.) a zhomogenizuje sa (5.3.).
- 6.1.3. Pridá sa 1 ml xylénu (4.5.).
- 6.1.4. Po kvapkách sa pridá 5 ml kyseliny chlorovodíkovej (4.3.) a zhomogenizuje sa (5.3.).
- 6.1.5. Do centrifugačnej kyvety (5.6.) sa pridá 0,5 ml roztoku trietylchlórsilánu/vnútorého štandardu (4.9.).
- 6.1.6. Kyveta sa uzavrie závitovým uzáverom (5.6.) a nechá sa 45 minút dôkladne premiešať na trepačke (5.4.) nastavenej na 150 kmitov za minútu.
- 6.1.7. Odstreďuje sa 10 minút na centrifúge pri rýchlosti, aby sa fázy dobre oddelili, kyveta a odzátkuje, vyberie sa organická fáza a 3 µl organickej fázy sa nastreknú do plynového chromatografu (5.2.).

Poznámka

Elúcia všetkých zložiek trvá približne 20 minút.

- 6.1.8. Nástrek sa opakuje, vypočíta sa priemerná hodnota pomeru plôch píkOV (A_{TEFS}/A_{CH}) a zodpovedajúci obsah fluóru (m_1 , v miligramoch) sa odčíta z kalibračnej krivky (6.3.).
- 6.1.9. Vypočíta sa celkový obsah fluóru vo vzorke (v hmotnostných percentách fluóru), podľa spôsobu uvedenom v odseku 7.

6.2. *Podmienky pre chromatografiu*

- 6.2.1. Kolóna: nehrdzavejúca oceľ.

Dĺžka: 1,8 m.

Priemer: 3 mm.

Nosič: Gaschrom Q, 80 až 100 mesh.

Stacionárna fáza: silikónový olej DC 200 alebo ekvivalentný, 20 %.

Kolóna sa kondicionuje (pripraví na meranie) cez noc pri 100 °C (prietoková rýchlosť nosného plynu: 25 ml dusíka za minútu) a opakuje sa každú noc. Po každých štyroch alebo piatich nástrekoch sa kolóna znova pripraví na meranie zahrievaním 30 minút na 100 °C.

Teploty:

Kolóna: 70 °C,

Dávkovací ventil: 150 °C,

Detektor: 250 °C.

Prietoková rýchlosť nosného plynu: 35 ml dusíka za minútu.

6.3. *Kalibračná krivka*

- 6.3.1. Do série šiestich centrifugačných kyviet (5.6) sa pipetou prenesie 0, 1, 2, 3, 4 a 5 ml zriedeného štandardného roztoku fluóru (4.7.2.). V každej kyvete sa vodou (4.2.) doplní objem do 5 ml.
- 6.3.2. Postupuje sa, ako je opísané pod 6.1.3. až 6.1.6., vrátane.
- 6.3.3. 3 µl organickej fázy sa nastreknú do plynového chromatografu (5.2.).
- 6.3.4. Nástrek sa zopakuje a vypočíta sa priemerná hodnota pomeru plochy pík (A_{TEFS}/A_{CH}).
- 6.3.5. Zostrojí sa kalibračná krivka závislosti hmotnosti fluóru (v miligramoch) v štandardných roztokoch (6.3.1.) a pomeru plôch pík (A_{TEFS}/A_{CH}) nameraného pod 6.3.4. Cez body na grafe sa preloží optimalizovaná priamka vypočítaná regresnou analýzou.

7. VÝPOČET

Celkový obsah fluóru vo vzorke (v percentách hmotnosti fluóru) (% (hmot.) F) je daný

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

kde

m je testovaný podiel vzorky (v miligramoch) (6.1.2),

m₁ je množstvo F (v miligramoch) odčítané z kalibračnej krivky (6.1.8).

8. OPAKOVATELNOSŤ²

Pri obsahu fluóru okolo 0,15 % (hmot.) rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelne uskutočnených stanovení na tej istej vzorke nesmie presiahnuť absolútnu hodnotu 0,012 % (hmot.).

22. DÔKAZ A STANOVENIE ORGANOORTUŤNATÝCH ZLÚČENÍN

(Podľa smernice Komisie 83/514/EHS z 27. septembra 1983)

ROZSAH A OBLASŤ POUŽITIA

Nižšie opísaná metóda môže byť použitá na dôkaz a stanovenie organoortuťnatých derivátov použitých ako konzervačné látky v kozmetických výrobkoch na oči. Táto metóda je použiteľná na tiomersál (nátrium-2-(etylhydrargýriosulfanyl)benzoát) a fenyhydrargýrium a jeho soli.

A. DÔKAZ

1. PRINCÍP

Organoortuťnaté zlúčeniny sa prevedú na komplex s 1,5-difenyl-3-tiokarbazónom. Po extrakcii ditizonátu s chloridom uhličitým sa uskutoční tenkovrstvová chromatografia na silikagéli. Škvrnny ditizonátu sa prejaví na chromatograme oranžovým sfarbením.

2. ČINIDLÁ

Všetky činidlá musia byť analyticky čisté.

- 2.1. Kyselina sírová, 25 % (obj.),
- 2.2. 1,5-Difenyl-3-tiokarbazón (ditizón): 0,8 mg v 100 ml chloridu uhličitého (2.4),
- 2.3. Dusík,
- 2.4. Chlorid uhličitý,
- 2.5. Vyvíjacie rozpúšťadlo: hexán / acetón, 90 : 10 (obj. diely),
- 2.6. Roztoky štandardov 0,001 % vo vode
Nátrium-(2-etylhydrargýriosulfanyl)benzoátu,
Etylhydrargýrium-chloridu alebo metylhydrargýrium-chloridu,
Fenyhydrargýrium-nitrátu alebo fenyhydrargýrium-acetátu,
Chloridu ortuťnatého alebo octanu ortuťnatého,
- 2.7. Hotové silikagélové platničky (napr. Merck 5721 alebo ekvivalentné),
- 2.8. Chlorid sodný.

3. PRÍSTROJE A POMÔCKY

- 3.1. Bežné laboratórne vybavenie,
- 3.2. Bežná vybavenie na TLC,
- 3.3. Filter na separáciu fáz.

4. POSTUP

4.1. *Extrakcia*

- 4.1.1. 1 g vzorky sa zriedi v centrifugačnej kyvete titráciou s 20 ml destilovanej vody. Získa sa čo najlepšia disperzia a zohreje sa na 60 °C na vodnom kúpeli. Pridajú sa 4 g chloridu sodného (2.8.). Pretrepe sa. Nechá sa vychladiť.
- 4.1.2. Odstreďuje sa na centrifúge aspoň 20 minút pri rýchlosti 4 500 ot./min, aby sa väčšia časť tuhej fázy oddelila od kvapaliny. Prefiltruje sa do oddeľovacieho lievika a pridá 0,25 ml roztoku kyseliny sírovej (2.1.).
- 4.1.3. Extrahuje sa niekoľkokrát s 2 až 3 ml roztoku ditizónu (2.2.), až kým posledná organická fáza nezostane zelená.
- 4.1.4. Každá organická fáza sa jedna po druhej prefiltrujú cez filter na separáciu fáz (3.3.).
- 4.1.5. Odparí sa dosucha v prúde dusíka (2.3.).

4.1.6. Rozpustí sa v 0,5 ml chloridu uhličitého (2.4.). Tento roztok sa okamžite použije, ako je uvedené v 4.2.1.

4.2. *Separácia a dôkaz*

4.2.1. 50 µl roztoku v chloride uhličitom, získaného v 4.1.6., sa ihneď nanesie na silikagélovú platničku (2.7.). Súčasne sa ako v 4.1. spracuje 10 ml štandardného roztoku (2.6.) a na tú istú platničku sa nanesie 50 µl roztoku získaného v 4.1.6.

4.2.2. Platnička sa umiestni do rozpúšťadla (2.5.) a rozpúšťadlo sa nechá vystúpiť do 150 mm. Organoortuťnaté zlúčeniny sa prejavia ako sfarbené škvrny, ich farba je stabilná za predpokladu, že sa platnička zakryje sklenenou platňou ihneď po odparení rozpúšťadla.

Ako príklad boli zistené nasledovné R_f hodnoty

	R_f	Sfarbenie
tiomersál	0,33	oranžové
etylhydrargýrium-chlorid	0,29	oranžové
metylhydrargýrium-chlorid	0,29	oranžové
fenylortuťnaté soli	0,21	oranžové
ortuťnaté soli	0,10	oranžové
octan ortuťnatý	0,10	oranžové
1,5-difenyl-3-tiokarbazon	0,09	ružové

B. STANOVENIE

1. DEFINÍCIA

Obsah organoortuťnatých zlúčenín stanovený touto metódou sa vyjadří ako hmotnostné percento ortuti vo vzorke.

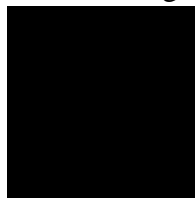
2. PRINCÍP

Táto metóda spočíva v stanovení celkového množstva prítomnej ortuti. Je preto potrebné sa najprv uistiť, že nie je prítomná ortuť vo forme anorganických solí a identifikovať organoortuťnaté deriváty prítomné vo vzorke. Po mineralizácii sa uvoľnená ortuť stanoví bezplameňovou atómovou absorpčnou spektroskopiou.

3. ČINIDLÁ

Všetky činidlá musia byť analytické čisté.

3.1. Koncentrovaná kyselina dusičná, $d_{20} = 1,41$ g/ml,



3.2. Koncentrovaná kyselina sírová, $d_{20} = 1,84$ g/ml,

3.3. Redestilovaná voda,

3.4. Manganistan draselný, 7 % (m/v) roztok,

3.5. Hydroxylamónium-chlorid (hydrochlorid hydroxylamínu), 1,5 % (m/v) roztok,

3.6. Peroxodisíran didraselný, 5 % (m/v) roztok,

3.7. Chlorid cínatý, 10 % (m/v) roztok,

- 3.8. Koncentrovaná kyselina chlorovodíková, $d_{20} = 1,18 \text{ g/ml}$,
3.9. Sklená vata impregnovaná chloridom paládnatým, 1 % (hmot.).

4. PRÍSTROJE A POMÔCKY

- 4.1. Bežné laboratórne vybavenie.
4.2. Prístroj na stanovenie ortuti bezplameňovou atómovou absorpčnou spektroskopiou (technika generovania studenej pary), vrátane potrebného laboratórneho skla. Optická dráha kyvety má byť aspoň 100 mm.

5. POSTUP

Vykonajú sa všetky bežné opatrenia pre stopovú analýzu ortuti.

5.1. **Rozklad**

- 5.1.1. Presne sa naváži 150 mg vzorky (m). Pridá sa 10 ml kyseliny dusičnej (3.1.) a nechá sa pôsobiť tri hodiny vo vzduchotesne uzavretej banke na vodnom kúpeli pri 55 °C za pravidelného občasného pretrepávania. Súčasne sa s činidlami uskutoční slepý pokus.
5.1.2. Po ochladení sa pridá 10 ml kyseliny sírovej (3.2.) a vráti sa na 30 minút do vodného kúpeľa temperovaného na 55 °C.
5.1.3. Banka sa umiestni do ľadového kúpeľa a opatrne sa pridá 20 ml vody (3.3.).
5.1.4. V 2 ml dávkach sa pridáva 7 % roztok manganistanu draselného (3.4.), kým roztok neostane sfarbený. Na ďalší 15 minút sa vráti do vodného kúpeľa temperovaného na 55 °C.
5.1.5. Pridajú sa 4 ml roztoku peroxidisíranu didraselného (3.6.). Pokračuje sa v zohrievaní na vodnom kúpeli pri 55 °C počas 30 minút.
5.1.6. Nechá sa ochladiť a obsah banky sa prenesie do 100 ml odmernej banky. Banka sa opláchne 5 ml roztoku hydroxylamónium-chloridu (3.5.) a potom sa opláchne štyrikrát 10 ml vody (3.3.). Roztok by mal byť úplne bezfarebný. Doplní sa vodou (3.3.) po značku.

5.2. **Stanovenie**

- 5.2.1. 10 ml testovaného roztoku (5.1.6.) sa umiestni do sklenej nádoby na stanovenie ortuti technikou generovania studených pár (4.2.). Zriedi sa 100 ml vody (3.3.) a následne sa pridá 5 ml kyseliny sírovej (3.2.) a 5 ml roztoku chloridu cínatého (3.7.). Po každom prídavku sa premieša. Počká sa 30 sekúnd, kým sa všetka ortuť vo forme iónov zredukuje na kovovú ortuť a zmeria sa výsledná hodnota (n).
5.2. Určité množstvo sklenej vaty impregnovanej chloridom paládnatým (3.9.) sa vloží medzi nádobu na redukciu ortuti a prietokovú kyvetu prístroja (4.2.). Postup podľa 5.2.1. sa opakuje a odčíta sa výsledná hodnota. Ak odčítaná hodnota nie je nulová, mineralizácia nebola úplná a analýza sa musí zopakovať.

6. VÝPOČET

Nech

m je hmotnosť testovanej vzorky (v miligramoch),

n je množstvo ortuti (v µg) odčítané na prístroji.

Obsah ortuti, vyjadrený v hmotnostných percentách ortuti sa vypočíta podľa vzorca

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

7. POZNÁMKY

- 7.1. Na zlepšenie mineralizácie môže byť potrebné na začiatku vzorku zriediť.
- 7.2. Ak je podozrenie na absorpciu ortuti substrátom, kvantitatívne stanovenie môže byť vykonané metódou štandardných prídavkov.

8. OPAKOVATEĽNOSŤ²

V prípade obsahu ortuti 0,007 % rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelne uskutočnených stanovení na tej istej vzorke nesmie presiahnuť absolútnu hodnotu 0,00035 %.

23. STANOVENIE SULFIDOV ALKALICKÝCH KOVOV A KOVOV ALKALICKÝCH ZEMÍN

(Podľa smernice Komisie 83/514/EHS z 27. septembra 1983)

1. ROZSAH A OBLASŤ POUŽITIA
Táto metóda opisuje stanovenie sulfidov prítomných v kozmetických výrobkoch. Prítomnosť tiolov alebo iných redukčných činidiel (vrátane siričitanov) neruší stanovenie.
2. DEFINÍCIA
Obsah sulfidov stanovený vo vzorke podľa tejto metódy sa vyjadří v hmotnostných percentách síry.
3. PRINCÍP
Po okyslení média sa sulfán (sírovodík) strháva prúdom dusíka a potom sa vyzráža vo forme sulfidu kademnatého. Ten sa odfiltruje a premyje a potom sa stanoví jodometricky.
4. ČINIDLÁ
Všetky činidlá musia byť analyticky čisté.
 - 4.1. Koncentrovaná kyselina chlorovodíková, $d_{20} = 1,19$ g/ml,
 - 4.2. Tiosíran sodný, 0,1 M štandardný roztok,
 - 4.3. Jód, 0,05 M štandardný roztok,
 - 4.4. Sulfid sodný,
 - 4.5. Octan kademnatý,
 - 4.6. Koncentrovaný amoniak, $d_{20} = 0,90$ g/ml,
 - 4.7. Amoniakálny roztok octanu kademnatého: 10 g octanu kademnatého (4.5.) sa rozpustí približne v 50 ml vody. Pridáva sa amoniak (4.6.), kým sa vzniknutá zrazenina znova nerozpustí (t.j. približne 20 ml). Doplní sa vodou po 100 ml značku,
 - 4.8. Dusík,
 - 4.9. 1 M roztok amoniaku.
5. PRÍSTROJE A POMÔCKY
 - 5.1. Bežné laboratórne vybavenie.
 - 5.2. 100 ml banka s guľatým dnom a troma zábrusovými sklenenými hrdlami,
 - 5.3. Dve 150 ml kónické banky so zábrusovými sklenenými hrdlami, s rúrkou na prívod a odvod plynu,
 - 5.4. Jeden lievik s dlhou stopkou.
6. POSTUP
 - 6.1. **Uvoľnenie sulfidov**
 - 6.1.1. Vezme sa balenie, ktoré ešte nebolo otvorené. Do banky s guľatým dnom (5.2.) sa presne naváži množstvo (m) (vyjadrené v gramoch) výrobku, ktoré odpovedá nie viac ako 30 mg sulfidových iónov. Pridá sa 60 ml vody a dve kvapky kvapaliny obmedzujúcej penenie.
 - 6.1.2. 50 ml roztoku 4.7 sa preniesie do každej z dvoch kónických baniek (5.3.).
 - 6.1.3. Na banku s guľatým okrúhlym dnom (5.2.) sa pripojí prikvapkávací lievik, rúrky na prívod a odvod plynu. Rúrka na odvod plynu sa pripojí ku kónickým bankám (5.3.) zapojeným do série prostredníctvom PVC hadíc.

Poznámka Aparatúra na uvoľnenie sulfidov musí prejsť nasledujúcim testom tesnosti: za rovnakých skúšobných podmienok sa vzorka, ktorá sa má skúšať, sa nahradí 10 ml roztoku sulfidu sodného (pripraveného podľa 4.4.) obsahujúceho „X mg“ sulfidu (stanoveného jodometricky). Nech „Y“ je počet miligramov sulfidu stanoveného v závere tejto operácie. Rozdiel medzi množstvom „X“ a množstvom „Y“ nesmie prekročiť 3 %.

- 6.1.4. Aby sa vytlesnil vzduch obsiahnutý v banke s guľatým dnom (5.2.), prepúšťa sa cez ňu 15 minút dusík (4.8.) rýchlou rýchlosťou dve bublinky za sekundu.
- 6.1.5. Banka s guľatým dnom sa zahreje na 85 ± 5 °C.
- 6.1.6. Prúd dusíka (4.8.) sa zastaví a po kvapkách sa pridá 40 ml roztoku kyseliny chlorovodíkovej (4.1.).
- 6.1.7. Prúd dusíka (4.8.) sa znova spustí, keď sa pridá už takmer všetko množstvo kyseliny chlorovodíkovej, a ponechá sa minimálne množstvo kvapaliny na utesnenie, aby sa predišlo unikaniu sulfánu.
- 6.1.8. Po 30 minútach sa zastaví zahrievanie. Banka (5.2.) sa nechá ochladiť a pokračuje sa v prepúšťaní prúdu dusíka (4.8.) ešte aspoň hodinu a pol.
- 6.2. **Titrácia**
- 6.2.1. Sulfid kademnatý sa prefiltruje cez lievik s dlhou stopkou (5.4.).
- 6.2.2. Kónické banky (5.3) sa opláchnu roztokom amoniaku (4.9.) a ich obsah sa vyleje na filter. Potom sa opláchnu destilovanou vodou a voda sa použije na premytie zrazeniny zachytenej na filtri.
- 6.2.3. Premývanie zrazeniny sa ukončí 100 ml vody.
- 6.2.4. Filtračný papier so zrazeninou sa preniesie do prvej kónickej banky, ktorá obsahovala zrazeninu. Pridá sa 25 ml (n_1) roztoku jódu (4.3.), približne 20 ml kyseliny chlorovodíkovej (4.1.) a 50 ml destilovanej vody.
- 6.2.5. Nadbytok jódu sa stanoví titráciou s roztokom tiosíranu sodného (n_2) (4.2.).

7. VÝPOČET

Obsah sulfidov vo vzorke, vyjadrený v hmotnostných percentách síry sa vypočíta podľa nasledovného vzorca

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

kde

- n_1 je objem použitého štandardného roztoku jódu (v mililitroch),
- x_1 je molarita tohto roztoku,
- n_2 je objem spotrebovaného štandardného roztoku tiosíranu sodného (4.2.) (v mililitroch),
- x_2 je molarita tohto roztoku,
- m je hmotnosť testovanej vzorky (v gramoch).

8. OPAKOVATELNOSŤ ²⁾

Pre obsah sulfidov okolo 2 % (hmot.) rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelne uskutočnených stanovení na tej istej vzorke nesmie presiahnuť absolútnu hodnotu 0,2 % (hmot.).

24. DÔKAZ A STANOVENIE (2,3-DIHYDROXYPROPYL)-4-AMINOBENZOÁTU (Podľa smernice Komisie 85/490/EHS z 11. októbra 1985)

A. DÔKAZ

1. ROZSAH A OBLASŤ POUŽITIA

Táto metóda opisuje detekciu (2,3-dihydroxypropyl)-4-aminobenzoátu (α -monoglyceryl-4-aminobenzoátu). Tiež bude detekovať etyl-4-aminobenzoát (benzokaín), ktorý môže byť prítomný ako nečistota.

2. PRINCÍP

Tento dôkaz sa uskutoční tenkovrstvovou chromatografiou na silikagéli s fluorescenčným indikátorom a detekciou voľnej primárnej aminoskupiny tvorbou diazénového farbiva na platni.

3. ČINIDLÁ

Všetky činidlá by mali byť analyticky čisté.

3.1. Rozpúšťadlová zmes: cyklohexán/propán-2-ol/stabilizovaný dichlórmetán: 48/64/9 (obj. diely).

3.2. Vyvíjacie rozpúšťadlo: petroléter (40-60)/benzén/acetón/roztok hydroxidu amónneho (obsahujúci minimálne 25 % NH_3): 35/35/35/1 (obj. diely).

3.3. Vyvolací roztok

a) Dusitan sodný: 1 g v 100 ml 1 M kyseliny chlorovodíkovej (pripravený tesne pred použitím),

b) 2-naftol: 0,2 g v 100 ml 1 M hydroxidu draselného,

3.4. Štandardné roztoky

(2,3-dihydroxypropyl)-4-aminobenzoát: 0,05 g v 100 ml zmesného rozpúšťadla 3.1,

Etyl-4-aminobenzoát 0,05 g v 100 ml zmesného rozpúšťadla 3.1.,

3.5. Silikagélové platne 60 F254 s hrúbkou 0,25 mm, 200 mm \times 200 mm.

4. PRÍSTROJE A POMÔCKY

4.1. Bežné zariadenie na tenkovrstvovú chromatografiu

4.2. Ultrazvukový kúpeľ

4.3. Milipore filter FH 0,5 μm alebo ekvivalentný

5. POSTUP

5.1. *Príprava vzorky*

Do 10 ml zazátkovateľnej odmernej banky sa naváži 1,5 g výrobku. Doplní sa rozpúšťadlom 3.1 po značku. Zazátkuje sa a nechá sa jednu hodinu pri laboratórnej teplote v ultrazvukovom kúpeľi (4.2.). Prefiltruje sa cez Milipore filter (4.3.) a filtrát sa použije na chromatografiu.

5.2. *Tenkovrstvová chromatografia*

Na platňu (3.5.) sa nanesie po 10 μl roztoku vzorky (5.1.) a každého štandardného roztoku (3.4.).

Chromatogram sa vyvíja vo vyvíjacej komore dopredu nasýtenej rozpúšťadlom 3.2., do výšky 150 mm. Platňa sa nechá vysušiť pri laboratórnej teplote.

5.3. *Vyvolanie*

5.3.1. Platňa sa pozoruje pod UV svetlom pri 254 nm.

5.3.2. Úplne vysušená platňa sa postrieka roztokom 3.3.1.

Nechá sa vysušiť 1 minútu pri laboratórnej teplote a ihneď sa postrieka roztokom 3.3.2.

Platňa sa vysuší v sušiarňi pri 60 °C. Škvrnky sa prejavajú oranžovým sfarbením. (2,3-dihydroxypropyl)-4-aminobenzoát: R_F 0,07; etyl-4-aminobenzoát: R_F 0,55.

B. STANOVENIE

1. ROZSAH A OBLASŤ POUŽITIA

Táto metóda opisuje stanovenie (2,3-dihydroxypropyl)-4-aminobenzoátu (α -monoglyceryl-4-aminobenzoátu). Tiež sa stanoví etyl-4-aminobenzoát. Nie je vhodná na stanovenie viac ako 5 % (hmot.) (2,3-dihydroxypropyl)-4-aminobenzoátu a 1 % (hmot.) etyl-4-aminobenzoátu.

2. DEFINÍCIA

Obsah (2,3-dihydroxypropyl)-4-aminobenzoátu a etyl-4-aminobenzoátu stanovený touto metódou sa vyjadří v hmotnostných percentách (% hmotn.) výrobku.

3. PRINCÍP

Analyzovaný výrobok sa suspenduje v metanole a po vhodnom spracovaní vzorky sa stanoví vysoko účinnou kvapalinovou chromatografiou (HPLC).

4. ČINIDLÁ

Všetky činidlá musia byť analyticky čisté a vhodné na HPLC, kde sa to požaduje.

4.1. Metanol,

4.2. Dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4),

4.3. Octan zinočnatý ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$),

4.4. Kyselina octová ($d_{40}^{20} = 1,05$),

4.5. Hexakynoželeznan draselný ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$),

4.6. Etyl-4-hydroxybenzoát,

4.7. (2,3-Dihydroxypropyl)-4-aminobenzoát,

4.8. Etyl-4-aminobenzoát,

4.9. Fosforečnanový tlmivý roztok (0,02 M): 2,72 g dihydrogenfosforečnanu draselného (4.2) sa rozpustí v jednom litri vody,

4.10. Eluent: fosforečnanový tlmivý roztok (4.9)/metanol (4.1): 61/39 (obj. diely), Zloženie mobilnej fázy sa môže upraviť, aby sa dosiahol koeficient rozlíšenia $R \geq 1,5$

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

kde

R_1 a R_2 sú retenčné časy pík, v minútach,

W_1 a W_2 je šírka pík v polovičnej výške, v milimetroch,

d' je rýchlosť zapisovača, v milimetroch za minútu.

4.11. Zásobný roztok (2,3-dihydroxypropyl)-4-aminobenzoátu: presne sa naváži približne 40 mg (2,3-dihydroxypropyl)-4-aminobenzoátu a prenesie sa do 100 ml odmernej banky. Rozpustí sa v 40 ml metanolu (4.1.). Doplní sa tlmivým roztokom (4.9.) po značku a premieša sa.

4.12. Zásobný roztok etyl-4-aminobenzoátu: presne sa naváži približne 40 mg (2,3-dihydroxypropyl)-4-aminobenzoátu a prenesie sa do 100 ml odmernej banky.

- Rozpustí sa v 40 ml metanolu (4.1.). Doplní sa tlmivým roztokom (4.9.) po značku a premieša sa.
- 4.13. Roztok vnútorného štandardu: presne sa naváži približne 50 mg etyl-4-hydroxybenzoátu (4.6), prenesie sa do 100 ml odmernej banky, rozpustí sa v 40 ml metanolu (4.1.), doplní sa tlmivým roztokom (4.9.) po značku a premieša sa.
- 4.14. Štandardné roztoky: rozpustením v 100 ml eluentu (4.10.) sa podľa nasledovnej tabuľky pripraví štyri štandardné roztoky

Štandardný roztok	(2,3-dihydroxypropyl)-4-aminobenzoát		Etyl-4-aminobenzoát		Etyl-4-hydroxybenzoát	
	(µg/ml) (*)	ml (4.11)	(µg/ml) (*)	ml (4.12)	(µg/ml) (*)	ml (4.13)
I	8	2	8	2	50	10
II	16	4	12	3	50	10
II	24	6	16	4	50	10
IV	40	10	20	5	50	10

(*) Tieto hodnoty sú uvedené na indikáciu a odpovedajú presným hmotnostiam 4.11., 4.12. a 4.13.

Poznámka Tieto roztoky sa môžu pripraviť aj iným spôsobom.

- 4.15. Carrezov roztok I: 26,5 g hexakynožeľeznatanu draselného (4.5.) sa rozpustí vo vode a doplní sa do 250 ml.
- 4.16. Carrezov roztok II: 54,9 g octanu zinočnatého (4.3.) a 7,5 ml kyseliny octovej (4.4.) sa rozpustí vo vode a doplní sa do 250ml.
- 4.17. Merck Lichrosorb RP-18 alebo jeho ekvivalent, s priemernou veľkosťou častíc 5 µm.

5. PRÍSTROJE A POMÔCKY

- 5.1. Bežné laboratórne vybavenie.
- 5.2. Vybavenie na vysoko účinnú kvapalinovú chromatografiu s nastaviteľným UV detektorom a termostatovanou komorou nastavenou na 45 °C.
- 5.3. Kolóna z nehrdzavejúcej ocele: dĺžka: 250 mm; vnútorný priemer: 4,6 mm; náplň Lichrosorb RP-18 (4.17).
- 5.4. Ultrazvukový kúpeľ.

6. POSTUP

6.1. *Príprava vzorky*

- 6.1.1. Do 100 ml kadičky sa presne naváži približne 1 g vzorky a pridá sa 10 ml metanolu (4.1.).
- 6.1.2. Kadička sa na 20 minút umiestni do ultrazvukového kúpeľa (5.4), aby sa vytvorila suspenzia. Takto získaná suspenzia sa kvantitatívne prenesie do 100 ml odmernej banky s nie viac ako 75 ml eluentu (4.10.).
Jeden po druhom sa pridá 1 ml Carrezovho roztoku I (4.15.) a 1 ml Carrezovho roztoku II (4.16.) a po pridaní každého sa premieša. Doplní sa eluentom (4.10.) po značku, znova sa premieša a prefiltruje sa cez skladaný filter.
- 6.1.3. 3,0 ml filtrátu získaného v 6.1.2. a 5,0 ml roztoku vnútorného štandardu (4.13.) sa pipetou prenesie do 50 ml odmernej banky. Doplní sa eluentom (4.10.) po značku a premieša sa. Takto získaný roztok sa použije na uskutočnenie chromatografickej analýzy opísanej v 6.2.

6.2. **Chromatografia**

- 6.2.1. Prietoková rýchlosť mobilnej fázy (4.10.) sa upraví na 1,2 ml/min a teplota kolóny sa nastaví na 45 °C.
- 6.2.2. Detektor (5.2) sa nastaví na 274 nm.
- 6.2.3. Mikrostriekačkou sa do chromatografu najmenej dvakrát nastrekne 20 µl roztoku (6.1.3.) a meria sa plocha píkov.

6.3. **Kalibračná krivka**

- 6.3.1. Nastrekne sa 20 µl každého štandardného roztoku (4.14.) a meria sa plocha píkov.
- 6.3.2. Pre každú koncentráciu sa vypočíta pomer medzi plochou píkov (2,3-dihydroxypropyl)-4-aminobenzoátu a plochou píkov vnútorného štandardu. Na súradnice sa nanesie tento pomer oproti pomeru zodpovedajúcich hmotností.
- 6.3.3. Rovnakým spôsobom sa postupuje pre etyl-4-hydroxybenzoát.

7. **VÝPOČET**

- 7.1. Z kalibračnej krivky získanej v 6.3. sa odčítajú pomery hmotností (RP1, RP2) zodpovedajúce pomeru plôch píkov vypočítaných v 6.2.3., kde RP1 je hmotnosť (2,3-dihydroxypropyl)-4-aminobenzoátu delená hmotnosťou etyl-4-hydroxybenzoátu, RP2 je hmotnosť etyl-4-aminobenzoátu delená hmotnosťou etyl-4-hydroxybenzoátu.
- 7.2. Z týmto spôsobom získaných pomerov hmotností sa vypočíta obsah (2,3-dihydroxypropyl)-4-aminobenzoátu a etyl-4-aminobenzoátu v hmotnostných percentách (% hmot.) zo vzorcov

$$R_p \% \text{ (hmot.) (2,3-dihydroxypropyl)-4-aminobenzoátu} = RP1 \times \frac{q}{6p}$$

$$R_p \% \text{ (hmot.) etyl-4-aminobenzoátu} = RP2 \times \frac{q}{6p}$$

q je množstvo naváženého etyl-4-hydroxybenzoátu (vnútorného štandardu) v 4.12 v miligramoch,

p je množstvo vzorky naváženej v 6.1.1 v gramoch.

8. **OPAKOVATELNOSŤ²⁾**

- 8.1. Pri obsahu (2,3-dihydroxypropyl)-4-aminobenzoátu 5 % (hmot.) rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelne uskutočnených stanovení na tej istej vzorke nesmie presiahnuť v absolútnej hodnote 0,25 %.
- 8.2. Pri obsahu etyl-4-aminobenzoátu 1 % (hmot.) rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelne uskutočnených stanovení na tej istej vzorke nesmie presiahnuť v absolútnej hodnote 0,10 %.

9. **POZNÁMKY**

- 9.1. Pred uskutočnením analýzy sa preverí, či vzorka obsahuje látky, ktorých pík by sa mohol na chromatograme prekryvať s píkom vnútorného štandardu (etyl-4-hydroxybenzoátu).
- 9.2. Na zistenie neprítomnosti akejkoľvek látky rušiacej stanovenie sa stanovenie zopakuje pri zmene podielu metanolu v mobilnej fáze o pomerne 10 %.

25. STANOVENIE CHLÓRBUTANOLU (INN)

(Podľa smernice Komisie 85/490/EHS z 11. októbra 1985)

1. ROZSAH A OBLASŤ POUŽITIA

Táto metóda je vhodná na stanovenie chlórbutanolu (INN) do maximálneho obsahu 0,5 % (hmot.) v akomkoľvek kozmetickom výrobku, okrem aerosólov.

2. DEFINÍCIA

Obsah chlórbutanolu stanovený touto metódou sa vyjadří v hmotnostných percentách (% hmot.) výrobku.

3. PRINCÍP

Po primeranom spracovaní analyzovaného výrobku sa stanovenie robí plynovou chromatografiou s použitím 2,2,2-trichlóretanolu ako vnútorného štandardu.

4. ČINIDLÁ

Všetky činidlá musia byť analyticky čisté.

4.1. Chlórbutanol (1,1,1-trichlór-2-metylpropán-2-ol),

4.2. 2,2,2-trichlóretanol,

4.3. Absolútny etanol,

4.4. Štandardný roztok chlórbutanolu (4.1.): 0,025 g v 100 ml etanolu (4.3.) (m/v),

4.5. Štandardný roztok 2,2,2-trichlóretanolu: 4 mg v 100 ml etanolu (4.3.) (m/v).

5. PRÍSTROJE A POMÔCKY

5.1. Bežné laboratórne vybavenie.

5.2. Plynový chromatograf s detektorom elektrónového záchytu, Ni 63.

6. POSTUP

6.1. *Príprava vzorky*

Presne sa naváži medzi 0,1 a 0,3 g (p g) vzorky. Umiestni sa do 100 ml odmernej banky. Rozpustí sa v etanole (4.3.), pridá sa 1 ml roztoku vnútorného štandardu (4.5.) a doplní sa etanolom (4.3.) po značku.

6.2. *Podmienky pre plynovú chromatografiu*

6.2.1. Prevádzkové podmienky musia poskytnúť koeficient rozlíšenia $R \geq 1,5$

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

kde

R_1 a R_2 sú retenčné časy pík, v minútach,

W_1 a W_2 je šírka pík v polovičnej výške, v milimetroch,

d' je rýchlosť zapisovača, v milimetroch za minútu.

6.2.2. Napríklad, nasledovné prevádzkové podmienky poskytujú požadované rozlíšenie

Kolóna	I	II
Materiál	sklo	nehrdzavejúca oceľ
Dĺžka	1,80 m	3 m
Priemer	3 mm	3 mm
Stacionárna fáza	10 % Carbowax 20 M TPA na Gaschrom-e Q,	5 % OV 17 na Chromosorb-e WAW DMCS, 80-100 mesh

	80-100 mesh	
Ustaľovanie	2 až 3 dni pri 190 °C	
Teplota		
- dávkovací ventil	200 °C	150 °C
- kolóna	150 °C	100 °C
- detektor	200 °C	150 °C
Nosný plyn	dusík	argón/metán (95/5, obj, diely)
Prietoková rýchlosť	35 ml/min.	35 ml/min.

6.3. Kalibračná krivka

Do piatich 100 ml odmerných baniek sa pridá po 1 ml štandardného roztoku (4.5.) a jednotlivu 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 a 0,6 ml roztoku 4.4., doplnia sa etanolom (4.3.) po značku a premiešajú sa. Do chromatografu sa nastrekne 1 µl každého z týchto roztokov za prevádzkových podmienok uvedených v 6.2.2. a nanesením na os x pomer hmotnosti chlórbutanolu a hmotnosti 2,2,2-trichlóretanolu a na os y pomer plochy príslušných píkov sa zostrojí kalibračná krivka.

6.4. Nastrekne sa 1 µl roztoku získaného v 6.1. a postupuje sa za podmienok opísaných v 6.2.2.

7. VÝPOČET

7.1. Z kalibračnej krivky (6.3.) sa vypočíta množstvo „a“ vyjadrené v µg chlórbutanolu v roztoku 6.1.

7.2. Obsah chlórbutanolu (INN) vo vzorke sa vypočíta podľa nasledovného vzorca

$$\% \text{ chlórbutanolu (hmot.)} = \frac{a \times 10^2}{p \times 10^6} = \frac{a}{p \times 10^4}$$

8. OPAKOVATELNOSŤ ²⁾

Pri obsahu chlórbutanolu 0,5 % (hmot.) rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelne uskutočnených stanovení na tej istej vzorke nesmie presiahnuť 0,01 %.

Poznámka

Ak sa výsledok rovná alebo presahuje maximálny povolený obsah, je potrebné overiť neprítomnosť látok rušiacich stanovenie.

26. DÔKAZ A STANOVENIE CHINÍNU

(Podľa smernice Komisie 85/490/EHS z 11. októbra 1985)

A. DÔKAZ

1. ROZSAH A OBLASŤ POUŽITIA

Táto metóda je určená na detekciu prítomnosti chinínu v šampónoch a vlasových lotionoch.

2. PRINCÍP

Dôkaz sa robí tenkovrstvovou chromatografiou na silikagéli. Detekciou chinínu je modrá fluorescencia chinínu v kyslom prostredí pri 360 nm.

Pre ďalšie potvrdenie sa môže fluorescencia odstrániť parami brómu a pary amoniaku spôsobia objavenie sa žltkastej fluorescencie.

3. ČINIDLÁ

Všetky činidlá musia byť analyticky čisté.

3.1. Silikagélové platne bez fluorescenčného indikátora s hrúbkou 0,25 mm, 200 mm × 200 mm,

3.2. Vytváracie rozpúšťadlo: toluén / dietyléter / dichlórmetán / dietylamín: 20/20/20/8 (obj. diely),

3.3. Metanol,

3.4. Kyselina sírová (96 %; $d \frac{20}{40} = 1,84$),

3.5. Dietyléter,

3.6. Vytváracie činidlo: k 95 ml dietyléteri (3.5) v chladiacom kúpeli sa opatrne pridá 5 ml kyseliny sírovej (3.4),

3.7. Bróm,

3.8. Roztok hydroxidu amónneho (28 %; $d \frac{20}{40} = 0,90$),

3.9. Chinín, bezvodý,

3.10. Štandardný roztok: do odmernej banky sa presne naváži približne 100,0 mg bezvodého chinínu (3.9) a rozpustí sa v 100 ml metanolu (3.3).

4. PRÍSTROJE A POMÔCKY

4.1. Bežné vybavenie pre tenkovrstvovú chromatografiu.

4.2. Ultrazvukový kúpeľ,

4.3. Milipore filter FH 0,5 μm. alebo jeho ekvivalent, s primeraným filtračným vybavením.

5. POSTUP

5.1. *Príprava vzorky*

Do 100 ml odmernej banky sa presne naváži množstvo vzorky, ktoré by malo obsahovať približne 100 mg chinínu, rozpustí sa a doplní metanolom (3.3.) po značku.

Banka sa zazátkuje a nechá sa jednu hodinu pri laboratórnej teplote v ultrazvukovom kúpeli (4.2.). Prefiltruje sa (4.3.) a filtrát sa použije na chromatografiu.

5.2. **Tenkvrstvová chromatografia**

Na silikagélovú platňu (3.1.) sa naniesie 1,0 µl štandardného roztoku (3.10.) a 1,0 µl roztoku vzorky (5.1.). Chromatogram sa s použitím rozpúšťadla 3.2. nechá vyvíjať vo vyvíjacej komore dopredu nasýtenej rozpúšťadlom (3.2.) do vzdialenosti 150 mm.

5.3. **Vyvolanie**

5.3.1. Platňa sa vysuší pri laboratórnej teplote.

5.3.2. Postrieka sa činidlom 3.6.

5.3.3. Platňa sa nechá vysušiť jednu hodinu pri laboratórnej teplote.

5.3.4. Pozoruje sa pod svetlom UV lampy nastavenej na vlnovú dĺžku 360 nm. Chinín sa prejaví ako intenzívne modro fluoreskujúca škvrna.

Ako príklad nižšie uvedená tabuľka udáva R_F hodnoty hlavných alkaloidov príbuzných chinínu pri vyvíjaní rozpúšťadlom 3.2.

Alkaloid	R_F
Chinín	0,20
Chinidín	0,29
Cinchonín	0,33
Cinchonidín	0,27
Hydrochinidín	0,17

5.3.5. Pre ďalšie potvrdenie prítomnosti chinínu sa platňa vystaví približne na jednu hodinu parám brómu (3.7.). Fluorescencia zmizne. Ak sa tá istá platňa vystaví parám amoniaku (3.8.), škvrny sa znova objavia, keď sa platňa znova skúma pod UV svetlom pri 360 nm, pozoruje sa žltkastá fluorescencia.

Medza detekovateľnosti: 0,1 µg chinínu.

B. STANOVENIE

1. ROZSAH A OBLASŤ POUŽITIA

Táto metóda opisuje stanovenie chinínu. Môže byť použitá na stanovenie maximálneho povoleného obsahu 0,5 % (hmot.) v šampónoch a 0,2 % vo vlasových lotionoch.

2. DEFINÍCIA

Obsah chinínu stanovený touto metódou sa vyjadří v hmotnostných percentách (% hmot.) výrobku.

3. PRINCÍP

Po primeranom spracovaní analyzovaného výrobku sa stanovenie robí vysoko účinnou kvapalinovou chromatografiou (HPLC).

4. ČINIDLÁ

Všetky činidlá musia byť analyticky čisté a vhodné na HPLC.

4.1. Acetonitril,

4.2. Dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4),

4.3. Kyselina trihydrogenfosforečná (85 %; $d \frac{20}{40} = 1,7$),

- 4.4. Tetrametylamónium-bromid,
 4.5. Chinín, bezvodý,
 4.6. Metanol,
 4.7. Roztok kyseliny trihydrogenfosforečnej (0,1 M): naváži sa 11,53 g kyseliny trihydrogenfosforečnej (4.3) a rozpustí sa v odmernej banke v 1 000 ml vody,
 4.8. Roztok dihydrogenfosforečnanu draselného (0,1 M): naváži sa 13,6 g dihydrogenfosforečnanu draselného (4.2.) a rozpustí sa v odmernej banke v 1 000 ml vody,
 4.9. Roztok tetrametylamónium-bromidu: 15,40 g tetrametylamónium-bromidu (4.4.) sa rozpustí v odmernej banke v 1 000 ml vody,
 4.10. Eluent: Kyselina trihydrogenfosforečná (4.7.) / dihydrogenfosforečnan draselný (4.8) / tetrametylamónium-bromid (4.9.) / voda /acetonitril (4.1): 10/50/100/340/90 (obj. diely),
 Zloženie mobilnej fázy sa môže upraviť, aby sa dosiahol koeficient rozlíšenia $R \geq 1,5$

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

kde

R_1 a R_2 sú retenčné časy pík, v minútach,

W_1 a W_2 je šírka pík v polovičnej výške, v milimetroch,

d' je rýchlosť zapisovača, v milimetroch za minútu.

- 4.11. Silikagél upravený oktadecylsilánom, 10 μm ,
 4.12. Štandardné roztoky: do sady 100 ml odmerných baniek sa jednotlivo presne naváži približne 5,0, 10,0, 15,0 a 20,0 mg bezvodého chinínu (4.5.). Doplní sa metanolom (4.6.) po značku a obsah baniek sa mieša, kým sa chinín nerozpustí. Každá vzorka sa prefiltruje cez 0,5 μm filter.

5. PRÍSTROJE A POMÔCKY

- 5.1. Bežné laboratórne vybavenie.
 5.2. Ultrazvukový kúpeľ,
 5.3. Zariadenie na vysoko účinnú kvapalinovú chromatografiu s detektorom s nastaviteľnou vlnovou dĺžkou,
 5.4. Kolóna: dĺžka: 250 mm; vnútorný priemer: 4,6 mm; náplň: silikagél (4.11.),
 5.5. Milipore filter FH 0,5 μm . alebo jeho ekvivalent s primeraným filtračným zariadením.

6. POSTUP

6.1. *Príprava vzorky*

Do 100 ml odmernej banky sa presne naváži množstvo výrobku dostatočné na to, aby obsahovalo 10,0 mg bezvodého chinínu, pridá sa 20 ml metanolu (4.6.) a umiestni sa na 20 minút do ultrazvukového kúpeľa (5.2.). Doplní sa metanolom (4.6.) po značku. Roztok sa zamieša a alikvotná časť sa prefiltruje (5.5.).

6.2. *Chromatografia*

Prietoková rýchlosť: 1,0 ml/min.

Vlnová dĺžka detektora (5.3.): 332 nm.

Nastrekovaný objem: 10 μl prefiltrovaného roztoku (6.1.).

Meria sa: plocha píku.

6.3. **Kalibračná krivka**

Najmenej trikrát sa nastrekne po 10 µl každého referenčného roztoku (4.12.), meria sa plocha pík a vypočíta sa priemerná plocha pre každú koncentráciu. Zostrojí sa kalibračná krivka a overí sa, či je lineárna.

7. VÝPOČET

7.1. Z kalibračnej krivky (6.3.) sa stanoví množstvo bezvodého chinínu v µg prítomného v nastreknutom objeme (6.2.).

7.2. Obsah bezvodého chinínu vo vzorke ako hmotnostné percento (% hmotn.) sa získa z nasledovného vzorca

$$\% \text{ (hmot.) bezvodého chinínu} = \frac{B}{A},$$

kde

B je množstvo bezvodého chinínu v mikrogramoch, stanoveného v 10 mikrolitroch prefiltrovaného roztoku (6.1.),

A je hmotnosť vzorky v gramoch (6.1.).

8. OPAKOVATELNOSŤ ²⁾

Pri obsahu bezvodého chinínu 0,5 % (hmot.) rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelne uskutočnených stanovení na tej istej vzorke nesmie presiahnuť 0,02 %.

Pri obsahu bezvodého chinínu 0,2 % (hmot.) rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelne uskutočnených stanovení na tej istej vzorke nesmie presiahnuť 0,01 %.

27. DÔKAZ A STANOVENIE ANORGANICKÝCH SIRIČITANOV A HYDROGENSIRIČITANOV

(Podľa smernice Komisie 85/490/EHS z 11. októbra 1985)

ROZSAH A OBLASŤ POUŽITIA

Táto metóda opisuje dôkaz a stanovenie anorganických siričitanov a hydrogensiričitanov v kozmetických výrobkoch. Je použiteľná iba na výrobkoch, ktoré majú vodnú alebo alkoholickú fázu a pre obsah oxidu siričitého do 0,2 %.

A. DÔKAZ

1. PRINCÍP

Vzorka sa zahrieva s kyselinou chlorovodíkovou a uvoľnený oxid siričitý sa identifikuje buď podľa jeho zápachu alebo jeho účinku na indikátorový papierik.

2. ČINIDLÁ

Všetky činidlá musia byť analyticky čisté.

2.1. Kyselina chlorovodíková (4 M),

2.2. Škrobový papierik s jodičnanom draselným alebo iná vhodná alternatíva.

3. PRÍSTROJE A POMÔCKY

3.1. Bežné laboratórne vybavenie.

3.2. Banka (25 ml) vybavená krátkym spätným chladičom.

4. POSTUP

4.1. Do banky (3.2.) sa umiestni okolo 2,5 g vzorky a 10 ml kyseliny chlorovodíkovej (2.1.).

4.2. Premieša sa a zahrieva sa do varu.

4.3. Uvoľňovanie oxidu siričitého sa skúma buď podľa zápachu alebo indikátorovým papierikom (2.2.).

B. STANOVENIE

1. DEFINÍCIA

Obsah siričitanov alebo hydrogensiričitanov vo vzorke stanovený touto metódou sa vyjadrí v hmotnostných percentách oxidu siričitého.

2. PRINCÍP

Po okyslení vzorky sa uvoľnený oxid siričitý destiluje do roztoku peroxidu vodíka. Vzniknutá kyselina sírová sa titruje štandardným roztokom hydroxidu sodného.

3. ČINIDLÁ

Všetky činidlá musia byť analyticky čisté.

3.1. 0,2 % (m/v) peroxid vodíka; pripravuje sa denne,

3.2. Kyselina trihydrogenfosforečná ($d_{25}^{40} = 1,75$),

3.3. Metanol,

3.4. Štandardný roztok hydroxidu sodného (0,01 M),

3.5. Dusík,

- 3.6. Indikátor: zmes metylovej červenej (0,03 % m/v v etanole) a metylénovej modrej (0,05 % m/v v etanole), 1 : 1 (obj. diely) roztok sa prefiltruje,

4. PRÍSTROJE A POMÔCKY

- 4.1. Bežné laboratórne vybavenie.
4.2. Destilačná aparátúra (pozri obrázok).

5. POSTUP

- 5.1. Do destilačnej banky A (pozri obrázok) sa presne naváži približne 2,5 g vzorky.
5.2. Pridá sa 60 ml vody a 50 ml metanolu (3.3.) a premieša sa.
5.3. Do destilačnej predlohy D (pozri obrázok) sa umiestni 10 ml peroxidu vodíka (3.1.), 60 ml vody a pár kvapiek indikátora (3.6.). Pridá sa pár kvapiek roztoku hydroxidu sodného (3.4.), kým sa indikátor sfarbí na zeleno.
5.4. 5.3 sa zopakuje pre premývačku E (pozri obrázok).
5.5. Aparátúra sa spojí a prúd dusíka (3.5.) sa nastaví na približne 60 bubliniek za minútu.
5.6. Z lievika sa do destilačnej banky A pridá 15 ml kyseliny trihydrogenfosforečnej (3.2.).
5.7. Rýchlo sa zahreje do varu a potom sa mierne varí celkovo 30 minút.
5.8. Destilačná predloha D sa odpojí. Trubica sa prepláchne a potom sa titruje roztokom hydroxidu sodného (3.4.), kým sa indikátor (3.6.) sfarbí na zeleno.

6. VÝPOČET

Hmotnostný obsah siričitanov a hydrogensiričitanov vo vzorke sa vypočíta pomocou vzťahu

$$\% \text{ hmot. oxidu siričitého} = \frac{3,2 MV}{m},$$

kde

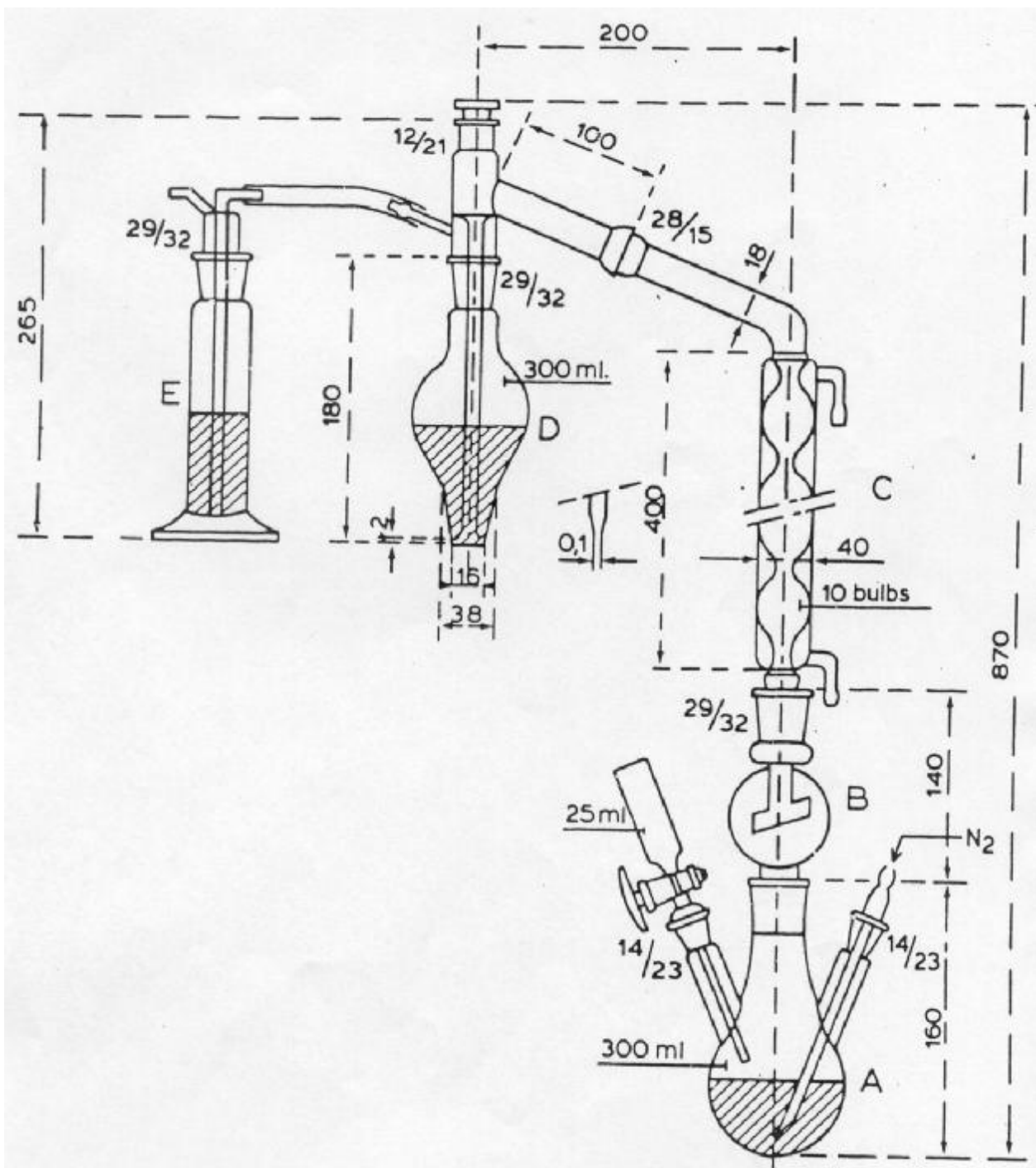
M je molárna koncentrácia roztoku hydroxidu sodného (3.4.),

V je objem roztoku hydroxidu sodného (3.4.) spotrebovaného na titráciu (5.8.) v mililitroch,

m je hmotnosť vzorky (5.1.) v gramoch.

7. OPAKOVATELNOSŤ²⁾

Pri obsahu oxidu siričitého 0,2 % hmot.rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelne uskutočnených stanovení na tej istej vzorke nesmie byť väčší ako 0,006 %.



Destilačná aparátúra na destiláciu oxidu siričitého podľa Tannera
 Všetky rozmery sú v mm

28. DÔKAZ A STANOVENIE CHLOREČNANOV ALKALICKÝCH KOVOV

(Podľa smernice Komisie 85/490/EHS z 11. októbra 1985)

ROZSAH A OBLASŤ POUŽITIA

Táto metóda opisuje dôkaz a stanovenie chlorečnanov v zubných pastách a ostatných kozmetických výrobkoch.

A. DÔKAZ

1. PRINCÍP

Chlorečnany sa oddelia od bromičnanov a jodičnanov tenkovrstvovou chromatografiou a identifikujú sa na základe oxidácie jodidu za vzniku jódu.

2. ČINIDLÁ

Všetky činidlá musia byť analyticky čisté.

- 2.1. Referenčné roztoky: čerstvo pripravené vodné roztoky chlorečnanu, bromičnanu a jodičnanu draselného (0,2 % m/v),
- 2.2. Vyvíjacie rozpúšťadlo: roztok amoniaku (28 % m/v)/ acetón/butanol (60/130/30, obj. diely),
- 2.3. Jodid draselný, vodný roztok (5 % m/v),
- 2.4. Roztok škrobu (1 až 5 % m/v),
- 2.5. Kyselina chlorovodíková (1 M),
- 2.6. Komerčné celulózové tenkovrstvové platne (0,25 mm).

3. PRÍSTROJE A POMÔCKY

Bežné vybavenie na tenkovrstvovú chromatografiu.

4. POSTUP

- 4.1. Asi 1 g vzorky sa extrahuje vodou, prefiltruje a zriedi sa asi na 25 ml.
- 4.2. 2 μ l roztoku (4.1.) spolu s 2 μ l podielmi každého z troch referenčných roztokov (2.1.) sa nanesú na platňu (2.6.).
- 4.3. Platňa sa umiestni do vyvíjacej komory a vyvíja sa s rozpúšťadlom 2.2. vzostupnou chromatografiou asi do troch štvrtín dĺžky platne (2.6.).
- 4.4. Vyberie sa z vyvíjacej komory a rozpúšťadlo sa nechá odpariť. (*Poznámka* : Môže to trvať až do dvoch hodín).
- 4.5. Platňa sa postrieka roztokom jodidu draselného (2.3.) a nechá sa vysušiť asi päť minút.
- 4.6. Platňa sa postrieka roztokom škrobu (2.4.) a nechá sa vysušiť asi päť minút.
- 4.7. Platňa sa postrieka kyselinou chlorovodíkovou (2.5.).

5. VYHODNOTENIE

Ak sú prítomné chlorečnany, asi po pol hodine sa objaví modrá škvrna (možno hnedá škvrna) s R_F hodnotou približne 0,7 až 0,8.

Soli oxokyselín halogénov v oxidačnom stupni V	R_F
Jodičnany	0 až 0,2
Bromičnany	0,5 až 0,6
Chlorečnany	0,7 až 0,8

Treba poznamenať, že bromičnany a jodičnany dávajú okamžitú reakciu. Treba si dať pozor, aby sa škvrny bromičnanov nezamenili so škvrnami chlorečnanov.

B. STANOVENIE

1. DEFINÍCIA

Obsah chlorečnanov vo vzorke stanovený touto metódou sa vyjadrí v hmotnostných percentách chlorečnanu.

2. PRINCÍP

Chlorečnany sa redukujú práškovým zinkom v kyslom prostredí. Vzniknuté chloridy sa stanovia potenciometrickou titráciou roztokom dusičnanu strieborného. Podobné stanovenie pred redukciou umožňuje stanoviť prípadne prítomné halogenidy.

3. ČINIDLÁ

Všetky činidlá musia byť analyticky čisté.

3.1. Kyselina octová, 80 % (hmot.),

3.2. Práškový zinok,

3.3. Štandardný roztok dusičnanu strieborného (0,1 M).

4. PRÍSTROJE A POMÔCKY

4.1. Bežné laboratórne vybavenie.

4.2. Potenciometer vybavený striebornou indikačnou elektródou.

5. POSTUP

5.1. *Príprava vzorky*

Do centrifugačnej kvety sa presne navážia približne 2 g (množstvo „m“). Pridá sa asi 15 ml kyseliny octovej (3.1.) a opatrne sa premieša. Počká sa 30 minút a odstredí sa 15 minút na centrifúge pri 2 000 ot./min. Supernatant sa preniesie do 50 ml odmernej banky. Odstredovanie zvyšku sa zopakuje dvakrát 15 ml kyseliny octovej (3.1.). Roztok obsahujúci chlorečnan sa zbiera do tej istej odmernej banky. Doplní sa kyselinou octovou (3.1.) po značku.

5.2. *Redukcia chlorečnanov*

Odoberie sa 20 ml roztoku 5.1. a pridá sa 0,6 g práškového zinku (3.2.). Privedie sa do varu v banke vybavenej kondenzačnou rúrkou. Po 30 minútach varu sa ochladí a prefiltruje. Banka sa opláchne vodou. Prefiltruje sa a filtráty sa spoja.

5.3. *Stanovenie chloridov*

20 ml roztoku 5.2 sa titruje roztokom dusičnanu strieborného (3.3.) pri použití potenciometra (4.2). Rovnakým spôsobom sa roztokom dusičnanu strieborného (3.3.) titruje 20 ml roztoku 5.1.

Poznámka Ak výrobok obsahuje deriváty brómu alebo jódu, ktoré môžu po redukcii uvoľňovať bromidy alebo jodidy, titračná krivka bude mať niekoľko inflexných bodov. V takom prípade objem titračného roztoku (3.3.) zodpovedajúci chloridom je rozdiel medzi posledným a predposledným inflexným bodom.

6. VÝPOČET

Obsah chlorečnanov vo vzorke (% hmotn.) sa vypočíta zo vzorca

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

kde

V je objem roztoku dusičnanu strieborného (3.3.) spotrebovaného na titráciu roztoku 5.2, v mililitroch,

V' je objem roztoku dusičnanu strieborného (3.3.) spotrebovaného na titráciu 20 ml roztoku 5.1, v mililitroch,

M je molarita štandardného roztoku dusičnanu strieborného (3.3.),

m je hmotnosť vzorky, v gramoch.

7. OPAKOVATELNOSŤ ²⁾

Pri obsahu chlorečnanov 3 až 5 % hmot. rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelne uskutočnených stanovení na tej istej vzorke nesmie presiahnuť 0,07 % hmot.

29. DÔKAZ A STANOVENIE JODIČNANU SODNÉHO

(Podľa smernice Komisie 85/490/EHS z 11. októbra 1985)

ROZSAH A OBLASŤ POUŽITIA

Táto metóda opisuje postup na dôkaz a stanovenie jodičnanu sodného v kozmetických výrobkoch, ktoré sa oplachujú.

A. DÔKAZ

1. PRINCÍP

Jodičnany sa oddelia od bromičnanov a chlorečnanov tenkovrstvovou chromatografiou a identifikujú sa na základe oxidácie jodidu za vzniku jódu.

2. ČINIDLÁ

Všetky činidlá musia byť analyticky čisté.

- 2.1. Referenčné roztoky. Čerstvo pripravené vodné roztoky chlorečnanu, bromičnanu a jodičnanu draselného (0,01 % m/v),
- 2.2. Vyvíjacie rozpúšťadlo, Roztok amoniaku (28 % m/v) / acetón / butanol (60/130/30, obj. diely).
- 2.3. Vodný roztok jodidu draselného (5 % m/v),
- 2.4. Roztok škrobu (1 až 5 % m/v),
- 2.5. Kyselina chlorovodíková (1 M).

3. PRÍSTROJE A POMÔCKY

- 3.1. Komerčné celulóзовé tenkovrstvové platne (0,25 mm).
- 3.2. Bežné vybavenie na tenkovrstvovú chromatografiu.

4. POSTUP

- 4.1. Asi 1 g vzorky sa extrahuje vodou, prefiltruje a zriedi sa asi na 10 ml.
- 4.2. 2 µl tohto roztoku sa spolu s 2 µl podielmi každého z troch referenčných roztokov (2.1.) nanesú na štartovaciu čiaru platne (3.1.).
- 4.3. Platňa sa umiestni do vyvíjacej komory a vyvíja sa rozpúšťadlom (2.2.) vzostupnou chromatografiou asi do troch štvrtín dĺžky platne.
- 4.4. Platňa sa vyberie z vyvíjacej komory a rozpúšťadlo sa nechá odpariť pri laboratórnej teplote. (*Poznámka* Môže to trvať až do dvoch hodín).
- 4.5. Platňa sa postrieka roztokom jodidu draselného (2.3.) a nechá sa vysušiť asi päť minút.
- 4.6. Postrieka sa roztokom škrobu (2.4.) a nechá sa vysušiť asi päť minút.
- 4.7. Nakoniec sa postrieka kyselinou chlorovodíkovou (2.5.).

5. VYHODNOTENIE

Ak sú prítomné jodičnany, ihneď sa objaví modrá škvrna (sfarbenie môže byť hnedé alebo sa zmeniť stáť na hnedé) s R_F hodnotou približne 0 až 0,2.

Treba poznamenať, že bromičnany dávajú okamžitú reakciu pri R_F hodnote približne 0,5 až 0,6 a chlorečnany asi po 30 minútach pri R_F hodnote približne 0,7 až 0,8.

B. STANOVENIE

1. DEFINÍCIA

Obsah jodičnanu sodného vo vzorke stanovený touto metódou sa vyjadrí v hmotnostných percentách jodičnanu sodného.

2. PRINCÍP

Jodičnan sodný sa rozpustí vo vode a stanoví sa prostredníctvom vysoko účinnej kvapalinovej chromatografie s použitím do série zaradenej reverzno-fázovej C18 kolóny a anexovej kolóny.

3. ČINIDLÁ

Všetky činidlá musia byť analyticky čisté a osobitné vhodné pre vysoko účinnú kvapalinovú chromatografiu (HPLC).

3.1. Kyselina chlorovodíková (4 M),

3.2. Siričitán sodný aq., 5 % (m/v),

3.3. Zásobný roztok jodičnanu sodného,

Pripraví sa zásobný roztok obsahujúci 50 mg jodičnanu sodného na 100 ml vody.

3.4. Dihydrogenfosforečnan draselný,

3.5. Dihydrát hydrogenfosforečnanu sodného,

3.6. Mobilná fáza pre HPLC: 3,88 g dihydrogenfosforečnanu draselného (3.4.) a 1,19 g dihydrátu hydrogenfosforečnanu sodného (3.5.) sa rozpustí v 1 litri vody,

3.7. Univerzálny indikátorový papierik, pH 1-11.

4. PRÍSTROJE A POMÔCKY

4.1. Bežné laboratórne vybavenie.

4.2. Kruhový filtračný papier s priemerom 110 mm, Schleicher and Schüll č. 575, alebo jeho ekvivalent.

4.3. Vysoko účinný kvapalinový chromatograf s detektorom s nastaviteľnou vlnovou dĺžkou.

4.4. Kolóny: dĺžka: 120 mm; vnútorný priemer: 4,6 mm; počet: dve zapojené do série; prvá kolóna – Nucleosil® 5 C18 alebo jej ekvivalent; druhá kolóna – Vydac™ – 301-SB alebo jej ekvivalent.

5. POSTUP

5.1. *Príprava vzorky*

5.1.1. Kvapalné vzorky (šampóny)

Do 10 ml zazátkovateľnej delenej skúmavky alebo odmernej banky sa presne naváži približne 1,0 g skúšobnej vzorky. Doplní sa vodou po značku a premieša sa.

Ak je to potrebné, roztok sa prefiltruje. Jodičnan sa v roztoku stanoví prostredníctvom HPLC, ako je opísané v časti (5.2.).

5.1.2. Tuhé vzorky (mydlá)

Vzorka sa jemne rozdrví na čiastočky a do 100 ml zazátkovateľného odmerného valca sa presne naváži približne 1,0 g skúšobnej vzorky. Doplní sa vodou do 50 ml a jednu minútu sa intenzívne pretrepáva. Odstredí sa na centrifúge a prefiltruje sa cez filtračný papier (4.1.) alebo sa zmes nechá stáť aspoň cez jednu noc.

Rôsolovitý roztok sa intenzívne pretrepe a prefiltruje sa cez filtračný papier (4.1.).

Jodičnan sa vo filtráte stanoví prostredníctvom HPLC, ako je opísané v časti (5.2.).

5.2. *Chromatografia*

Prietoková rýchlosť: 1 ml/min.

Vlnová dĺžka detektora (4.2): 210 nm.

Nastrekovaný objem: 10 µl.

Meria sa: plocha píku.

5.3. Kalibrácia

Do 50 ml odmerných baniek sa pipetou preniesie jednotlivo 1,0, 2,0, 5,0, 10,0 a 20,0 ml zásobného roztoku jodičnanu sodného (3.3.). Doplní sa po značku a premieša sa.

Takto získané roztoky obsahujú 0,01, 0,02, 0,05, 0,10 a 0,20 mg jodičnanu sodného v ml.

10 µl podiel každého referenčného roztoku jodičnanu sa nastrekne do kvapalinového chromatografu (4.2.) a získa sa chromatogram. Určí sa plocha píkov jodičnanu a zostrojí sa krivka vyjadrujúca závislosť plochy píkov od koncentrácie jodičnanu sodného.

6. VÝPOČET

Obsah jodičnanu sodného vo vzorke (% hmot.) sa vypočíta použitím vzorca

$$\% \text{ (hmot.) jodičnanu sodného} = \frac{V c}{10 m},$$

kde

m je hmotnosť skúšobnej vzorky (5.1.), v gramoch,

V je celkový objem roztoku vzorky, získanej podľa postupu v 5.1. v mililitroch,

c je hmotnostná koncentrácia, získaná z kalibračnej krivky (5.3.), v miligramoch jodičnanu sodného na mililiter.

7. OPAKOVATELNOSŤ ²⁾

Pri obsahu jodičnanu sodného 0,1 % (hmot.) rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelne uskutočnených stanovení na tej istej vzorke nesmie presiahnuť 0,002 %.

8. POTVRDENIE

8.1. *Princíp*

V okyslenom roztoku kozmetického výrobku sa jodičnan (IO_3^-) redukuje siričitanom na jodid (I) a výsledný roztok sa vyšetrí prostredníctvom HPLC. Ak pík s retenčným časom zodpovedajúcim jodičnanu vymizne po pôsobení siričitanu, pôvodný pík môže byť s najväčšou pravdepodobnosťou prisúdený jodičnanu.

8.2. *Postup*

Do kuželovitej banky sa pipetou preniesie 5 ml podielu vzorky získaného, ako je opísané v časti 5.1.

Kyselinou chlorovodíkovou (3.1.) sa pH roztoku s použitím univerzálneho indikátorového papierika (3.7.) upraví na hodnotu 3 alebo nižšiu.

Pridajú sa tri kvapky roztoku siričitanu sodného (3.2.) a premieša sa.

Do kvapalinového chromatografu (4.2.) sa nastrekne 10 µl podielu roztoku.

Tento chromatogram sa porovná s chromatogramom získaným pre tú istú vzorku, ako je opísané v odseku 5.

30. DÔKAZ A STANOVENIE DUSIČNANU STRIEBORNÉHO

(Podľa smernice Komisie 93/73/EHS z 9. septembra 1993)

A. DÔKAZ

1. ROZSAH A OBLASŤ POUŽITIA

Táto metóda opisuje dôkaz dusičnanu strieborného ako striebra v kozmetických výrobkoch na báze vody.

2. PRINCÍP

Strieborné ióny sa dokazujú pomocou ich charakteristickej bielej zrazeniny, ktorú vytvárajú s chloridovými iónmi.

3. ČINIDLÁ

Všetky činidlá musia byť analyticky čisté.

3.1. 2 M roztok kyseliny chlorovodíkovej

3.2. Roztok amoniaku: koncentrovaný roztok hydroxidu amónneho ($d_{20} = 0,88$ g/ml) sa zriedi rovnakým množstvom vody a premieša sa.

3.3. 2 M roztok kyseliny dusičnej,

4. PRÍSTROJE A POMÔCKY

Bežné laboratórne vybavenie

4.2. Centrifúga

5. POSTUP

5.1. K približne 1 g vzorky v centrifugačnej kyvete sa pridáva po kvapkách 2 M roztok kyseliny chlorovodíkovej (3.1.) do úplného vyzrážania; premieša sa a odstredí.

5.2. Supernatantová kvapalina sa zleje a zrazenina sa jedenkrát premyje piatimi kvapkami studenej vody. Voda po premytí sa vyleje.

5.3. Do centrifugačnej kyvety sa pridá množstvo vody rovnaké, ako je množstvo zrazeniny. Za stáleho miešania sa zahreje do varu.

5.4. Za tepla sa odstredí; supernatantová kvapalina sa zleje.

5.5. Ku zrazenine sa pridá niekoľko kvapiek roztoku amoniaku (3.2.); premieša sa a odstredí.

5.6. K jednej kvapke supernatantovej kvapaliny na sklenom sklíčku sa pridá niekoľko kvapiek 2 M roztoku kyseliny dusičnej (3.3.).

5.7. Biela zrazenina je dôkazom prítomnosti strieborných iónov.

B. STANOVENIE

1. ROZSAH A OBLASŤ POUŽITIA

Táto metóda je vhodná na stanovenie dusičnanu strieborného ako striebra v kozmetických výrobkoch určených na farbenie mihalníc alebo obočia.

2. PRINCÍP

Striebro vo výrobku sa stanoví pomocou atómovej absorpčnej spektrometrie.

3. ČINIDLÁ

Všetky činidlá musia byť analyticky čisté.

- 3.1. 0,02 M roztok kyseliny dusičnej
- 3.2. Štandardné roztoky striebra
- 3.2.1. Zásobný štandardný roztok striebra, 1 000 µg/ml v 0,5 M roztoku kyseliny dusičnej („SpectrosoL“ alebo ekvivalent)
- 3.2.2. Štandardný roztok striebra, 100 µg/ml: do 100 ml odmernej banky sa pipetou preniesie 10 ml štandardného zásobného roztoku striebra (3.2.1.). Doplní sa 0,02 M roztokom kyseliny dusičnej (3.1.) po značku a premieša sa. Tento štandardný roztok má byť čerstvo pripravený a skladovaný vo fľaši z tmavého skla.

4. PRÍSTROJE A POMÔCKY

- 4.1. Bežné laboratórne vybavenie
- 4.2. Atómový absorpčný spektrofotometer vybavený striebornou výbojkou s dutou katódou

5. POSTUP

5.1. *Príprava vzorky*

Presne sa naváži približne 0,1 g („m“ v gramoch) homogénnej vzorky výrobku. Kvantitatívne sa preniesie do jednolitrovej odmernej banky a doplní sa 0,02 M roztokom kyseliny dusičnej (3.1.) po značku a premieša sa.

5.2. *Podmienky pre atómovú absorpčnú spektrometriu*

Plameň: vzduch–acetylén
 Vlnová dĺžka: 338,3 nm
 Korekcia pozadia: áno
 Podmienky pre palivo: ochudobnené; pre maximálnu absorbanciu je potrebné optimalizovať výšku horáka a podmienky spaľovania.

5.3. *Kalibrácia*

- 5.3.1. Do série 100 ml odmerných baniek sa pipetou preniesie 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 a 5,0 ml štandardného roztoku striebra (3.2.2.). Objem v každej banke sa doplní 0,02 M roztokom kyseliny dusičnej (3.1.) po značku a premieša sa. Tieto roztoky v uvedenom poradí obsahujú 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 a 5,0 µg striebra na mililiter.
- 5.3.2. Zmeria sa absorbanca 0,02 M roztoku kyseliny dusičnej (3.1.) a získaná hodnota sa použije pre kalibračnú krivku ako zodpovedajúca nulovej koncentrácii striebra. Zmeria sa absorbanca každého kalibračného štandardného roztoku striebra (5.3.1.). Zostrojí sa kalibračná krivka závislosti absorbancie od koncentrácie striebra.

5.4. *S t a n o v e n i e*

Zmeria sa absorbanca roztoku vzorky (5.1.). Z kalibračnej krivky sa odčíta koncentrácia striebra zodpovedajúca hodnote absorbancie nameranej pre roztok vzorky.

6. VÝPOČET

Obsah dusičnanu strieborného vo vzorke v hmotnostných percentách sa vypočíta s použitím vzorca

$$\% \text{ dusičnanu strieborného} = \frac{1,5748 \times c}{10 \times m},$$

kde

m je hmotnosť vzorky odobratej na analýzu (5.1), v gramoch a

c je koncentrácia striebra v roztoku vzorky (5.1) odčítaná z kalibračnej krivky v mikrogramoch na mililiter.

7. OPAKOVATELNOSŤ ²⁾

Pre obsah dusičnanu strieborného 4 % (hmot.) by rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelne uskutočnených stanovení na tej istej vzorke nemal presiahnuť 0,05 % (hmot.).

31. DÔKAZ A STANOVENIE SULFIDU SELENIČITÉHO V ŠAMPÓNOCH PROTI LUPINÁM

(Podľa smernice Komisie 93/73/EHS z 9. septembra 1993)

A. DÔKAZ

1. ROZSAH A OBLASŤ POUŽITIA

Táto metóda opisuje dôkaz sulfidu seleničitého ako selénu v šampónoch proti lupinám.

2. PRINCÍP

Selén sa dokazuje na základe charakteristického žltého až oranžového sfarbenia vznikajúceho pri jeho reakcii s močovinou a jodidom draselným.

3. ČINIDLÁ

Všetky činidlá musia byť analyticky čisté.

3.1. Kyselina dusičná, koncentrovaná ($d_{20} = 1,42$ g/ml),

3.2. Močovina,

3.3. 10 % (m/v) roztok jodidu draselného, 10 g jodidu draselného sa rozpustí v 100 ml vody.

4. PRÍSTROJE A POMÔCKY

4.1. Bežné laboratórne vybavenie.

4.2. Vylúhovacia banka s objemom 100 ml,

4.3. Digestor s vyhrievacím blokom,

4.4. Filtračný papier (Whatman č. 42 alebo jeho ekvivalent) alebo 0,45 μ m membránový filter.

5. POSTUP

5.1. K približne 1 g šampónu vo vyluhovacej banke (4.2.) sa pridá 2,5 ml koncentrovanej kyseliny dusičnej (3.1.) a nechá sa vylúhovať v digestore s vyhrievacím blokom (4.3.) pri 150 ° C počas 30 minút.

5.2. Vylúhovaná vzorka sa zriedi 25 ml vody a prefiltruje sa cez filtračný papier alebo 0,45 μ m membránový filter (4.4.).

5.3. K 2,5 ml filtrátu sa pridá 5 ml vody, 2,5 g močoviny (3.2.) a zahreje sa do varu. Ochladí sa a pridá sa 1 ml roztoku jodidu draselného (3.3.).

5.4. Žlté až oranžové sfarbenie, ktoré stáť rýchlo tmavne, je dôkazom prítomnosti selénu.

B. STANOVENIE

1. ROZSAH A OBLASŤ POUŽITIA

Táto metóda je vhodná na stanovenie sulfidu seleničitého ako selénu v šampónoch proti lupinám, ktoré obsahujú do 4,5 % (hmot.) sulfidu seleničitého.

2. PRINCÍP

Vzorka sa vylúhuje kyselinou dusičnou a selén sa vo výslednom produkte výluhu stanoví pomocou atómovej absorpčnej spektrometrie.

3. ČINIDLÁ
Všetky činidlá musia byť analyticky čisté.
 - 3.1. Kyselina dusičná, koncentrovaná ($d_{20} = 1,42 \text{ g/ml}$)
 - 3.2. 5 % (obj.) roztok kyseliny dusičnej: 50 ml kyseliny dusičnej (3.1) sa za stáleho miešania pridá do 500 ml vody v kadičke; tento roztok sa prenesie do jednolitrovej odmernej banky a doplní sa vodou po značku.
 - 3.3. Štandardný zásobný roztok selénu, 1 000 $\mu\text{g/ml}$ v 0,5 M roztoku kyseliny dusičnej („SpectrosoL“ alebo ekvivalent).

4. PRÍSTROJE A POMÔCKY
 - 4.1. Bežné laboratórne vybavenie
 - 4.2. Vylúhovacia banka s objemom 100 ml,
 - 4.3. Digestor s vyhrievacím blokom,
 - 4.4. Filtračný papier (Whatman č. 42 alebo jeho ekvivalent) alebo 0,45 μm membránový filter,
 - 4.5. Atómový absorpčný spektrofotometer vybavený selénovou výbojkou s dutou katódou.

5. POSTUP
 - 5.1. **Príprava vzorky**
 - 5.1.1. Do digesčnej banky (4.2.) sa presne naváži približne 0,2 g („m“ v gramoch) homogénnej vzorky šampónu.
 - 5.1.2. Pridá sa 5 ml koncentrovanej kyseliny dusičnej (3.1.) a nechá sa vylúhovať na 60 minút pri 150 ° C v digestore s vyhrievacím blokom (4.3.).
 - 5.1.3. Roztok sa nechá ochladiť a zriedi sa 100 ml vody. Prefiltruje sa cez filtračný papier alebo 0,45 μm membránový filter (4.4.) a prefiltrovaný roztok sa odloží na stanovenie.
 - 5.2. **Podmienky pre atómovú absorpčnú spektrometriu**

Plameň:	vzduch–acetylén
Vlnová dĺžka:	196,0 nm
Korekcia pozadia:	áno
Podmienky pre palivo:	ochudobnené; pre maximálnu absorbanciu je potrebné optimalizovať výšku horáka a podmienky spaľovania.
 - 5.3. **Kalibrácia**
 - 5.3.1. Do série 100 ml odmerných baniek sa pipetou prenesie 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 a 5,0 ml štandardného zásobného roztoku selénu (3.3.). Objem v každej banke sa doplní 5 % (obj.) roztokom kyseliny dusičnej (3.2.) po značku a premieša sa. Tieto roztoky obsahujú v uvedenom poradí 10, 20, 30, 40 a 50 μg selénu na mililiter.
 - 5.3.2. Zmeria sa absorbanca 5 % (obj.) roztoku kyseliny dusičnej (3.2.) a získaná hodnota sa použije pre kalibračnú krivku ako zodpovedajúca nulovej koncentrácii selénu. Zmeria sa absorbanca každého kalibračného štandardného roztoku selénu (5.3.1.). Zostrojí sa kalibračná krivka závislosti absorbancie od koncentrácie selénu.
 - 5.4. **Stanovenie**
Zmeria sa absorbanca roztoku vzorky (5.1.3.). Z kalibračnej krivky sa odčíta koncentrácia selénu zodpovedajúca hodnote absorbancie nameranej v roztoku vzorky.

6. VÝPOČET

Obsah sulfidu seleničitého vo vzorke v hmotnostných percentách sa vypočíta s použitím vzorca

$$\% \text{ sulfidu seleničitého} = \frac{1,812 \times c}{100 \times m},$$

kde

m je hmotnosť vzorky odobratej na analýzu (5.1.1.) v gramoch a

c je koncentrácia selénu v roztoku vzorky (5.1.3.) odčítaná z kalibračnej krivky v mikrogramoch na mililiter.

7. OPAKOVATELNOSŤ²⁾

Pri obsahu sulfidu seleničitého 1 % (hmot.) rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelne uskutočnených stanovení na tej istej vzorke nesmie presiahnuť 0,05 % (hmot.).

32. STANOVENIE ROZPUSTNÉHO BÁRIA A ROZPUSTNÉHO STRONCIA V PIGMENTOCH VO FORME SOLÍ ALEBO KOMPLEXOV

(Podľa smernice Komisie 93/73/EHS z 9. septembra 1993)

A. STANOVENIE ROZPUSTNÉHO BÁRIA

1. ROZSAH A OBLASŤ POUŽITIA

Táto metóda opisuje postup extrakcie a stanovenia rozpustného bária v pigmentoch vo forme solí alebo komplexov.

2. PRINCÍP

Farbivo sa extrahuje 0,07 M roztokom kyseliny chlorovodíkovej za definovaných podmienok a množstvo bária v extrakte sa stanoví pomocou atómovej absorpčnej spektrometrie.

3. ČINIDLÁ

Všetky činidlá musia byť analyticky čisté.

3.1. Etanol, absolútny

3.2. 0,07 M roztok kyseliny chlorovodíkovej

3.3. 0,5 M roztok kyseliny chlorovodíkovej

3.4. 8 % (m/v) roztok chloridu draselného, 16 g chloridu draselného sa rozpustí v 200 ml 0,07 M roztoku kyseliny chlorovodíkovej (3.2.)

3.5. Štandardné roztoky bária

3.5.1. Štandardný zásobný roztok bária, 1 000 µg/ml v 0,5 M roztoku kyseliny dusičnej („SpectrosoL“ alebo ekvivalent)

3.5.2. Štandardný roztok bária, 200 µg/ml: do 100 ml odmernej banky sa pipetou preniesie 20 ml štandardného zásobného roztoku bária (3.5.1.). Doplní sa 0,07 M roztokom kyseliny chlorovodíkovej (3.2.) po značku a premieša sa.

4. PRÍSTROJE A POMÔCKY

4.1. Bežné laboratórne vybavenie,

4.2. pH meter s presnosťou $\pm 0,2$ jednotiek,

4.3. Trepačka na krúživý pohyb,

4.4. Membránový filter s veľkosťou pórov 0,45 µm,

4.5. Atómový absorpčný spektrofotometer vybavený báriovou výbojkou s dutou katódou.

5. POSTUP

5.1. *Príprava vzorky*

5.1.1. Do kužeľovitej banky sa presne naváži približne 0,5 g („m“ v gramoch) pigmentu. Pre zabezpečenie dostatočného objemu pre účinné miešanie sa nemá použiť banka s objemom menším ako 150 ml.

5.1.2. Pipetou sa pridá 1 ml etanolu (3.1.) a bankou sa krúži, aby sa zabezpečilo dôkladné navlhčenie pigmentu. Z byrety sa pridá presné množstvo 0,07 M roztoku kyseliny chlorovodíkovej (3.2.) potrebné na dosiahnutie pomeru objemu kyseliny k hmotnosti pigmentu presne 50 mililitrov na gram. Celkový objem extraktu vrátane etanolu má byť „V“ v mililitroch. Krúživým pohybom banky na 5 sekúnd sa zabezpečí dôkladné premiešanie obsahu.

- 5.1.3. S použitím pH metra (4.2.) sa odmeria pH výslednej suspenzie a ak je nad 1,5 po kvapkách sa pridáva 0,5 M roztok kyseliny chlorovodíkovej, kým pH nie je v rozmedzí 1,4 a 1,5.
- 5.1.4. Zazátkuje sa a banka sa ihneď pretrepáva 60 minút v trepačke (4.3.) krúživým pohybom. Trepačka musí byť nastavená na dostatočne vysokú rýchlosť, aby sa vytvárala pena. Prefiltruje sa cez 0,45 µm membránový filter (4.4.) a zachytáva sa filtrát. Extrakt sa nemá odstrediť na centrifúge pred prefiltrovaním. Do 50 ml odmernej banky sa pipetou preniesie 5 ml filtrátu, doplní sa 0,07 M roztokom kyseliny chlorovodíkovej (3.2.) po značku a premieša sa. Tento roztok sa tiež použije na stanovenie stroncia (časť B).
- 5.1.5. Do 100 ml odmernej banky sa pipetou preniesie 5 ml roztoku chloridu draselného (3.4.) a alikvotná časť („W_{Ba}“ v mililitroch) zriedeného filtrátu (5.1.4), aby sa dosiahla predpokladaná koncentrácia medzi 3 a 10 µg bária na mililiter. Alikvotná časť 10 ml by mala byť na úvod postačujúca. Doplní sa 0,07 M roztokom kyseliny chlorovodíkovej (3.2.) po značku a premieša sa.
- 5.1.6. Koncentrácia bária v roztoku (5.1.5.) sa stanoví pomocou atómovej absorpčnej spektrometrie v ten istý deň.

5.2. **Podmienky pre atómovú absorpčnú spektrometriu**

Plameň: oxid dusný–acetylén

Vlnová dĺžka: 553,5 nm

Korekcia pozadia: nie

Podmienky pre palivo: ochudobnené; pre maximálnu absorbanciu je potrebné optimalizovať výšku horáka a podmienky spaľovania.

5.3. **Kalibrácia**

- 5.3.1. Do série 100 ml odmerných baniek sa pipetou preniesie 1, 2, 3, 4 a 5 ml štandardného roztoku bária (3.5.2.). Do každej banky sa pipetou preniesie 5 ml roztoku chloridu draselného (3.4.), doplní sa 0,07 M roztokom kyseliny chlorovodíkovej (3.2.) po značku a premieša sa. Tieto roztoky obsahujú v uvedenom poradí 2, 4, 6, 8 a 10 µg bária na mililiter.

Podobne sa bez pridania štandardného roztoku bária pripraví slepý roztok.

- 5.3.2. Zmeria sa absorbanca slepého roztoku (5.3.1.) a získaná hodnota sa použije pri kalibračnej krivke ako zodpovedajúca nulovej koncentrácii bária. Zmeria sa absorbanca každého kalibračného štandardného roztoku bária (5.3.1.). Zostrojí sa kalibračná krivka závislosti absorbancie od koncentrácie bária.

5.4. **Stanovenie**

Zmeria sa absorbanca roztoku vzorky (5.1.5.). Z kalibračnej krivky sa odčíta koncentrácia bária zodpovedajúca hodnote absorbancie pre roztok vzorky.

6. VÝPOČET

Obsah rozpustného bária v pigmente v hmotnostných percentách je daný vzorcom

$$\% \text{ rozpustného bária} = \frac{c \times V}{10 W_{\text{Ba}} \times m},$$

kde

m je hmotnosť vzorky odobratej na analýzu (5.1.1) v gramoch;

c je koncentrácia bária v roztoku vzorky (5.1.5) odčítaná z kalibračnej krivky v mikrogramoch na mililiter.

V je celkový objem extraktu v mililitroch (5.1.2) a

W_{Ba} je objem extraktu odobratého v 5.1.5 v mililitroch.

7. **OPAKOVATELNOSŤ**
Najlepší dosiahnuteľný odhad opakovateľnosti ² pre túto metódu je 0,3 % pri obsahu rozpustného bária 2 % (hmot.).
8. **POZNÁMKY**
- 8.1. Za určitých podmienok môže byť absorbanca bária zvýšená v dôsledku prítomnosti vápnika. Jeho príspevok môže byť potlačený pridaním horečnatých iónov v koncentrácii 5 g na liter ⁶.
- 8.2. Povolené je použitie optickej emisnej spektrometrie s indukčne viazanou plazmou ako alternatívy plameňovej atómovej absorpčnej spektrometrie.

B. STANOVENIE ROZPUSTNÉHO STRONCIA

1. **ROZSAH A OBLASŤ POUŽITIA**
Táto metóda opisuje postup extrakcie a stanovenia rozpustného stroncia v pigmentoch vo forme solí alebo komplexov.
2. **PRINCÍP**
Pigment sa extrahuje 0,07 M roztokom kyseliny chlorovodíkovej za definovaných podmienok a množstvo stroncia v extrakte sa stanoví pomocou atómovej absorpčnej spektrometrie.
3. **ČINIDLÁ**
Všetky činidlá musia byť analyticky čisté.
- 3.1. Etanol, absolútny
- 3.2. 0,07 M roztok kyseliny chlorovodíkovej
- 3.3. 8 % (m/v) roztok chloridu draselného, 16 g chloridu draselného sa rozpustí v 200 ml 0,07 M roztoku kyseliny chlorovodíkovej (3.2),
- 3.4. Štandardné roztoky stroncia
- 3.4.1. Štandardný zásobný roztok stroncia, 1 000 µg/ml v 0,5 M roztoku kyseliny dusičnej („SpectrosoL“ alebo ekvivalent).
- 3.4.2. Štandardný roztok stroncia, 100 µg/ml: do 100 ml odmernej banky sa pipetou preniesie 10 ml štandardného zásobného roztoku stroncia (3.4.1). Doplní sa 0,07 M roztokom kyseliny chlorovodíkovej (3.2) po značku a premieša sa.
4. **PRÍSTROJE A POMÔCKY**
- 4.1. Bežné laboratórne vybavenie,
- 4.2. Membránový filter s veľkosťou pórov 0,45 µm,
- 4.3. Atómový absorpčný spektrofotometer vybavený stronciovou výbojkou s dutou katódou.
5. **POSTUP**
- 5.1. *Príprava vzorky*
Na stanovenie obsahu rozpustného stroncia sa použije roztok pripravený v časti A 5.1.4.
- 5.1.1. Do 100 ml odmernej banky sa pipetou preniesie 5 ml roztoku chloridu draselného (3.3.) a alikvotná časť („W_{Sr}“ v mililitroch) zriedeného filtrátu (A 5.1.4.), aby sa

⁶ Horčík ako modifikátor pri stanovení bária plameňovou atómovou emisnou spektrometriou (Magnesium as modifier for the determination of barium by flame atomic emission spectrometry) Jerrow, M. a kol. *Analytical Proceedings* 1991, 28, 40.

dosiahla predpokladaná koncentrácia medzi 2 a 5 µg stroncia na mililiter. Alikvotná časť 25 ml by mala byť na úvod postačujúca. Doplní sa 0,07 M roztokom kyseliny chlorovodíkovej (3.2.) po značku a premieša sa.

5.1.2. Koncentrácia stroncia v roztoku (5.1.1.) sa stanoví pomocou atómovej absorpčnej spektrometrie v ten istý deň.

5.2. *Podmienky pre atómovú absorpčnú spektrometriu*

Plameň: oxid dusný–acetylén

Vlnová dĺžka: 460,7 nm

Korekcia pozadia: nie

Podmienky pre palivo: ochudobnené, pre maximálnu absorpciu je potrebné optimalizovať výšku horáka a podmienky spaľovania.

5.3. *Kalibrácia*

5.3.1. Do série 100 ml odmerných baniek sa pipetou preniesie 1, 2, 3, 4 a 5 ml štandardného roztoku stroncia (3.4.2.). Do každej banky sa pipetou preniesie 5 ml roztoku chloridu draselného (3.3.); doplní sa 0,07 M roztokom kyseliny chlorovodíkovej (3.2.) po značku a premieša sa. Tieto roztoky obsahujú v uvedenom poradí 1, 2, 3, 4, a 5 µg stroncia na mililiter.

Podobne sa bez pridania štandardného roztoku stroncia pripraví slepý roztok.

5.3.2. Zmeria sa absorpcia slepého roztoku (5.3.1.) a získaná hodnota sa použije v kalibračnej krivke ako zodpovedajúca nulovej koncentrácii stroncia. Zmeria sa absorpcia každého kalibračného štandardného roztoku stroncia (5.3.1.). Zostrojí sa kalibračná krivka závislosti absorpcie od koncentrácie stroncia.

5.4. *Stanovenie*

Zmeria sa absorpcia roztoku vzorky (5.1.1.). Z kalibračnej krivky sa odčíta koncentrácia stroncia zodpovedajúca hodnote absorpcie nameranej pre roztok vzorky.

6. **VÝPOČET**

Obsah rozpustného stroncia v pigmente v hmotnostných percentách je daný vzorcom

$$\% \text{ rozpustného stroncia} = \frac{c \times V}{10 W_{\text{Sr}} \times m},$$

kde

m je hmotnosť vzorky odobratej na analýzu (A 5.1.1.) v gramoch;

c je koncentrácia stroncia v roztoku vzorky (5.1.1.) odčítaná z kalibračnej krivky v mikrogramoch na mililiter;

V je celkový objem extraktu v mililitroch (A 5.1.2) a

W_{Sr} je objem extraktu odobratého v 5.1.1 v mililitroch.

7. **OPAKOVATELNOSŤ²⁾**

Najlepší dosiahnuteľný odhad opakovateľnosti pre túto metódu je 0,09 % pri obsahu rozpustného stroncia 0,6 % (hmot.).

8. **POZNÁMKA**

Povolené je použitie optickej emisnej spektrometrie s indukčne viazanou plazmou ako alternatívy plameňovej atómovej absorpčnej spektrometrie.

33. DÔKAZ A STANOVENIE BENZYLALKOHOLU (Podľa smernice Komisie 93/73/EHS z 9. septembra 1993)

- A. DÔKAZ
1. ROZSAH A OBLASŤ POUŽITIA
Táto metóda opisuje dôkaz benzylalkoholu v kozmetických výrobkoch.
 2. PRINCÍP
Benzylalkohol sa dokazuje prostredníctvom tenkovrstvovej chromatografie na silikagélových platniach.
 3. ČINIDLÁ
Všetky činidlá musia byť analyticky čisté.
 - 3.1. Benzylalkohol
 - 3.2. Chloroform
 - 3.3. Etanol, absolútny
 - 3.4. n-pentán
 - 3.5. Vyvíjacie rozpúšťadlo: dietyléter
 - 3.6. Štandardný roztok benzylalkoholu: do 100 ml odmernej banky sa naváži 0,1 g benzylalkoholu (3.1.), doplní sa etanolom (3.3.) po značku a premieša sa.
 - 3.7. Tenkovrstvové chromatografické platne, sklené, 100 × 200 mm alebo 200 × 200 mm, potiahnuté 0,25 mm vrstvou silikagélu 60 F₂₅₄.
 - 3.8. Detekčné činidlo: 10 % (m/v) roztok kyseliny fosforečnano-dodekamolybdénovej v etanole (3.3.).
 4. PRÍSTROJE A POMÔCKY
 - 4.1. Bežné zariadenie pre tenkovrstvovú chromatografiu,
 - 4.2. Chromatografická vyvíjacia komora s dvojitým žliabkom, s celkovými rozmermi približne 80 mm × 230 mm × 240 mm,
 - 4.3. Chromatografický papier: Whatman alebo ekvivalent,
 - 4.4. Ultrafialová lampa s vlnovou dĺžkou 254 nm.
 5. POSTUP
 - 5.1. *Príprava vzorky*
Do 10 ml odmernej banky sa naváži 1 g analyzovaného výrobku. Pridajú sa 3 ml chloroformu (3.2.) a intenzívne sa pretrepáva, kým sa výrobok nerozdisperguje. Doplní sa etanolom (3.3.) po značku a intenzívne sa pretrepáva do vzniku číreho alebo takmer číreho roztoku.
 - 5.2. *Tenkovrstvová chromatografia*
 - 5.2.1. Chromatografická vyvíjacia komora (4.2.) sa nasýti n-pentánom (3.4.) podľa nasledovného postupu: stena komory susedná k zadnému žliabku sa potiahne chromatografickým papierom (4.3.) tak, aby spodný okraj papiera bol v žliabku. Zadný žliabok sa naplní 25 ml n-pentánu (3.4.) naliatím tohto roztoku po povrchu chromatografického papiera. Ihneď sa uzavrie vrchnákom a nechá sa stáť 15 minút.
 - 5.2.2. Na vhodné body na čiare štartu chromatografickej platne (3.7.) sa nanesie 10 µl roztoku vzorky (5.1.) a 10 µl štandardného roztoku benzylalkoholu (3.6.). Platňa sa nechá vyschnúť.
 - 5.2.3. Do predného žliabku vyvíjacej komory sa pipetou preniesie 10 ml dietyléru (3.5.) a následne sa do rovnakého žliabku ihneď umiestni platňa (5.2.2.). Vyvíjacia komora

Psa rýchlo uzavrie vrchnákom a platňa sa nechá vyvíjať do vzdialenosti 150 mm. Platňa sa vyberie z chromatografickej vyvíjacej komory a nechá sa vyschnúť pri laboratórnej teplote.

- 5.2.4. Platňa (5.2.3.) sa pozoruje pod ultrafialovým svetlom a označí sa poloha fialových škvŕn. Platňa sa postrieka roztokom detekčného činidla (3.8.) a potom sa zahrieva asi 15 minút na 120 ° C. Benzylalkohol sa prejaví ako tmavomodrá škvŕna.
- 5.2.5. Vypočíta sa R_F hodnota škvŕny získanej zo štandardného roztoku benzylalkoholu. Tmavomodrá škvŕna s rovnakou R_F hodnotou získaná z roztoku vzorky je dôkazom prítomnosti benzylalkoholu. Detekčný limit : 0,1 µg benzylalkoholu.

B. STANOVENIE

1. ROZSAH A OBLASŤ POUŽITIA

Táto metóda opisuje stanovenie benzylalkoholu v kozmetických výrobkoch.

2. DEFINÍCIA

Množstvo benzylalkoholu stanovené touto metódou sa vyjadrí v hmotnostných percentách.

3. PRINCÍP

Vzorka sa extrahuje metanolom a množstvo benzylalkoholu v extrakte sa stanoví vysoko účinnou kvapalinovou chromatografiou (HPLC).

4. ČINIDLÁ

Všetky činidlá musia byť analyticky čisté a podľa potreby vhodné pre HPLC,

- 4.1 Metanol,
- 4.2. 4-etoxyfenol
- 4.3. Benzylalkohol
- 4.4. Mobilná fáza: metanol (4.1)/voda (45 : 55 v obj. dieloch),
- 4.5. Zásobný roztok benzylalkoholu: do 100 ml odmernej banky sa presne naváži približne 0,1 g benzylalkoholu (4.3). Doplní sa metanolom (4.1) po značku a premieša sa.
- 4.6. Zásobný roztok vnútorného štandardu: do 100 ml odmernej banky sa presne naváži približne 0,1 g 4-etoxyfenolu (4.2). Doplní sa metanolom (4.1) po značku a premieša sa.
- 4.7. Štandardné roztoky: do série 25 ml odmerných baniek sa pipetou prenesú množstvá zásobného roztoku benzylalkoholu (4.5.) a zásobného roztoku vnútorného štandardu (4.6.) podľa sérii v uvedenej tabuľke. Doplnia sa metanolom (4.1.) po značku a premiešajú sa.

Štandardný roztok	Koncentrácia benzylalkoholu		Koncentrácia 4-etoxyfenolu	
	pridá sa (4.5) v ml	µg/ml *	pridá sa (4.6) v ml	µg/ml *
I	0,5	20	2,0	80
II	1,0	40	2,0	80
III	2,0	80	2,0	80
IV	3,0	120	2,0	80
V	5,0	200	2,0	80

(*) Tieto hodnoty sú uvedené pre usmernenie a zodpovedajú koncentráciám štandardných roztokov pripravených s použitím roztoku benzylalkoholu a 4-etoxyfenolu, ktoré obsahujú presne 0,1 % (m/v) benzylalkoholu, resp. presne 0,1 % (m/v) 4-etoxyfenolu.

5. PRÍSTROJE A POMÔCKY

- 5.1. Bežné laboratórne vybavenie,
- 5.2. Vysoko účinný kvapalinový chromatograf s ultrafialovým detektorom s nastaviteľnou vlnovou dĺžkou a 10 µl dávkovacou slučkou,
- 5.3. Analytická kolóna: 250 mm × 4,6 mm kolóna z nehrdzavejúcej ocele naplnená 5 µm Spherisorbom ODS alebo jej ekvivalent,
- 5.4. Vodný kúpeľ
- 5.5. Ultrazvukový kúpeľ
- 5.6. Centrifúga
- 5.7. Centrifugačné kyvety s objemom 15 ml

6. POSTUP

6.1. *Príprava vzorky*

- 6.1.1. Do centrifugačnej kyvety (5.7.) sa presne naváži približne 0,1 g („m“ v gramoch) vzorky a pridá sa 5 ml metanolu (4.1.).
- 6.1.2. Zahrieva sa 10 minút na vodnom kúpeli temperovanom na 50 ° C, potom sa kyveta umiestni do ultrazvukového kúpeľa (5.5.), kým sa vzorka dôkladne nerozdisperguje.
- 6.1.3. Ochladí sa, potom sa päť minút odstredí na centrifúge pri 3 500 ot./min.
- 6.1.4. Supernatantová kvapalina sa preniesie do 25 ml odmernej banky.
- 6.1.5. Vzorka sa znova extrahuje ďalšími 5 ml metanolu (4.1.). Extrakty sa spoja do 25 ml odmernej banky.
- 6.1.6. Do 25 ml odmernej banky sa pipetou preniesie 2 ml štandardného roztoku vnútorného štandardu (4.6.). Doplní sa metanolom (4.1.) po značku a premieša sa. Tento roztok sa použije na stanovenia v stupni analýzy opísanej v časti 6.4.

6.2. *Chromatografia*

- 6.2.1. Vysoko účinný kvapalinový chromatograf (5.2) sa nastaví bežným spôsobom. Prietoková rýchlosť mobilnej fázy (4.4.) sa nastaví na 2 ml za minútu.
- 6.2.2. Vlnová dĺžka UV detektora (5.2.) sa nastaví na 210 nm.

6.3. *Kalibrácia*

- 6.3.1. Nastrekne sa 10 µl každého štandardného roztoku benzylalkoholu (4.7.) a merajú sa plochy pík benzylalkoholu a 4-etoxyfenolu.
- 6.3.2. Pre každý štandardný roztok benzylalkoholu (4.7.) sa vypočíta pomer plochy píku benzylalkoholu k 4-etoxyfenolu. Nanesením týchto pomerov na os y a odpovedajúcich koncentrácií benzylalkoholu v µg na mililiter na os x sa zostrojí kalibračná krivka.

6.4. *Stanovenie*

- 6.4.1. Nastrekne sa 10 µl roztoku vzorky (6.1.6.) a merajú sa plochy pík benzylalkoholu a 4-etoxyfenolu. Vypočíta sa pomer plochy píku benzylalkoholu k 4-etoxyfenolu. Tento postup sa opakuje s ďalšou 10 µl alikvotnou časťou roztoku vzorky, kým sa nedosiahnu zhodné výsledky.
- 6.4.2. Z kalibračnej krivky (6.3.2.) sa odčíta koncentrácia benzylalkoholu zodpovedajúca pomeru plochy pík benzylalkoholu a 4-etoxyfenolu.

7. VÝPOČET

Obsah benzylalkoholu vo vzorke v hmotnostných percentách sa vypočíta s použitím vzorca

$$\% \text{ benzylalkoholu} = \frac{c}{400 \times m},$$

kde

m je hmotnosť vzorky odobratej na analýzu (6.1.1.) v gramoch a

c je koncentrácia benzylalkoholu v roztoku vzorky (6.1.6.) odčítaná z kalibračnej krivky v mikrogramoch na mililiter.

8. OPAKOVATELNOSŤ ²⁾

Pre obsah benzylalkoholu 1 % (hmot.) by rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelne uskutočnených stanovení na tej istej vzorke nemal presiahnuť 0,1 % (hmot.).

34. DÔKAZ ZIRKÓNIA A STANOVENIE ZIRKÓNIA, HLINÍKA A CHLÓRU V NEAEROSÓLOVÝCH ANTIPERSPIRANTOCH

(Podľa smernice Komisie 93/73/EHS z 9. septembra 1993)

Metóda pozostáva s piatich stupňov

- A. **DÔKAZ ZIRKÓNIA**
- B. **STANOVENIE ZIRKÓNIA**
- C. **STANOVENIE HLINÍKA**
- D. **STANOVENIE CHLÓRU**
- E. **VÝPOČET POMERU ATÓMOV HLINÍKA K ATÓMOM ZIRKÓNIA A ATÓMOV HLINÍKA PLUS ZIRKÓNIA K ATÓMOM CHLÓRU**

A. **DÔKAZ ZIRKÓNIA**

1. ROZSAH A OBLASŤ POUŽITIA

Táto metóda opisuje dôkaz zirkónia v kozmetických výrobkoch typu neaerosólových antiperspirantov. Metóda nie je vhodná na dôkaz zirkónia v komplexoch hlinito–zirkoničitých hydroxido–chloridov $[Al_xZr(OH)_yCl_z \cdot n H_2O]$.

2. PRINCÍP

Zirkónium sa dokazuje na základe charakteristickej červeno-fialovej zrazeniny vytváratej s alizarínovou červenou S v silne kyslom prostredí.

3. ČINIDLÁ

Všetky činidlá musia byť analyticky čisté.

3.1. Koncentrovaná kyselina chlorovodíková, ($d_{20} = 1,18$ g/ml)

3.2. 2 % (m/v) vodný roztok alizarínovej červenej S (CI 58005) roztok natrium alizarínsulfonátu

4. PRÍSTROJE A POMÔCKY

4.1. Bežné laboratórne vybavenie

5. POSTUP

5.1. 2 ml vody sa pridajú k asi 1 g vzorky v skúmavke. Zazátkuje sa a pretrepe.

5.2. Pridajú sa tri kvapky roztoku alizarínovej červenej S (3.2), následne sa pridajú 2 ml koncentrovanej kyseliny chlorovodíkovej (3.1). Zazátkuje sa a pretrepe.

5.3. Nechá sa stáť približne dve minúty.

5.4. Červeno-fialovo sfarbený roztok supernatantu a zrazeniny je dôkazom prítomnosti zirkónia.

B. **STANOVENIE ZIRKÓNIA**

1. ROZSAH A OBLASŤ POUŽITIA

Táto metóda je vhodná na stanovenie zirkónia v komplexoch hlinito-zirkoničitých hydroxido–chloridov do maximálneho obsahu 7,5 % (hmot.) zirkónia v neaerosólových antiperspirantoch.

2. PRINCÍP
Zirkónium sa extrahuje z výrobku v kyslom prostredí a stanoví sa pomocou plameňovej atómovej absorpčnej spektrometrie.
3. ČINIDLÁ
Všetky činidlá musia byť analyticky čisté.
 - 3.1. Kyselina chlorovodíková, koncentrovaná ($d_{20} = 1,18$ g/ml),
 - 3.2. 10 % (obj.) roztok kyseliny chlorovodíkovej, 100 ml kyseliny chlorovodíkovej (3.1) sa za stáleho miešania pridá do 500 ml vody v kadičke. Tento roztok sa preniesie do jednolitrovej odmernej banky a doplní sa vodou po značku.
 - 3.3. Štandardný zásobný roztok zirkónia, 1 000 $\mu\text{g/ml}$ v 0,5 M roztoku kyseliny chlorovodíkovej („SpectrosoL“ alebo ekvivalent).
 - 3.4. Chlorid hlinitý – hydrát $[\text{AlCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}]$, 22,6 g hexahydrátu chloridu hlinitého sa rozpustí v 250 ml 10 % (obj.) roztoku kyseliny chlorovodíkovej (3.2.),
 - 3.5. Chlorid amónny, 5 g chloridu amónneho sa rozpustí v 250 ml 10 % (obj.) roztoku kyseliny chlorovodíkovej (3.2.).
4. PRÍSTROJE A POMÔCKY
 - 4.1. Bežné laboratórne vybavenie
 - 4.2. Magnetické miešadlo s vyhrievacou platňou
 - 4.3. Filtračný papier (Whatman č. 41 alebo jeho ekvivalent)
 - 4.4. Atómový absorpčný spektrofotometer vybavený zirkóniovou výbojkou s dutou katódou
5. POSTUP
 - 5.1. *Príprava vzorky*
 - 5.1.1. Do 150 ml kadičky sa presne naváži približne 1 g („m“ v gramoch) homogénnej vzorky výrobku. Pridá sa 40 ml vody a 10 ml koncentrovanej kyseliny chlorovodíkovej (3.1.).
 - 5.1.2. Kadička sa umiestni na vyhrievaciu platňu magnetického miešadla (4.2.). Spustí sa miešanie a zahreje sa do varu. Na vrch kadičky sa umiestni hodinové sklíčko, aby sa predišlo rýchlemu odpareniu. Varí sa päť minút, kadička sa odloží zo zdroja tepla a ochladí sa na laboratórnu teplotu.
 - 5.1.3. Obsah kadičky sa s použitím filtračného papiera (4.3.) prefiltruje do 100 ml odmernej banky. Kadička sa opláchne dvoma 10 ml dávkami vody a voda z opláchnutia sa po prefiltrovaní pridá do banky. Doplní sa vodou po značku a premieša sa. Tento roztok sa tiež použije na stanovenie hliníka v časti C.
 - 5.1.4. Do 50 ml odmernej banky sa pipetou preniesie 20 ml roztoku vzorky (5.1.3.), 5 ml roztoku chloridu hlinitého (3.4) a 5 ml roztoku chloridu amónneho (3.5.). Doplní sa 10 % (obj.) roztokom kyseliny chlorovodíkovej (3.2.) po značku a premieša sa.
 - 5.2. **Podmienky pre atómovú absorpčnú spektrometriu**

Plameň:	oxid dusný–acetylén
Vlnová dĺžka:	360,1 nm
Korekcia pozadia:	nie
Podmienky pre palivo:	obohatené; pre maximálnu absorbanciu je potrebné optimalizovať výšku horáka a podmienky spaľovania.
 - 5.3. *Kalibrácia*
 - 5.3.1. Do série 50 ml odmerných baniek sa pipetou preniesie 5, 10, 15, 20 a 25 ml štandardného zásobného roztoku zirkónia (3.3.). Do každej odmernej banky sa pipetou pridá 5 ml chloridu hlinitého (3.4.) a 5 ml chloridu amónneho (3.5.). Objem

sa doplní 10 % (obj.) roztokom kyseliny chlorovodíkovej (3.2.) po značku a premieša sa. Tieto roztoky obsahujú v uvedenom poradí 100, 200, 300, 400 a 500 µg zirkónia na mililiter. Podobne sa bez pridania štandardného roztoku zirkónia pripraví slepý roztok.

5.3.2. Zmeria sa absorbancia slepého roztoku (5.3.1.) a získaná hodnota sa použije pre kalibračnú krivku ako zodpovedajúca nulovej koncentrácii zirkónia. Zmeria sa absorbancia každého kalibračného štandardného roztoku zirkónia (5.3.1.). Zostrojí sa kalibračná krivka závislosti hodnôt absorbancie na koncentrácii zirkónia.

5.4. *Stanovenie*

Zmeria sa absorbancia roztoku vzorky (5.1.4.). Z kalibračnej krivky sa odčíta koncentrácia zirkónia zodpovedajúca hodnote absorbancie nameranej v roztoku vzorky.

6. **VÝPOČET**

Obsah zirkónia vo vzorke v hmotnostných percentách sa vypočíta s použitím vzorca

$$\% \text{ zirkónia} = \frac{c}{40 \times m},$$

kde

m je hmotnosť vzorky odobratej na analýzu (5.1.1) v gramoch a

c je koncentrácia zirkónia v roztoku vzorky (5.1.4) odčítaná z kalibračnej krivky v mikrogramoch na mililiter.

7. **OPAKOVATELNOSŤ ²⁾**

Pre obsah zirkónia 3 % (hmot.) by rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelne uskutočnených stanovení na tej istej vzorke nemal presiahnuť 0,1 % (hmot.).

8. **POZNÁMKA**

Povolené je použitie optickej emisnej spektrometrie s indukčne viazanou plazmou ako alternatívy plameňovej atómovej absorpčnej spektrometrie.

C. STANOVENIE HLINÍKA

1. **ROZSAH A OBLASŤ POUŽITIA**

Táto metóda je vhodná na stanovenie hliníka prítomného v komplexoch hlinito-zirkoničitých hydroxido-chloridov do maximálneho obsahu 12 % (hmot.) hliníka v neaerosólových antiperspirantoch.

2. **PRINCÍP**

Hliník sa extrahuje z výrobku v kyslom prostredí a stanoví sa pomocou plameňovej atómovej absorpčnej spektrometrie.

3. **ČINIDLÁ**

Všetky činidlá musia byť analyticky čisté.

3.1. Kyselina chlorovodíková, koncentrovaná ($d_{20} = 1,18$ g/ml)

3.2. 1 % (obj.) roztok kyseliny chlorovodíkovej, 10 ml koncentrovanej kyseliny chlorovodíkovej (3.1.) sa za stáleho miešania pridá do 500 ml vody v kadičke. Tento roztok sa prenese do jednolitrovej odmernej banky a doplní sa vodou po značku.

3.3. Štandardný zásobný roztok hliníka, 1 000 µg/ml v 0,5 M roztoku kyseliny dusičnej („SpectrosoL“ alebo ekvivalent),

3.4. Chlorid draselný, 10 g chloridu draselného sa rozpustí v 250 ml 1 % (obj.) roztoku kyseliny chlorovodíkovej (3.2.).

4. PRÍSTROJE A POMÔCKY

4.1. Bežné laboratórne vybavenie

4.2. Atómový absorpčný spektrofotometer vybavený hliníkovou výbojkou s dutou katódou.

5. POSTUP

5.1. *Príprava vzorky*

Na stanovenie obsahu hliníka sa použije roztok pripravený v časti B 5.1.3.

5.1.1. Do 100 ml odmernej banky sa pipetou prenesie 5 ml roztoku vzorky (B 5.1.3.), 10 ml roztoku chloridu draselného (3.4.). Doplní sa 1 % (obj.) roztokom kyseliny chlorovodíkovej (3.2.) po značku a premieša sa.

5.2. *Podmienky pre atómovú absorpčnú spektrometriu*

Plameň: oxid dusný–acetylén

Vlnová dĺžka: 309,3 nm

Korekcia pozadia: nie

Podmienky pre palivo: obohatené; pre maximálnu absorbanciu je potrebné optimalizovať výšku horáka a podmienky spaľovania.

5.3. *Kalibrácia*

5.3.1. Do série 100 ml odmerných baniek sa pipetou prenesie 1, 2, 3, 4 a 5 ml štandardného zásobného roztoku hliníka (3.3.). Do každej odmernej banky sa pipetou pridá 10 ml chloridu draselného (3.4.). Objem sa doplní 1 % (obj.) roztokom kyseliny chlorovodíkovej (3.2.) po značku a premieša sa. Podobne sa bez pridania štandardného roztoku hliníka pripraví slepý roztok.

5.3.2. Zmeria sa absorbanca slepého roztoku (5.3.1.) a získaná hodnota sa použije pre kalibračnú krivku ako zodpovedajúca nulovej koncentrácii hliníka. Zmeria sa absorbanca každého kalibračného štandardného roztoku hliníka. Zostrojí sa kalibračná krivka závislosti absorbancie od koncentrácie hliníka.

5.4. *Stanovenie*

Zmeria sa absorbanca roztoku vzorky (5.1.1.). Z kalibračnej krivky sa odčíta koncentrácia hliníka zodpovedajúca hodnote absorbancie nameranej v roztoku vzorky.

6. VÝPOČET

Obsah hliníka vo vzorke v hmotnostných percentách sa vypočíta s použitím vzorca

$$\% \text{ hliníka} = \frac{c}{5 \times m},$$

kde

m je hmotnosť vzorky odobratej na analýzu (B 5.1.1.) v gramoch a

c je koncentrácia hliníka v roztoku vzorky (5.1.1.) odčítaná z kalibračnej krivky v mikrogramoch na mililiter.

7. OPAKOVATEĽNOSŤ²⁾

Pre obsah hliníka 3,5 % (hmot.) by rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelne uskutočnených stanovení na tej istej vzorke nemal presiahnuť 0,1 % (hmot.).

8. POZNÁMKA
Povolené je použitie optickej emisnej spektrometrie s indukčne viazanou plazmou ako alternatívy plameňovej atómovej absorpčnej spektrometrie.

D. STANOVENIE CHLÓRU

1. ROZSAH A OBLASŤ POUŽITIA

Táto metóda je vhodná na stanovenie chlóru prítomného ako chloridový ión v komplexoch hlinito–zirkoničitých hydroxido–chloridov v neaerosólových antiperspirantoch.

2. PRINCÍP

Chloridové ióny sa vo výrobku stanovia potenciometrickou titráciou štandardným roztokom dusičnanu strieborného.

3. ČINIDLÁ

Všetky činidlá musia byť analyticky čisté

- 3.1. Kyselina dusičná, koncentrovaná ($d_{20} = 1,42$ g/ml)
3.2. 5 % (obj.) roztok kyseliny dusičnej, 25 ml koncentrovanej kyseliny dusičnej (3.1) sa za stáleho miešania pridá do 250 ml vody v kadičke. Tento roztok sa preniesie do 500 ml odmernej banky a doplní sa vodou po značku.
3.3. Acetón
3.4. 0,1 M roztok dusičnanu strieborného pre odmernú analýzu („AnalaR“ alebo ekvivalent).

4. PRÍSTROJE A POMÔCKY

- 4.1. Bežné laboratórne vybavenie,
4.2. Magnetické miešadlo s vyhrievacou platňou,
4.3. Strieborná elektróda,
4.4. Kalomelová referenčná elektróda,
4.5. pH/milivoltmeter vhodný pre potenciometrickú titráciu.

5. POSTUP

5.1. *Príprava vzorky*

- 5.1.1. Do 250 ml kadičky sa presne naváži približne 1 g („m“ v gramoch) homogénnej vzorky výrobku. Pridá sa 80 ml vody a 20 ml 5 % (obj.) roztoku kyseliny dusičnej (3.2.).
5.1.2. Kadička sa umiestni na vyhrievaciu platňu magnetického miešadla (4.2.). Spustí sa miešanie a zahreje sa do varu. Na vrch kadičky sa umiestni hodinové sklíčko, aby sa predišlo rýchlemu odpareniu. Varí sa päť minút, kadička sa odloží zo zdroja tepla a ochladí sa na laboratórnu teplotu.
5.1.3. Pridá sa 10 ml acetónu (3.3), elektródy (4.3. a 4.4.) sa ponoria pod povrch roztoku a spustí sa miešanie. Titruje sa potenciometricky 0,1 M roztokom dusičnanu strieborného (3.4.) a za účelom stanovenia koncového bodu titrácie (V ml) sa zostrojí diferenciálna krivka.

6. VÝPOČET

Obsah chlóru prítomného vo vzorke v hmotnostných percentách sa vypočíta s použitím vzorca:

$$\% \text{ chlóru} = \frac{0,3545 \times V}{m}$$

kde

m je hmotnosť vzorky odobratej na analýzu (5.1.1.) v gramoch a

V je objem 0,1 M roztoku dusičnanu strieborného spotrebovaného na titráciu do koncového bodu (5.1.3.) v mililitroch.

7. OPAKOVATELNOSŤ ²⁾

Pre obsah chlóru 4 % (hmot.) by rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelne uskutočnených stanovení na tej istej vzorke nemal presiahnuť 0,1 % (hmot.).

E. VÝPOČET POMERU ATÓMOV HLINÍKA K ATÓMOM ZIRKÓNIA A ATÓMOV HLINÍKA PLUS ZIRKÓNIA K ATÓMOM CHLÓRU

1. VÝPOČET POMERU ATÓMOV HLINÍKA K ATÓMOM ZIRKÓNIA

Pomer Al : Zr sa vypočíta s použitím vzorca

$$\text{pomer Al : Zr} = \frac{\% (\text{hmot.}) \text{ Al} \times 91,22}{\% (\text{hmot.}) \text{ Zr} \times 26,98}$$

2. VÝPOČET POMERU ATÓMOV HLINÍKA PLUS ZIRKÓNIA K ATÓMOM CHLÓRU

3.

Pomer (Al + Zr) : Cl sa vypočíta s použitím vzorca

$$\text{pomer (Al + Zr) : Cl} = \frac{\frac{\% (\text{hmot.}) \text{ Al}}{26,98} + \frac{\% (\text{hmot.}) \text{ Zr}}{91,22}}{\frac{\% (\text{hmot.}) \text{ Cl}}{35,45}}$$

**35. DÔKAZ A STANOVENIE HEXAMIDÍNU, DIBRÓMHXAMIDÍNU,
DIBRÓMPROPAMIDÍNU A CHLÓRHEXIDÍNU**
(Smernica komisie 93/73/EHS z 9. septembra 1993)

1. ROZSAH A OBLASŤ POUŽITIA

Táto metóda opisuje kvalitatívne a kvantitatívne stanovenie

- **Hexamidínu a jeho solí, vrátane isetionátu a 4–hydroxybenzoátu,**
- **Dibrómhexamidínu a jeho solí, vrátane isetionátu,**
- **Dibrómpropamidínu a jeho solí, vrátane isetionátu,**
- **Diacetátu, diglukonátu a dihydrochloridu chlórhexidínu v kozmetických výrobkoch.**

2. DEFINÍCIA

Obsah hexamidínu, dibrómhexamidínu, dibrómpropamidínu a chlórhexidínu stanovený touto metódou sa vyjadrí v hmotnostných percentách.

3. PRINCÍP

Dôkaz a stanovenie sa uskutočňujú iónovo-párovaciou vysoko účinnou chromatografiou (HPLC) na obrátenej fáze, nasledovanou ultrafialovou spektrofotometrickou detekciou. Hexamidín, dibrómhexamidín, dibrómpropamidín a chlórhexidín sa identifikujú na základe retenčných časov na chromatografickej kolóne.

4. ČINIDLÁ

Všetky činidlá musia byť analyticky čisté a podľa potreby musia byť vhodné pre HPLC.

4.1. Metanol

4.2. Sodná soľ kyseliny heptán–1– sulfónovej, monohydrát

4.3. Kyselina octová, ľadová ($d_{20} = 1,05$ g/ml),

4.4. Chlorid sodný

4.5. Mobilné fázy

4.5.1. Rozpúšťadlo I: 0,005 M roztok monohydrátu sodnej soli kyseliny heptán–1– sulfónovej (4.2.) v metanole (4.1.), s pH upraveným na hodnotu 3,5 s ľadovou kyselinou octovou (4.3.).

4.5.2. Rozpúšťadlo II: 0,005 M roztok monohydrátu sodnej soli kyseliny heptán–1– sulfónovej (4.2) vo vode, s pH upraveným na hodnotu 3,5 s ľadovou kyselinou octovou (4.3.).

Ak je potrebné vylepšiť tvar píkov, mobilné fázy môžu byť modifikované a pripravené nasledovne

rozpúšťadlo I: 5,84 g chloridu sodného (4.4.) a 1,1013 g monohydrátu sodnej soli kyseliny heptán–1–sulfónovej (4.2.) sa rozpustí v 100 ml vody. Pridá sa 900 ml metanolu (4.1.) a pH sa upraví na 3,5 s ľadovou kyselinou octovou (4.3.), rozpúšťadlo II: 5,84 g chloridu sodného (4.4.) a 1,1013 g monohydrátu sodnej soli kyseliny heptán–1–sulfónovej (4.2.) sa rozpustí v jednom litri vody a pH sa upraví na 3,5 s ľadovou kyselinou octovou (4.3.).

4.6. Diisetionát hexamidínu [$C_{20}H_{26}N_4O_2 \cdot 2 C_2H_6O_4S$]

4.7. Diisetionát dibrómhexamidínu [$C_{20}H_{24}Br_2N_4O_2 \cdot 2 C_2H_6O_4S$]

4.8. Diisetionát dibrómpropamidínu [$C_{17}H_{18}Br_2N_4O_2 \cdot 2 C_2H_6O_4S$]

4.9. Diacetát chlórhexidínu [$C_{22}H_{30}Cl_2N_{10} \cdot 2 C_2H_4O_2$]

- 4.10. Referenčné roztoky: pripraví sa 0,05 % (m/v) roztoky každej zo štyroch konzervačných látok (4.6. až 4.9.) v rozpúšťadle I (4.5.1.).
- 4.11. 3,4,4'-Trichlórkarbanilidu (triclokarbán),
- 4.12. 4,4'-Dichlór-3-(trifluórmetyl)karbanilid (halokarbán),

5. PRÍSTROJE A POMÔCKY

- 5.1. Bežné laboratórne vybavenie,
- 5.2. Vysoko účinný kvapalinový chromatograf s UV detektorom s nastaviteľnou vlnovou dĺžkou,
- 5.3. Analytická kolóna: nehrdzavejúca oceľ, dĺžka 30 cm, vnútorný priemer 4 mm, naplnená s μ -Bondapakom C₁₈, 10 μ m alebo ekvivalent,
- 5.4. Ultrazvukový kúpeľ.

6. DÔKAZ

6.1. Príprava vzorky

Do 10 ml odmernej banky sa naváži približne 0,5 g vzorky a doplní sa rozpúšťadlom I (4.5.1.) po značku. Banka sa umiestni na 10 minút do ultrazvukového kúpeľa (5.4.). Roztok sa prefiltruje alebo odstredí na centrifúge. Pre chromatografiu sa zachytáva filtrát alebo supernatant.

6.2. Chromatografia

6.2.1. Gradient mobilnej fázy

Čas (min)	rozpúšťadlo I % (obj.) (4.5.1)	rozpúšťadlo II % (obj.) (4.5.2)
0	50	50
15	65	35
30	65	35
45	50	50

- 6.2.2. Prietoková rýchlosť mobilnej fázy (6.2.1.) sa nastaví na 1,5 ml/min a teplota kolóny na 35 °C.
- 6.2.3. Detektor sa nastaví na vlnovú dĺžku 264 nm.
- 6.2.4. Nastrekne sa 10 μ l každého z referenčných roztokov (4.10) a zaznamenajú sa ich chromatogramy.
- 6.2.5. Nastrekne sa 10 μ l roztoku vzorky (6.1) a zaznamená sa jej chromatogram.
- 6.3. Porovnaním retenčného času (retenčných časov) píku (píkov) zisteného (zistených) v 6.2.5 s retenčným časmi píkov referenčných roztokov získanými v 6.2.4 sa zistí, či je prítomný hexamidín, dibrómhexamidín, dibrómpromamidín alebo chlórhexidín.

7. STANOVENIE

7.1. Príprava štandardných roztokov

Ako vnútorný štandard sa použije jedna z konzervačných látok (4.6. až 4.9.), ktorá nie je prítomná vo vzorke. Ak to nie je možné, môžu sa použiť triclokarbán (4.11.) alebo halokarbán (4.12.).

- 7.1.1. 0,05 % (m/v) zásobný roztok v rozpúšťadle I (4.5.1.) konzervačnej látky zistenej v 6.3.
- 7.1.2. 0,05 % (m/v) zásobný roztok v rozpúšťadle I (4.5.1.) konzervačnej látky vybratej ako vnútorný štandard.
- 7.1.3. Pre každú identifikovanú konzervačnú látku sa pripraví štyri štandardné roztoky do série 10 ml odmerných baniek, prenesením množstiev zásobného roztoku zistenej konzervačnej látky (7.1.1.) a primeraných množstiev zásobného roztoku vnútorného

štandardu (7.1.2.) podľa nižšie uvedenej tabuľky. Každá banka sa doplní rozpúšťadlom I (4.5.1.) po značku a premieša sa.

Štandardný roztok	Zásobný roztok vnútorného štandardu	Zásobný roztok konzervačnej látky, ktorej prítomnosť bola preukázaná	
	pridá sa (7.1.2) ml	pridá sa (7.1.1) ml	µg/ml (*)
I	1,0	0,5	25
II	1,0	1,0	50
III	1,0	1,5	75
IV	1,0	2,0	100

(*) Tieto hodnoty sú uvedené pre usmernenie a odpovedajú koncentráciám identifikovanej konzervačnej látky v štandardných roztokoch pripravených zriedením zásobného roztoku, ktorý obsahuje presne 0,05 % identifikovanej konzervačnej látky.

7.2. Príprava vzorky

7.2.1. Do 10 ml odmernej banky sa presne naváži približne 0,5 g („p“ v gramoch) vzorky, pridá sa 1 ml roztoku vnútorného štandardu (7.1.2.) a 6 ml rozpúšťadla I (4.5.1.) a premieša sa.

7.2.2. Banka sa umiestni na 10 minút do ultrazvukového kúpeľa (5.4.). Ochladí sa. Doplní sa rozpúšťadlom I po značku a premieša sa. Odstredí sa na centrifúge alebo sa prefiltruje cez skladaný filtračný papier. Pre chromatografiu sa zachytáva supernatant alebo filtrát.

7.3. Chromatografia

7.3.1. Gradient mobilnej fázy, prietoková rýchlosť, teplota kolóny a vlnová dĺžka detektora príslušenstva HPLC (5.2.) sa nastaví na hodnoty, aké boli požadované v stupni dôkazu (6.2.1. až 6.2.3.).

7.3.2. Nastrekne sa 10 µl roztoku vzorky (7.2.2.) a meria sa plocha pík. Tento postup sa opakuje s ďalšou 10 µl alikvotnou časťou roztoku vzorky, kým sa nedosiahnu zhodné výsledky. Vypočíta sa pomer plochy píku vytváraného analyzovanou zlúčeninou k ploche píku vytváraného vnútorným štandardom.

7.4. Kalibrácia

7.4.1. Nastrekne sa 10 µl každého z štandardných roztokov (7.1.3.) a merajú sa plochy pík.

7.4.2. Pre každý štandardný roztok (7.1.3.) sa vypočíta pomer plochy píku hexamidínu, dibromhexamidínu, dibrompropamidínu alebo chlórhexidínu k ploche píku vnútorného štandardu. Nanesením týchto pomerov na os y a zodpovedajúcich koncentrácií zistenej konzervačnej látky v µg na mililiter na os x sa zostrojí kalibračná krivka.

7.4.2. Z kalibračnej krivky (7.4.2.) sa odčíta koncentrácia identifikovanej konzervačnej látky zodpovedajúca pomeru plochy pík vypočítanej v 7.3.2.

8. VÝPOČET

Obsah hexamidínu, dibromhexamidínu, dibrompropamidínu alebo chlórhexidínu vo vzorke v hmotnostných percentách sa vypočíta s použitím vzorca

$$\% = \frac{c}{1000 \times p} \times \frac{MW_1}{MW_2},$$

kde

p je hmotnosť vzorky odobratej na analýzu (7.2.1) v gramoch,

c je koncentrácia konzervačnej látky v roztoku vzorky odčítaná z kalibračnej krivky, v mikrogramoch na mililiter;

MW_1 je molekulová hmotnosť základnej formy prítomnej konzervačnej látky,

MW_2 je molekulová hmotnosť príslušnej soli (bod 10 tabuľka).

9. OPAKOVATELNOSŤ ²

Pre obsah hexamidínu, dibrómhexamidínu, dibrómpropamidínu alebo chlórhexidínu 0,1 % (hmot.) rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelne uskutočnených stanovení na tej istej vzorke nesmie presiahnuť 0,005 % (hmot.).

10. *Tabuľka molekulových hmotností*

Hexamidín	$C_{20}H_{26}N_4O_2$	354,45
Diisetionát hexamidínu	$C_{20}H_{26}N_4O_2 \cdot 2C_2H_6O_4S$	606,72
di- <i>p</i> -hydroxybenzoát hexamidínu	$C_{20}H_{26}N_4O_2 \cdot 2C_7H_6O_3$	630,71
dibrómhexamidín	$C_{20}H_{24}Br_2N_4O_2$	512,24
diisetionát dibrómhexamidínu	$C_{20}H_{24}Br_2N_4O_2 \cdot 2C_2H_6O_4S$	764,51
dibrómpropamidín	$C_{17}H_{18}Br_2N_4O_2$	470,18
diisetionát dibrómpropamidínu	$C_{17}H_{18}Br_2N_4O_2 \cdot 2C_2H_6O_4S$	722,43
chlórhexidín	$C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$	505,45
diacetát chlórhexidínu	$C_{22}H_{30}Cl_2N_{10} \cdot 2C_2H_4O_2$	625,56
diglkonát chlórhexidínu	$C_{22}H_{30}Cl_2N_{10} \cdot 2C_6H_{12}O_7$	897,76
dihydrochlorid chlórhexidínu	$C_{22}H_{30}Cl_2N_{10} \cdot 2HCl$	578,37

**36. DÔKAZ A STANOVENIE KYSELINY BENZOOVEJ,
KYSELINY 4-HYDROXYBENZOOVEJ, KYSELINY SORBOVEJ,
KYSELINY SALICYLOVEJ A KYSELINY PROPIÓNOVEJ**

(Podľa smernice Komisie 95/32/ES zo 7. júla 1995)

1. ROZSAH A OBLASŤ POUŽITIA

Táto metóda je použiteľná na dôkaz a stanovenie kyseliny benzoovej, kyseliny 4-hydroxybenzoovej, kyseliny sorbovej, kyseliny salicylovej a kyseliny propiónovej v kozmetických výrobkoch. Samostatné postupy opisujú dôkaz týchto konzervačných látok a to, stanovenie kyseliny propiónovej, stanovenie kyseliny 4-hydroxybenzoovej, kyseliny salicylovej, kyseliny sorbovej a kyseliny benzoovej.

2. DEFINÍCIA

Množstvá kyseliny benzoovej, kyseliny 4-hydroxybenzoovej, kyseliny salicylovej, kyseliny sorbovej a kyseliny propiónovej stanovené touto metódou sa vyjadrujú ako hmotnostné percentá voľných kyselín.

A. DÔKAZ

1. PRINCÍP

Po acidobázickej extrakcii konzervačných látok sa extrakt následne analyzuje tenkovrstvovou chromatografiou (TLC) a reakčnou chromatografiou („derivatizácia na platni“). Podľa výsledkov sa identifikácia potvrdí vysoko účinnou kvapalinovou chromatografiou (HPLC) alebo v prípade kyseliny propiónovej plynovou chromatografiou (GC).

2. ČINIDLÁ

2.1. Všeobecné informácie,

Všetky činidlá musia byť analyticky čisté. Použitá voda musí byť destilovaná alebo minimálne voda rovnocennej čistoty,

2.2. Acetón,

2.3. Dietyléter,

2.4. Acetonitril,

2.5. Toluén,

2.6. *n*-hexán,

2.7. Parafínový olej,

2.8. Kyselina chlorovodíková, 4 M,

2.9. Hydroxid draselný, vodný roztok, 4 M,

2.10. Chlorid vápenatý, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,

2.11. Uhličitan lítny, Li_2CO_3 ,

2.12. 2-bróm-2'-acetonafón,

2.13. Kyselina 4-hydroxybenzoová,

2.14. Kyselina salicylová,

2.15. Kyselina benzoová,

2.16. Kyselina sorbová,

2.17. Kyselina propiónová,

2.18. Referenčné roztoky

Pripravujú sa 0,1 % (m/v) roztoky (100 mg/100 ml) každej z piatich konzervačných látok (2.13. až 2.17.) v dietyléteri,

- 2.19. Derivatizačné činidlo
0,5 % (m/v) roztok 2-bróm-2'-acetonafónu (2.12.) v acetonitrile (2.4.) (50 mg/10 ml); tento roztok sa musí pripravovať každý týždeň čerstvý a musí sa uskladňovať v chladničke,
- 2.20. Roztok katalyzátora
0,3 % (m/v) roztok uhličitanu lítneho (2.11.) vo vode (300 mg/100 ml); tento roztok sa musí vždy pripravovať čerstvý,
- 2.21. Vyvíjací roztok
Toluén (2.5.)/acetón (2.2.), 20:0,5 (obj. diely),
- 2.22. Kvapalný parafín (2.7.)/*n*-hexán (2.6.), 1:2 (obj. diely).

3. PRÍSTROJE A POMÔCKY

- Bežné laboratórne pomôcky,
- 3.1. Vodný kúpeľ, s možnosťou nastavenia teploty na 60 °C,
- 3.2. Vyvíjacia komora,
- 3.3. Zdroj ultrafialového svetla, 254 a 366 nm,
- 3.4. Platne na tenkovrstvovú chromatografiu (TLC), potiahnuté silikagélom 60 bez fluorescenčného indikátora, 20 × 20 cm, hrúbka vrstvy 0,25 mm s koncentračnou zónou 2,5 × 20 cm (Merck 11845 alebo ich ekvivalent),
- 3.5. Mikrostriekačka, 10 µl,
- 3.6. Mikrostriekačka, 25 µl,
- 3.7. Sušiareň, s možnosťou nastavenia teploty do 105 °C,
- 3.8. 50-ml sklené skúmavky so skrutkovacím uzáverom,
- 3.9. Filtračný papier s priemerom 90 mm, Schleicher & Schull, Weissband č. 5892 alebo jeho ekvivalent,
- 3.10. Univerzálny pH indikátorový papier, pH 1-11,
- 3.11. 5 ml sklené vzorkovnice,
- 3.12. Rotačná vákuová odparka (Rotavapor alebo ekvivalent),
- 3.13. Vyhrievacia platňa (varič).

4. POSTUP

4.1. *Príprava vzorky*

Do 50 ml skúmavky so skrutkovacím uzáverom (3.8.) sa naváži približne 1 g vzorky. Pridajú sa štyri kvapky 4 M roztoku kyseliny chlorovodíkovej (2.8.) a 40 ml acetónu (2.2.). V prípade veľmi zásaditých výrobkov, ako napr. toaletné mydlo sa pridá 20 kvapiek 4 M roztoku kyseliny chlorovodíkovej (2.8.). Indikátorovým papierikom (3.10.) sa skontroluje, či pH je približne dva. Skúmavka sa uzavrie a jednu minútu sa intenzívne pretrepáva.

Ak je potrebné uľahčiť extrakciu konzervačných látok do acetónovej fázy, vzorka sa mierne zahrieva na asi 60 °C do roztopenia kvapalnej fázy.

Roztok sa ochladí na laboratórnu teplotu a cez filtračný papier (3.9.) sa prefiltruje do kužeľovitej banky.

20 ml filtrátu sa preniesie do 200 ml kužeľovitej banky, pridá sa 20 ml vody a premieša sa. pH zmesi sa so 4 M roztokom hydroxidu draselného (2.9.) upraví na približne 10, na meranie pH sa použije indikátorový papierik (3.10.).

Pridá sa 1 g chloridu vápenatého (2.10.) a intenzívne sa pretrepe. Cez filtračný papier (3.9.) sa prefiltruje do 250 ml oddeľovacieho lievika obsahujúceho 75 ml dietyléteru (2.3.) a jednu minútu sa intenzívne pretrepáva. Nechajú sa oddeliť vrstvy a vodná vrstva sa vypustí do 250 ml kužeľovitej banky. Éterická vrstva sa vyleje. Pomocou indikátorového papiera (3.10.) sa so 4 M roztokom kyseliny

chlorovodíkovej (2.8.) upraví pH vodného roztoku na približne dva. Pridá sa 10 ml dietyléteru (2.3.), banka sa uzavrie a jednu minútu intenzívne pretrepáva, nechajú sa oddeliť vrstvy a éterická vrstva sa preniesie do odparovacieho zariadenia (3.12.). Vodná vrstva sa vyleje. Éterická vrstva sa odparí takmer do sucha a zvyšok sa znova rozpustí v 1 ml dietyléteru (2.3.). Roztok sa preniesie do sklenej vzorkovnice (3.11.).

4.2. Tenkovrstvová chromatografia

Pre každý štandard a vzorku, ktoré majú byť nanosené na tenkovrstvovú platňu, sa na štartovaciu čiaru v koncentračnej zóne TLC platne (3.4.) striekačkou (3.5.) naniesie v rovnakej vzdialenosti približne 3 μ l roztoku uhličitanu lítneho (2.20.) a platnička sa vysuší v prúde studeného vzduchu.

TLC platňa sa preniesie na vyhrievaciu platňu (3.13.) vyhriatu na 40 °C, aby sa škvrný pri nanášaní udržali čo najmenšie. Mikrostriekačkou (3.5.) sa na štartovaciu čiaru platne presne na miesta, kde boli nanosené škvrný roztoku uhličitanu lítneho naniesie 10 μ l každého roztoku štandardu (2.18.) a roztoku vzorky (4.1.). Nakoniec sa naniesie približne 15 μ l derivatizačného činidla (2.19.) (roztoku 2-bróm-2'-acetonaftónu), opäť presne na miesta, kde boli nanosené škvrný roztokov štandardov/vzorky a roztoku uhličitanu lítneho.

TLC platňa sa zahrieva v sušiarňi (3.7.) na 80 °C 45 minút. Po ochladení sa platňa vyvíja vo vyvíjacej komore (3.2.), nasycovanej počas 15 minút (bez použitia vložky z filtračného papiera), vyvíjacím rozpúšťadlom 2.21. (toluén/acetón), kým čelo rozpúšťadla nedosiahne vzdialenosť 15 cm od štartu (to môže trvať približne 80 minút).

Platňa sa vysuší v prúde studeného vzduchu a získané škvrný sa vyšetria pod UV svetlom (3.3.). Na zvýšenie fluorescencie slabých škvrn sa TLC platňa môže ponoriť do zmesi kvapalného parafínu a *n*-hexánu (2.22.).

5. DÔKAZ

Vypočítajú sa hodnoty *R_f* pre každú škvrnu.

Porovnajú sa hodnoty *R_f* a správanie sa pri ožiarení UV svetlom pozorované pri škvrnách získaných zo vzorky so škvrnami získanými z roztokov štandardov.

Vyvodí sa predbežné závery o prítomnosti a identite prítomných konzervačných látok. Uskutoční sa identifikácia pomocou HPLC opísaná v časti B, alebo, ak sa ukazuje, že je prítomná kyselina propiónová, pomocou GC opísaná v časti C. Získané retenčné časy sa porovnajú s časmi získanými pri roztokoch štandardov.

Výsledky TLC a HPLC alebo GC sa spoja a konečný dôkaz prítomnosti konzervačných látok vo vzorke vychádza z kombinácie výsledkov.

B. STANOVENIE KYSELINY BENZOOVEJ, KYSELINY 4-HYDROXY-BENZOOVEJ, KYSELINY SORBOVEJ A KYSELINY SALICYLOVEJ

1. PRINCÍP

Po okyslení sa vzorka extrahuje zmesou etanolu a vody. Po filtrácii sa konzervačné látky následne stanoví vysoko účinnou kvapalinovou chromatografiou (HPLC).

2. ČINIDLÁ

2.1. Všetky činidlá musia byť analyticky čisté a ak je to potrebné, vhodné na HPLC.

Použitá voda musí byť destilovaná alebo minimálne voda rovnocennej čistoty,

2.2. Etanol, absolútny,

2.3. Kyselina 4-hydroxybenzoová,

2.4. Kyselina salicylová,

- 2.5. Kyselina benzoová,
 - 2.6. Kyselina sorbová,
 - 2.7. Octan sodný, $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$,
 - 2.8. Kyselina octová, $(\alpha)^{20}_4 = 1,05 \text{ g/ml}$,
 - 2.9. Acetonitril,
 - 2.10. Kyselina sírová, 2 M,
 - 2.11. Hydroxid draselný, vodný roztok, 0,2 M,
 - 2.12. Kyselina 2-metoxybenzoová,
 - 2.13. Zmes etanol/voda
Zmieša sa deväť objemových dielov etanolu (2.2.) a jeden objemový diel vody (2:1),
 - 2.14. Roztok vnútorného štandardu
Pripraví sa roztok obsahujúci približne 1 g kyseliny 2-metoxybenzoovej (2.12.) v 500 ml zmesi etanol/voda (2.13.),
 - 2.15. Mobilná fáza na HPLC,
 - 2.15.1. Octanový tlmivý roztok
6,35 g octanu sodného (2.7.) a 20,0 ml kyseliny octovej (2.8.) sa pridá k 1 l vody a premieša sa,
 - 2.15.2. Mobilná fáza sa pripraví zmiešaním deviatich objemových dielov octanového tlmivého roztoku (2.15.1.) a jedného objemového dielu acetonitrilu (2.9.),
 - 2.16. Zásobný roztok konzervačných látok
Do 50 ml odmernej banky sa presne naváži približne 0,05 g kyseliny 4-hydroxybenzoovej (2.3.), 0,2 g kyseliny salicylovej (2.4.), 0,2 g kyseliny benzoovej (2.5.) a 0,05 g kyseliny sorbovej (2.6.) a doplní sa po značku zmesou etanol/voda (2.13.). Roztok sa uskladňuje v chladničke. Roztok je stály jeden týždeň.,
 - 2.17. Štandardné roztoky konzervačných látok
Do série 20 ml odmerných baniek sa preniesie jednotlivo 8,00, 4,00, 2,00, 1,00 a 0,50 ml zásobného roztoku (2.16.). Do každej banky sa pridá po 10,00 ml roztoku vnútorného štandardu (2.14.) a 0,5 ml 2 M roztoku kyseliny sírovej (2.10.). Doplní sa po značku zmesou etanol/voda (2.13.). Tieto roztoky sa musia pripravovať čerstvé.
3. PRÍSTROJE A POMÔCKY
Ak nie je uvedené inak, bežné laboratórne vybavenie
 - 3.1. Vodný kúpeľ, nastavený na 60 °C,
 - 3.2. Vysoko účinný kvapalinový chromatograf s nastaviteľným UV detektorom a 10 µl dávkovacou slučkou,
 - 3.3. Analytická kolóna z nehrdzavejúcej ocele, dlhá 12,5 až 25 cm, s vnútorným priemerom 4,6 mm, s náplňou Nucleosil 5C18 alebo ekvivalentnou,
 - 3.4. Filtračný papier s priemerom 90 mm, Schleicher & Schull, Weissband č. 5892 alebo jeho ekvivalent,
 - 3.5. 50-ml sklenené skúmavky so skrutkovacím uzáverom,
 - 3.6. 5 ml sklenené vzorkovnice,
 - 3.7. Varné kamienky, karborundové, s rozmerom 2 až 4 mm alebo ich ekvivalent.
 4. POSTUP
 - 4.1. *Príprava vzorky*
 - 4.1.1. *Príprava vzorky bez prídavku vnútorného štandardu*
Do 50 ml skúmavky so skrutkovacím uzáverom (3.5.) sa naváži 1 g vzorky. Do skúmavky sa pipetou pridá 1,00 ml 2 M roztoku kyseliny sírovej (2.10.) a 30,0 ml

zmesi etanol/voda (2.13.). Pridá sa približne 1 g varných kamienkov (3.7.), skúmavka sa uzavrie a intenzívne sa pretrepáva aspoň jednu minútu, kým sa nezíska homogénna suspenzia. Na uľahčenie extrakcie konzervačných látok do etanolickej fázy sa skúmavka umiestni presne na päť minút do vodného kúpeľa (3.1.) udržiavaného na 60 °C.

Skúmavka sa ihneď ochladí pod prúdom studenej vody a extrakt sa uskladní na jednu hodinu pri teplote 5 °C.

Extrakt sa prefiltruje cez filtračný papier (3.4.). Približne 2 ml extraktu sa preniesie do sklenenej vzorkovnice (3.6.). Extrakt sa uschováva pri teplote 5 °C a HPLC stanovenie sa uskutoční do 24 hodín od jeho prípravy.

4.1.2. Príprava vzorky s prídavkom vnútorného štandardu

Do 50 ml skúmavky so skrutkovacím uzáverom (3.5.) sa naváži s presnosťou na tri desatinné miesta $1 \pm 0,1$ g (a gramov) vzorky. Pipetou sa pridá 1,00 ml 2 M roztoku kyseliny sírovej (2.10.) a 30,0 ml zmesi etanol/voda (2.13.). Pridá sa približne 1 g varných kamienkov (3.7.) a 10,00 ml roztoku vnútorného štandardu (2.14.). Skúmavka sa uzavrie a intenzívne sa pretrepáva aspoň jednu minútu, kým sa nezíska homogénna suspenzia. Na uľahčenie extrakcie konzervačných látok do etanolickej fázy sa skúmavka umiestni presne na päť minút do vodného kúpeľa (3.1.) udržiavaného na 60 °C.

Skúmavka sa ihneď ochladí pod prúdom studenej vody a extrakt sa uskladní na jednu hodinu pri teplote 5 °C.

Extrakt sa prefiltruje cez filtračný papier (3.4.). Približne 2 ml extraktu sa preniesú do sklenej vzorkovnice (3.6.). Extrakt sa uschováva pri teplote 5 °C a HPLC stanovenie sa uskutoční do 24 hodín od jeho prípravy.

4.2. *Vysoko účinná kvapalinová chromatografia*

Mobilná fáza: acetonitril/octanový tlmivý roztok (2.15.).

Prietoková rýchlosť mobilnej fázy cez kolónu sa nastaví na $2,0 \pm 0,5$ ml/minútu. Detektor sa nastaví na vlnovú dĺžku 240 nm.

4.2.1. *Kalibrácia*

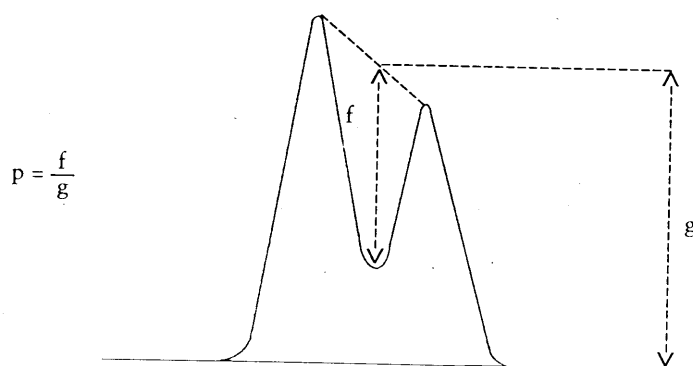
Do kvapalinového chromatografu (3.2.) sa nadávkuje 10 µl dávky každého zo štandardných roztokov konzervačných látok (2.17.). Pre každý roztok sa stanoví pomer výšky píku skúmanej konzervačnej látky k výške píku vnútorného štandardu získaných z chromatogramov. Pre každú konzervačnú látku sa zostrojí graf závislosti výšky píku od koncentrácie každého štandardného roztoku. Overí sa, či sa pre štandardné roztoky postupom pre kalibráciu získala lineárna závislosť.

4.2.2. *Stanovenie*

Do kvapalinového chromatografu (3.2.) sa nadávkuje 10 µl extraktu vzorky (4.1.1.) a zaznamená sa chromatogram. Nadávkuje sa 10 µl štandardného roztoku konzervačnej látky (2.17.) a zaznamená sa chromatogram. Získané chromatogramy sa porovnávajú. Ak sa na chromatografe extraktu vzorky (4.1.1.) neobjaví žiadny pík s približne rovnakým retenčným časom, ako má kyselina 2-metoxybenzoová (odporúčaný vnútorný štandard), nadávkuje sa 10 µl extraktu vzorky s prídavkom vnútorného štandardu (4.1.2.) a zaznamená sa chromatogram.

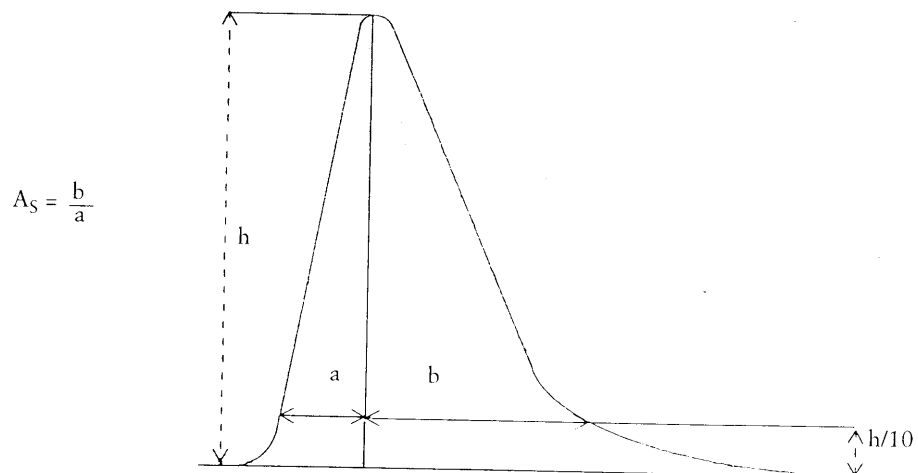
Ak sa v chromatograme extraktu vzorky (4.1.1.) pozoruje rušiaci pík s rovnakým retenčným časom ako má kyselina 2-metoxybenzoová, vyberie sa iný vhodný vnútorný štandard. (Ak sa pík pre jednu zo skúmaných konzervačných látok nenachádza v chromatograme, táto konzervačná látka sa použije ako vnútorný štandard.)

Overí sa, či chromatogramy získané pre roztok štandardu a roztok vzorky spĺňajú požiadavku, že rozlíšenie píkov najhoršie oddeleného páru musí byť aspoň 0,9. (Vymedzenie rozlíšenia píkov, obr. č. 1.)



Obr. č. 1: rozlíšenie píkov

Ak sa nedosiahne požadované oddelenie píkov, použije sa účinnejšia kolóna alebo sa upraví zloženie mobilnej fázy, až kým sa nesplní požiadavka, že koeficient asymetrie A všetkých získaných píkov sa musí pohybovať medzi 0,9 až 1,5. (Vymedzenie koeficienta asymetrie, obr. č. 2). Na zaznamenanie chromatogramu pre stanovenie koeficienta asymetrie sa odporúča rýchlosť zapisovača aspoň 2 cm/minútu.



Obr. č. 2: koeficient asymetrie píku
Musí sa získať vyrovnaná základná čiara (base line).

5. VÝPOČET

Na výpočet koncentrácie kyslých konzervačných látok v roztoku vzorky sa použijú pomery výšok píkov skúmaných konzervačných látok k výške píku kyseliny 2-metoxybenzoovej (vnútorného štandardu) a kalibračnej krivky. Obsah kyseliny benzoovej, 4-hydroxybenzoovej, kyseliny sorbovej alebo kyseliny salicylovej vo vzorke sa v hmotnostných percentách (x_i) vypočíta pomocou vzorca

$$x_i \% (\text{hmot.}) = \frac{100 \cdot 20 \cdot b}{10^6 \cdot a} = \frac{b}{500 \cdot a},$$

kde

a je hmotnosť (g) skúšobnej vzorky (4.1.2.),

b je koncentrácia ($\mu\text{g/ml}$) konzervačnej látky v extrakte vzorky (4.1.2.) získaná z kalibračnej krivky.

6. OPAKOVATEĽNOSŤ²⁾

Pri obsahu kyseliny 4-hydroxybenzoovej 0,40 % nesmie rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelne uskutočnených stanovení na tej istej vzorke presiahnuť v absolútnej hodnote 0,035 %.

Pri obsahu kyseliny benzoovej 0,50 % nesmie rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelne uskutočnených stanovení na tej istej vzorke presiahnuť v absolútnej hodnote 0,050 %.

Pri obsahu kyseliny salicylovej 0,50 % nesmie rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelne uskutočnených stanovení na tej istej vzorke presiahnuť v absolútnej hodnote 0,045 %.

Pri obsahu kyseliny sorbovej 0,60 % nesmie rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelne uskutočnených stanovení na tej istej vzorke presiahnuť v absolútnej hodnote 0,035 %.

7. POZNÁMKY

7.1. Výsledky testu nehomogenity uskutočneného na tejto metóde ukazujú, že množstvo kyseliny sírovej pridanej do extraktu kyselín zo vzorky je kritické a ohraničenia pre množstvo spracovanej vzorky sa musia udržať v predpísaných medziach.

7.2. Ak je to žiaduce, použije sa primeraná predkolóna.

C. STANOVENIE KYSELINY PROPIÓNOVEJ

1. ROZSAH A OBLASŤ POUŽITIA

Táto metóda je vhodná na stanovenie kyseliny propiónovej s maximálnou koncentráciou 2 % (hmot.) v kozmetických výrobkoch.

2. DEFINÍCIA

Koncentrácia kyseliny propiónovej stanovená touto metódou sa vyjadří v hmotnostných percentách (% hmotn.) v kozmetickom výrobku.

3. PRINCÍP

Stanovenie kyseliny propiónovej sa po extrakcii z výrobku následne uskutoční prostredníctvom plynovej chromatografie s využitím kyseliny 2-metylpropiónovej ako vnútorného štandardu.

4. ČINIDLÁ

Všetky činidlá musia byť analyticky čisté; musí byť použitá destilovaná voda alebo minimálne voda rovnocennej čistoty,

4.1. Etanol, 96 % (obj.),

4.2. Kyselina propiónová,

4.3. Kyselina 2-metylpropiónová,

4.4. Kyselina trihydrogenfosforečná, 10 % (m/v.),

4.5. Roztok kyseliny propiónovej,

Do 50 ml odmernej banky sa presne naváži približne 1,00 g (p gramov) kyseliny propiónovej a doplní sa etanolom (4.1.) po značku,

- 4.6. Roztok vnútorného štandardu: Do 50 ml odmernej banky sa presne naváži približne 1,00 g (e gramov) kyseliny 2-metylpropiónovej a doplní sa po značku etanolom (4.1.).

5. PRÍSTROJE A POMÔCKY

- 5.1. Bežné laboratórne vybavenie,
5.2. Plynový chromatograf s plameňovo-ionizačným detektorom,
5.3. Sklenená skúmavka (20 × 150 mm) so skrutkovacím uzáverom,
5.4. Vodný kúpeľ pri 60 °C,
5.5. 10 ml sklenená striekačka s membránovým filtrom (priemer pórov: 0,45 µm).

6. POSTUP

6.1. *Príprava vzorky*

6.1.1. *Príprava vzorky bez vnútorného štandardu*

Do sklenej skúmavky (5.3.) sa naváži približne 1 g vzorky. Pridá sa 0,5 ml roztoku kyseliny fosforečnej (4.4.) a 9,5 ml etanolu (4.1.).

Skúmavka sa uzavrie a intenzívne sa pretrepe. Ak je to potrebné, skúmavka sa umiestni do vodného kúpeľa zahriateho na 60 °C (5.4.) na päť minút, aby sa úplne rozpustila tuková vrstva. Rýchlo sa ochladí pod tečúcou vodou. Časť roztoku sa prefiltruje cez membránový filter (5.5.). Filtrát sa chromatografuje v ten istý deň.

6.1.2. *Príprava vzorky s vnútorným štandardom*

Do sklenej skúmavky (5.3.) sa naváži s presnosťou na tri desatinné miesta $1 \pm 0,1$ g (a gramov) vzorky. Pridá sa 0,5 ml roztoku kyseliny fosforečnej (4.4.), 0,5 ml roztoku vnútorného štandardu (4.5.) a 9 ml etanolu (4.1.).

Skúmavka sa uzavrie a intenzívne sa pretrepe. Ak je to potrebné, skúmavka sa umiestni do vodného kúpeľa zahriateho na 60 °C (5.4.) na päť minút, aby sa rozpustila tuková vrstva. Rýchlo sa ochladí pod tečúcou vodou. Časť roztoku sa prefiltruje cez membránový filter (5.5.). Filtrát sa chromatografuje v ten istý deň.

6.2. *Podmienky pre plynovú chromatografiu*

Odporúčané sú nasledovné podmienky pre meranie

Kolóna

Typ	nehrdzavejúca oceľ,
Dĺžka	2 m,
Priemer	1/8“,
Náplň	10 % SP TM 1000 (alebo ekvivalent) + 1 % H ₃ PO ₄ na Chromosorb-e WAW 100 až 120 mesh.

Teplota

Dávkovač	200 °C,
Kolóna	120 °C,
Detektor	200 °C,
Nosný plyn	dusík,
Prietoková rýchlosť	25 ml/min.

6.3. *Chromatografia*

6.3.1. *Kalibrácia*

Do série 20 ml odmerných baniek sa pipetou prenesie jednotlivo 0,25, 0,50, 1,00, 2,00 a 4,00 ml roztoku kyseliny propiónovej (4.5.). Do každej odmernej banky sa pipetou prenesie po 1,00 ml roztoku vnútorného štandardu (4.6.); doplní sa po značku etanolom (4.1.) a premieša sa. Takto pripravené roztoky obsahujú e mg/ml kyseliny 2-metylpropiónovej ako vnútorného štandardu (čo predstavuje 1

mg/ml, ak $e = 1\ 000$) a $p/4$, $p/2$, p , $2p$ a $4p$ mg/ml kyseliny propiónovej (čo predstavuje 0,25, 0,50, 1,00, 2,00 a 4,00 mg/ml, ak $p = 1\ 000$).

Nadávkuje sa 1 μ l každého z týchto roztokov a nanesením pomeru hmotnosti kyseliny propiónovej/kyseliny 2-metylpropiónovej na os x a pomer zodpovedajúcich plôch pík na os y sa získa kalibračná krivka. Spravia sa tri vstreknutia každého roztoku a vypočíta sa pomer priemernej plochy píku.

Každý roztok sa nadávkuje trikrát a vypočíta sa priemerný pomer plochy píku.

6.3.2. Stanovenie

Nadávkuje sa 1 μ l filtrátu vzorky 6.1.1. Chromatogram sa porovná s chromatogramom jedného zo štandardných roztokov (6.3.1.). Ak má pík približne rovnaký retenčný čas ako kyselina 2-metylpropiónová, použije sa iný vnútorný štandard. Ak sa nepozoruje pík rušiaci stanovenie, nadávkuje sa 1 μ l filtrátu vzorky 6.1.2. a zmerajú sa plochy píku kyseliny propiónovej a píku vnútorného štandardu.

7. VÝPOČTY

7.1. Z kalibračnej krivky získanej v 6.3.1. sa získa pomer hmotnosti (K) zodpovedajúci ploche pík, vypočítaný v 6.3.2..

7.2. Z takto získaného pomeru hmotnosti sa vypočíta obsah kyseliny propiónovej vo vzorke (x) ako hmotnostné percento pomocou vzorca

$$x \% (\text{hmot.}) = K \frac{0,5 \cdot 100 \cdot e}{50 \cdot a} = K \frac{e}{a},$$

kde

K je pomer vypočítaný v 7.1,

e je hmotnosť vnútorného štandardu v gramoch, naváženého v 4.6.,

a je hmotnosť vzorky v gramoch, naváženej v 6.1.2.

Výsledky sa zaokrúhľia na jedno desatinné miesto.

8. OPAKOVATEĽNOSŤ²⁾

Pri obsahu kyseliny propiónovej 2 % (hmot.) nesmie rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelne uskutočnených stanovení na tej istej vzorke presiahnuť 0,12 %.

**37. DÔKAZ A STANOVENIE HYDROCHINÓNU, MONOMETYLÉTERU
HYDROCHINÓNU, MONOETYLÉTERU HYDROCHINÓNU A
MONOBENZYLÉTERU HYDROCHINÓNU**
(Podľa smernice Komisie 95/32/ES zo 7. júla 1995)

A. DÔKAZ

1. ROZSAH A OBLASŤ POUŽITIA

Metóda opisuje detekciu a dôkaz hydrochinónu, monometyléteru hydrochinónu, monoetyléteru hydrochinónu a monobenzyléteru hydrochinónu (monobenzónu) v kozmetických výrobkoch na zosvetľovanie pokožky.

2. PRINCÍP

Hydrochinón a jeho étery sa dokazujú tenkovrstvovou chromatografiou (TLC).

3. ČINIDLÁ

Všetky činidlá musia byť analyticky čisté,

3.1. Etanol, 96 % (obj.),

3.2. Chloroform,

3.3. Dietyléter,

3.4. Vyvíjacia rozpúšťadlová zmes
chloroform/dietyléter, 66:33 (obj. diely),

3.5. Amoniak, 25 % vodný roztok (hmot.) ($d_{4}^{20} = 0,91$ g/ml),

3.6. Kyselina askorbová,

3.7. Hydrochinón,

3.8. Monometyléter hydrochinónu,

3.9. Monoetyléter hydrochinónu,

3.10. Monobenzyléter hydrochinónu (monobenzón),

3.11. Referenčné roztoky musia byť čerstvo pripravené nasledovné referenčné roztoky; sú stále jeden deň.

3.11.1. Do delenej 10 ml skúmavky sa naváži 0,05 g hydrochinónu (3.7.). Pridá sa 0,250 g kyseliny askorbovej (3.6.) a 5 ml etanolu (3.1.). Pridáva sa roztok amoniaku (3.5.), kým pH nie je 10 a doplní sa do objemu 10 ml etanolom (3.1.).

3.11.2. Do delenej 10 ml skúmavky sa naváži 0,05 g monometyléteru hydrochinónu (3.8.). Pridá sa 0,250 g kyseliny askorbovej (3.6.) a 5 ml etanolu (3.1.). Pridáva sa roztok amoniaku (3.5.), kým pH nie je 10 a doplní sa do objemu 10 ml etanolom (3.1.).

3.11.3. Do delenej 10 ml skúmavky sa naváži 0,05 g monoetyléteru hydrochinónu (3.9.). Pridá sa 0,250 g kyseliny askorbovej (3.6.) a 5 ml etanolu (3.1.). Pridáva sa roztok amoniaku (3.5.), kým pH nie je 10 a doplní sa do objemu 10 ml etanolom (3.1.).

3.11.4. Do delenej 10 ml skúmavky sa naváži 0,05 g monobenzyléteru hydrochinónu (3.10.). Pridá sa 0,250 g kyseliny askorbovej (3.6.) a 5 ml etanolu (3.1.). Pridáva sa roztok amoniaku (3.5.), kým pH nie je 10 a doplní sa do objemu 10 ml etanolom (3.1.).

3.12. Dusičnan strieborný,

3.13. Kyselina fosforečnano-dodekamolybdénová,

3.14. Hexahydrát hexakvanoželezitanu draselného,

3.15. Hexahydrát chloridu železitého,

3.16. Činidlá na postriekanie chromatogramu

3.16.1. Do 5 % (m/v) vodného roztoku dusičnanu strieborného (3.12.) sa pridá roztok amoniaku (3.5.), kým sa vytvorená zrazenina nerozpustí.

Upozornenie Tento roztok sa státím stáva explozívne nestabilný a musí sa po použití vyliat'.

- 3.16.2. 10 % (m/v) roztok kyseliny fosforečnano-dodekamolybdénovej (3.13.) v etanole (3.1.),
- 3.16.3. Pripraví sa 1 % (m/v) vodný roztok hexakynoželezitanu draselného (3.14.) a 2 % (m/v) vodný roztok chloridu železitého (3.15.). Tesne pred použitím sa zmiešajú rovnaké diely obidvoch roztokov.

4. PRÍSTROJE A POMÔCKY

Bežné laboratórne vybavenie,

- 4.1. Bežné vybavenie na TLC,
- 4.2. Hotové TLC platne: silikagél GHR/UV₂₅₄; 20 × 20 cm (Machery, Nagel alebo ich ekvivalent). Hrúbka vrstvy 0,25 mm,
- 4.3. Ultrazvukový kúpeľ,
- 4.4. Centrifúga,
- 4.5. UV lampa, 254 nm.

5. POSTUP

5.1. *Príprava vzorky*

Do 10 ml delenej skúmavky sa navážia 3,0 g vzorky. Pridá sa 0,250 g kyseliny askorbovej (3.6.) a 5 ml etanolu (3.1.). S použitím roztoku amoniaku (3.5.) sa pH upraví na 10. Etanolom (3.1.) sa doplní do objemu 10 ml. Skúmavka sa uzavrie zátkou a 10 minút sa homogenizuje v ultrazvukovom kúpeli. Prefiltruje sa cez filtračný papier alebo odstredí na centrifúge pri 3 000 ot./min.

5.2. *TLC*

- 5.2.1. Chromatografická komora sa nasýti parami vyvíjacej rozpúšťadlovej zmesi (3.4.).
- 5.2.2. Na platňu sa nanesú po 2 µl referenčných roztokov (3.11.) a 2 µl roztoku vzorky (5.1.). Vyvíja sa v tme pri laboratórnej teplote, kým čelo rozpúšťadlovej zmesi nevystúpi do vzdialenosti 15 cm od štartu.
- 5.2.3. Platňa sa vyberie a nechá sa vysušiť pri laboratórnej teplote.

5.3. *Detekcia*

- 5.3.1. Platňa sa pozoruje pod UV svetlom pri 254 nm a označia sa polohy škvŕn.
- 5.3.2. Platňa sa postrieka
 - činidlom dusičnu strieborného (3.16.1), alebo
 - činidlom kyseliny fosforečnano-dodekamolybdénovej (3.16.2) a zahreje sa na 120 °C, alebo
 - roztokom hexakynoželezitanu draselného a roztokom chloridu železitého (3.16.3).

6. DÔKAZ

Vypočítajú sa *R_f* hodnoty pre každú škvŕnu.

Porovnajú sa škvŕny získané pre roztok vzorky so škvŕnami referenčných roztokov so zreteľom na ich *R_f* hodnoty; farbu škvŕn pod UV svetlom a farbu škvŕn po ich vizualizácii postriekaním činidlom.

Uskutoční sa HPLC opísaná v nasledujúcej časti (B) a porovnajú sa retenčné časy zistené pre pík(y) vzorky s retenčnými časmi pík(ov) referenčných roztokov. Výsledky TLC a HPLC na dôkaz prítomnosti hydrochinónu alebo jeho esterov alebo hydrochinónu a jeho esterov sa skombinujú.

7. POZNÁMKY

Za opísaných podmienok boli pozorované nasledovné *R_f* hodnoty

Hydrochinón	0,32
monometyléter hydrochinónu	0,53
monoetyléter hydrochinónu	0,55
monobenzyléter hydrochinónu	0,58

B. STANOVENIE

1. ROZSAH A OBLASŤ POUŽITIA

Táto metóda bližšie určuje postup na stanovenie hydrochinónu, monometyléteri hydrochinónu, monoetyléteri hydrochinónu a monobenzyléteri hydrochinónu v kozmetických výrobkoch na zosvetľovanie pokožky.

2. PRINCÍP

Za mierneho zahrievania, pri ktorom sa roztopí všetok tukový materiál, sa vzorka extrahuje zmesou voda/etanol. Stanovenie analytov vo výslednom roztoku sa uskutoční kvapalinovou chromatografiou s obrátenou fázou s UV detekciou.

3. ČINIDLÁ

3.1. Všetky činidlá musia byť analyticky čisté. Použitá voda musí byť destilovaná alebo minimálne voda rovnocennej čistoty,

3.2. Metanol,

3.3. Hydrochinón,

3.4. Monometyléter hydrochinónu,

3.5. Monoetyléter hydrochinónu,

3.6. Monobenzyléter hydrochinónu (monobenzón),

3.7. Tetrahydrofurán kvality pre HPLC,

3.8. Zmes metanol/voda 1:1 (obj. diely). Zmieša sa jeden objemový diel vody a jeden objemový diel metanolu (3.2.),

3.9. Mobilná fáza

zmes tetrahydrofurán/voda 45:55 (obj. diely). Zmieša sa 45 objemových dielov tetrahydrofuránu (3.7.) a 55 objemových dielov vody,

3.10. Referenčný roztok

Do 50 ml odmernej banky sa naváži 0,06 g hydrochinónu (3.3.), 0,08 g monometyléteri hydrochinónu (3.4.), 0,10 g monoetyléteri hydrochinónu (3.5.) a 0,12 g monobenzyléteri hydrochinónu (3.6.). Rozpustí sa v metanole (3.2.) a doplní sa ním po značku. Referenčný roztok sa pripraví zriedením 10,00 ml tohto roztoku doplnením do 50,00 ml zmesou voda/metanol (3.8.). Tieto roztoky musia byť čerstvo pripravené.

4. PRÍSTROJE A POMÔCKY

Bežné laboratórne vybavenie,

4.1. Vodný kúpeľ, s možnosťou dosiahnuť teplotu 60 °C,

4.2. Vysoko účinný kvapalinový chromatograf s nastaviteľným UV detektorom a 10 µl dávkovacou slučkou,

4.3. Analytická kolóna

Chromatografická kolóna z nehrdzavejúcej ocele, dlhá 250 mm, s vnútorným priemerom 4,6 mm, naplnená fenyl-zorbaxom (fenetylsilánom chemicky naviazaným na Zorbax SIL, na koncoch ukončeným chlórtrimetylsilánom),

s veľkosťou častíc 6 μm alebo ekvivalentná kolóna. Nepoužíva sa predkolóna, okrem fenylovej predkolóny alebo jej ekvivalentu.

4.4. Filtračný papier s priemerom 90 mm, Schleicher and Schull, Weissband č. 5892 alebo jeho ekvivalent

5. POSTUP

5.1. *Príprava vzorky*

Do 50 ml odmernej banky s naváži s presnosťou na tri desatinné miesta $1 \pm 0,1$ g (a gramov) vzorky. Vzorka sa disperguje v 25 ml zmesi voda/metanol (3.8.). Banka sa uzavrie a intenzívne sa pretrepáva aspoň jednu minútu, kým sa nezíska homogénna suspenzia. Banka sa umiestni do vodného kúpeľa (4.1.) zahriateho na 60 °C na uľahčenie extrakcie. Banka sa ochladí a doplní sa po značku zmesou voda/metanol (3.8.). Extrakt sa prefiltruje cez filtračný papier (4.4.). HPLC stanovenie sa uskutoční do 24 hodín od prípravy extraktu.

5.2. *Vysoko účinná kvapalinová chromatografia*

5.2.1. Prietoková rýchlosť mobilnej fázy (3.9.) sa nastaví na 1,0 ml/min a detektor sa nastaví na vlnovú dĺžku 295 nm.

5.2.2. Nadávkuje sa 10 μl roztoku vzorky získanej, ako je opísané v 5.1 a zaznamená sa chromatogram. Merajú sa plochy pík. Uskutoční sa kalibrácia, ako je opísané v 5.2.3. Porovnajú sa chromatogramy získané pre vzorku a roztoky štandardov. Na výpočet koncentrácie analytov v roztoku vzorky sa použije plocha pík a odozvové faktory (RF) vypočítané v 5.2.3..

5.2.3. *Kalibrácia*

Nadávkuje sa 10 μl referenčného roztoku (3.10.) a zaznamená sa chromatogram. Dávkuje sa niekoľkokrát, kým sa nedosiahne konštantná plocha píku. Stanoví sa odozvový faktor RF_i

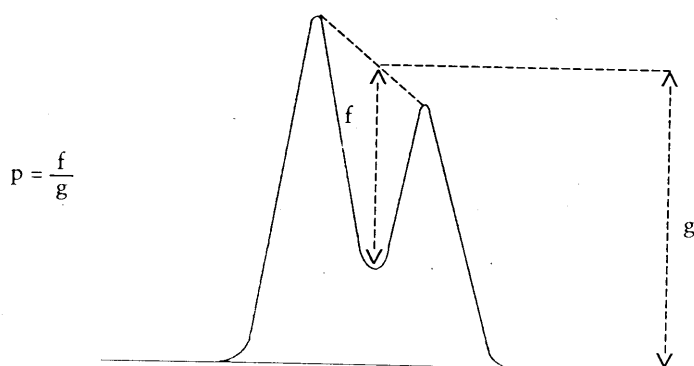
$$RF_i = \frac{P_i}{c_i},$$

kde

p_i je plocha píku hydrochinónu, monometyléteri hydrochinónu, monoetyléteri hydrochinónu alebo monobenzyléteri hydrochinónu a

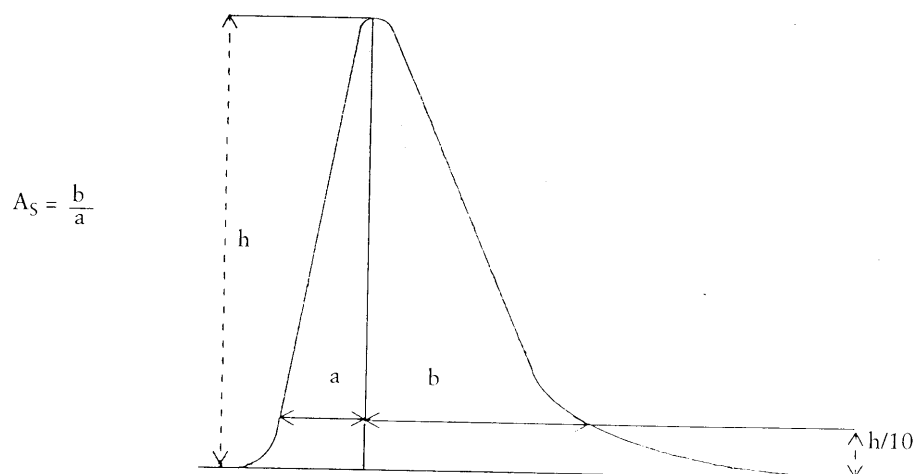
c_i je koncentrácia (g/50ml) referenčného roztoku (3.10.) hydrochinónu, monometyléteri hydrochinónu, monoetyléteri hydrochinónu alebo monobenzyléteri hydrochinónu.

Overí sa, či chromatogramy získané pre roztok štandardu a roztok vzorky spĺňajú požiadavku, že rozlíšenie pík najhoršie oddeleného páru musí byť aspoň 0,9. (vymedzenie pík, obr. č. 1.)



Obr. č. 1: rozlíšenie píkov

Ak sa nedosiahne požadované oddelenie píkov, použije sa účinnejšia kolóna alebo sa upraví zloženie mobilnej fázy až dotedy, kým sa nesplní požiadavka, že koeficient asymetrie A_S všetkých získaných píkov sa musí pohybovať medzi 0,9 až 1,5. (vymedzenie koeficienta asymetrie, obr. č. 2). Na zaznamenanie chromatogramu na stanovenie koeficientu asymetrie sa odporúča rýchlosť zapisovača aspoň 2 cm/minútu.



Obr. č. 2: koeficient asymetrie píku

Musí sa získať vyrovnaná základná čiara (base line).

6. VÝPOČET

Na výpočet koncentrácie analytu (analytov) vo vzorke sa použijú plochy píkov analytov. Koncentrácia analytov vo vzorke sa vypočíta ako hmotnostné percento (x_i) s pomocou vzorca

$$x_i \% (\text{hmot.}) = \frac{b_i \cdot 100}{RF_i \cdot a},$$

kde

a je hmotnosť vzorky v gramoch

b_i je plocha píku analytu i vo vzorke.

7. OPAKOVATEĽNOSŤ ²⁾

- 7.1. Pri obsahu hydrochinónu 2,0 % nesmie rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelne uskutočnených stanovení na tej istej vzorke presiahnuť v absolútnej hodnote 0,13 %.
- 7.2. Pri obsahu monometyléteri hydrochinónu 1,0 % nesmie rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelne uskutočnených stanovení na tej istej vzorke presiahnuť v absolútnej hodnote 0,1 %.
- 7.3. Pri obsahu monoetyléteri hydrochinónu 1,0 % nesmie rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelne uskutočnených stanovení na tej istej vzorke presiahnuť v absolútnej hodnote 0,11 %.
- 7.4. Pri obsahu monobenzyléteri hydrochinónu 1,0 % nesmie rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelne uskutočnených stanovení na tej istej vzorke presiahnuť v absolútnej hodnote 0,11 %.

8. REPRODUKOVATEĽNOSŤ ²⁾

- 8.1. Pri obsahu hydrochinónu 2,0 % nesmie rozdiel medzi výsledkami dvoch stanovení uskutočnených s tou istou vzorkou za rozdielnych podmienok (rôzne laboratória, rôzni pracovníci, rozdielne prístroje a/alebo rozdielny čas) presiahnuť v absolútnej hodnote 0,37 %.
- 8.2. Pri obsahu monometyléteri hydrochinónu 1,0 % nesmie rozdiel medzi výsledkami dvoch stanovení uskutočnených s tou istou vzorkou za rozdielnych podmienok (rôzne laboratória, rôzni pracovníci, rozdielne prístroje a/alebo rozdielny čas) presiahnuť v absolútnej hodnote 0,21 %.
- 8.3. Pri obsahu monoetyléteri hydrochinónu 1,0 % nesmie rozdiel medzi výsledkami dvoch stanovení uskutočnených s tou istou vzorkou za rozdielnych podmienok (rôzne laboratória, rôzni pracovníci, rozdielne prístroje a/alebo rozdielny čas) presiahnuť v absolútnej hodnote 0,19 %.
- 8.4. Pri obsahu monobenzyléteri hydrochinónu 1,0 % nesmie rozdiel medzi výsledkami dvoch stanovení uskutočnených s tou istou vzorkou za rozdielnych podmienok (rôzne laboratória, rôzni pracovníci, rozdielne prístroje a/alebo rozdielny čas) presiahnuť v absolútnej hodnote 0,11 %.

9. POZNÁMKY

- 9.1. Ak sa zistí, že obsah hydrochinónu je podstatne vyšší ako 2 % a vyžaduje sa presné predbežné ohodnotenie jeho obsahu, extrakt vzorky (5.1.) sa zriedi na koncentráciu blízku koncentrácii, ktorá zodpovedá vzorke obsahujúcej 2 % hydrochinónu a stanovenie sa zopakuje. (Na niektorých prístrojoch môže byť pri vyšších koncentráciách hydrochinónu absorbanca mimo lineárnej oblasti detektora.)
- 9.2. Interferencie
Opísaná metóda umožňuje stanovenie hydrochinónu a jeho éterov v jednoduchom izokratickom prevedení. Použitie fenylovej kolóny zabezpečuje dostatočnú retenciu hydrochinónu, ktorá nemôže byť zaručená pri použití C18 kolóny a opísanej mobilnej fázy. Táto metóda je citlivá na rušiacu prímiesť mnohých parabénov. V takýchto prípadoch by sa stanovenie malo zopakovať s použitím sústavy inej mobilnej fázy a stacionárnej fázy. Vhodné metódy sa dajú nájsť v odkazoch 1 a 2, najmä

Kolóna Zorbax ODS, 4,6 mm × 25 mm alebo jej ekvivalent
Teplota 36 °C
Prietoková rýchlosť 1,5 ml/min
Mobilná fáza
Pre hydrochinón metanol/voda 5/95 (obj. diely)
Pre monometyléter hydrochinónu: metanol/voda 30/70 (obj. diely)
Pre monobenzyléter hydrochinónu: metanol/voda 80/20 (obj. diely)⁷⁾.

Kolóna Spherisorb S5-ODS alebo jej ekvivalent
Mobilná fáza voda/metanol 90/10 (obj. diely)
Prietoková rýchlosť 1,5 ml/min.
Tieto podmienky sú vhodné pre hydrochinón⁸⁾.

⁷⁾ M. Herpol-Borremans a M.-O. Masse: Identification et dosage de l'hydroquinone et de ses éthers méthylique et benzylique dans le produits cosmétiques pour blanchir la peau. (Identifikácia a stanovenie hydrochinónu a jeho metyl-a benzyléteri v kozmetických výrobkov na zosvetľovanie pleti) *Int. J. Cosmet. Sci.* 8, 203-214 (1986).

⁸⁾ J. Firth and Rix, Determination of hidroquinone in skin toning creams, *analyst* (1986), 111, p. 129.

38. DÔKAZ A STANOVENIE OBSAHU
2-FENOXYETANOLU, 1-FENOXYPROPÁN-2-OLU,
METYL 4-HYDROXYBENZOÁTU, ETYL 4-HYDROXYBENZOÁTU,
PROPYL 4-HYDROXYBENZOÁTU, BUTYL 4-HYDROXYBENZOÁTU
A BENZYL 4-HYDROXYBENZOÁTU
(Podľa smernice Komisie 96/45/ES z 2. júla 1996)

A. DÔKAZ

1. ROZSAH A OBLASŤ PÔSOBNOSTI

Táto metóda určuje postup chromatografie na tenkej vrstve (TLC), ktorý v spojení s metódou stanovenia obsahu popísanou v časti (B.), umožňuje zistiť prítomnosť 2-fenoxyetanolu, 1-fenoxypropán-2-olu, metyl 4-hydroxybenzoátu, etyl 4-hydroxybenzoátu, propyl 4-hydroxybenzoátu, butyl 4-hydroxybenzoátu a benzyl 4-hydroxybenzoátu v kozmetických výrobkoch.

2. PRINCÍP

Konzervačné látky sa extrahujú z okyslenej vzorky kozmetického výrobku acetónom. Acetónový roztok sa po filtrácii zmieša s vodou a v alkalickom prostredí sa mastné kyseliny vyzrážajú vo forme solí vápnika. Alkalická zmes acetónu s vodou sa extrahuje dietyléterom, čím sa odstránia lipofilické látky. Po okyslení sa konzervačné látky extrahujú dietyléterom. Alikvótna časť dietyléterového extraktu sa naniesie v podobe škvŕn na tenkovrstvovú platňu pokrytú silikagélom. Po vyvolaní platne sa získaný chromatogram pozoruje v ultrafialovom svetle a zviditeľní sa pomocou Millonovho činidla.

3. ČINIDLÁ

3.1. Všeobecne

Všetky činidlá musia mať analytickú čistotu. Voda musí byť destilovaná, alebo musí mať aspoň rovnakú čistotu,

3.2. Acetón,

3.3. Dietyléter,

3.4. n-pentán,

3.5. Metanol ,

3.6. Kyselina octová, ľadová,

3.7. Roztok kyseliny chlorovodíkovej $c(\text{HCL}) = 4 \text{ mol/l}$,

3.8. Roztok hydroxidu draselného $c(\text{KOH}) = 4 \text{ mol/l}$,

3.9. Dihydrát chloridu vápenatého ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$),

3.10. Detekčné činidlo: Millonovo činidlo,

Millonovo činidlo (dusičnan ortuťnatý) je priemyselne vyrábaný komerčne dostupný roztok (Fluka 69820),

3.11. 2-fenoxyetanol,

3.12. 1-fenoxypropán-2-ol,

3.13. Metyl 4-hydroxybenzoát (metylparabén),

3.14. Etyl 4-hydroxybenzoát (etylparabén),

3.15. n-propyl 4-hydroxybenzoát (propylparabén),

3.16. n-butyl 4-hydroxybenzoát (butylparabén),

3.17. Benzyl 4-hydroxybenzoát (benzylparabén),

3.18. Referenčné roztoky

Pripravujú sa 0,1 % (m/v) roztoky každej z referenčných látok 3.11., 3.12., 3.13., 3.14., 3.15., 3.16. a 3.17. v metanole.

- 3.19. Vyvíjacie rozpúšťadlo,
Zmieša sa 88 objemových dielov n-pentánu (3.4.) s 12 objemovými dielmi ľadovej kyseliny octovej (3.6.).

4. PRÍSTROJE

- Normálne laboratórne vybavenie,
- 4.1. Vodný kúpeľ schopný udržiavať teplotu 60 °C,
- 4.2. Vyvíjacia nádoba (nevystlaná filtračným papierom),
- 4.3. Zdroj ultrafialového svetla, 254 nm,
- 4.4. Tenkovrstvové platne, 20 cm x 20 cm, vopred pokryté 0,25 mm hrubou vrstvou silikagelu 60F₂₅₄, s koncentračnou zónou (Merck č. 11798, Darmstadt alebo ekvivalentnou),
- 4.5. Piecka schopná udržiavať teplotu až 105 °C,
- 4.6. Horúcovzdušný sušič vlasov ,
- 4.7. Vlnený maliarsky valec dlhý približne 10 cm, vonkajší priemer približne 3,5 cm. Hrúbka vlnenej vrstvy musí byť 2 až 3 mm. Ak treba, vlna sa zastrihne.
Vid' poznámka 5.2.,
- 4.8. Sklené skúmavky s objemom 50 ml a so skrutkovacím uzáverom,
- 4.9. Elektrická výhrevná platňa s termostatickým regulátorom teploty. Nastavenie teploty: asi 80 °C. Horúca platňa musí byť zakrytá hliníkovou platňou s rozmermi 20 cm x 20 cm a hrúbkou asi 6 mm, vďaka ktorej sa získa rovnomerné rozloženie tepla.

5. POSTUP

5.1. *Príprava vzorky*

Odváži sa približne 1 g vzorky v 50 ml skúmavke so skrutkovacím uzáverom (4.8.). Pridajú sa štyri kvapky roztoku kyseliny chlorovodíkovej (3.7.) a 40 ml acetónu. V prípade silne zásaditých kozmetických výrobkov, ako je toaletné mydlo, je potrebné pridať 20 kvapiek roztoku kyseliny chlorovodíkovej. Skúmavka sa uzavrie, zmes sa pomaly ohreje približne na 60 °C, čím sa uľahčí extrakcia konzervačných látok do acetónovej fázy a minútu sa silno trasie. Zmeria sa pH roztoku lakmusovým papierikom a pomocou roztoku kyseliny chlorovodíkovej sa pH roztoku upraví na hodnotu ≤ 3 . Znova sa minútu silno trasie. Roztok sa ochladí na laboratórnu teplotu a prefiltruje sa cez filtračný papier do kužeľovej banky. 20 ml filtrátu sa prenesie do 200 ml kužeľovej banky, pridá sa 60 ml vody a premieša sa. Pomocou hydroxidu draselného (3.8.) sa pH upraví približne na hodnotu 10 a použije sa pritom lakmusový papierik. Pridá sa 1 g dihydrátu chloridu vápenatého (3.9.) a silno sa potrasie. Roztok sa prefiltruje cez filtračný papier do 250 ml separačného lievika, ktorý obsahuje 75 ml dietyléteru a minútu sa silno trasie. Počká sa, kým sa fázy oddelia a odoberie sa vodná vrstva do 200 ml kužeľovej banky. Pomocou roztoku kyseliny chlorovodíkovej sa pH roztoku upraví približne na hodnotu 2 a použije sa pritom lakmusový papierik. Potom sa pridá 10 ml dietyléteru a minútu sa silno trasie. Počká sa, kým sa fázy oddelia a približne 2 ml z dietyléterovej vrstvy sa prenesú do vzorkovnice s objemom 5 ml.

5.2. *Chromatografia v tenkej vrstve (TLC)*

TLC platňa (4.4.) sa položí na ohriatu hliníkovú platňu (4.9.). 10 μ l z každého z referenčných roztokov (3.18.) a 100 μ l roztoku (roztokov) vzorky (5.1.) sa aplikuje na štartovú čiaru v koncentračnej zóne TLC platne. Ak sa to vyžaduje, je možné kvôli uľahčeniu odparovania rozpúšťadla použiť prúd vzduchu. TLC platňa sa zloží z ohrievacej platne a nechá sa vychladnúť na laboratórnu teplotu. 100 ml

vyvolávacieho rozpúšťadla (3.19.) prenesie do vyvíjacej komory (4.2.). TLC platňa sa rýchlo vloží do nenasýtenej komory a vyvíja sa pri laboratórnej teplote dovtedy, kým čelo rozpúšťadla nedosiahne vzdialenosť asi 15 cm od štartovej čiary. Platňa sa vyberie z vyvíjacej komory a vysuší sa v prúde horúceho vzduchu pomocou horúcovzdušného sušiča na vlasy. Platňa sa preskúma v ultrafialovom svetle (4.3.) a vyznačí sa poloha škvŕn. Platňa sa zohrieva 30 minút v piecke (4.5.) pri teplote 100 °C, čím sa odstráni nadbytočná kyselina octová. Konzervačné látky sa vizualizujú na chromatograme pomocou Millonovho činidla (3.10.) tak, že sa do činidla ponorí maliarsky valec (4.7.) a prechádza sa ním po TLC platni, kým sa rovnomerne nenavlhčí.

Škvŕny je možné alternatívne vizualizovať opatrným kvapnutím jednej kvapky Millonovho činidla na každú zo škvŕn vyznačenú v ultrafialovom svetle.

Estery kyseliny 4-hydroxybenzoovej sa objavajú ako červené škvŕny, 2-fenoxyetanol a 1-fenoxypropán-2-ol ako žlté škvŕny. Je potrebné poznamenať, že samotná kyselina 4-hydroxybenzoová, ktorá môže byť prítomná vo vzorkách ako konzervačná látka alebo ako produkt rozkladu parabénov, sa tiež môže javiť ako červená škvŕna. Vid' 7.3 a 7.4.

6. DÔKAZ

Pre každú škvŕnu sa vypočíta hodnota R_f . Škvŕny získané z roztoku vzorky sa porovnávajú so škvŕnami získanými z referenčných roztokov vzhľadom na ich hodnoty R_f , ich správanie v ultrafialovom žiarení a farbu po vizualizácii. Sformulujú sa predbežné závery o identite konzervačných látok. Ak sa ukáže, že v roztoku sú prítomné parabény, mal by sa vykonať postup HPLC popísaný v časti (B.). Kvôli potvrdeniu prítomnosti 2-fenoxyetanolu, 1-fenoxypropán-2-olu a parabénov sa výsledky metódy chromatografie v tenkej vrstve (TLC) a metódy vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (HPLC) skombinujú.

7. POZNÁMKY

- 7.1. V dôsledku toxicity Millonovho činidla je najlepšie aplikovať toto činidlo jedným z opísaných postupov. Neodporúča sa rozprašovať ho.
- 7.2. Aj iné zlúčeniny obsahujúce hydroxylové skupiny môžu pri reakcii s Millonovým činidlom dávať farebnú reakciu. Tabuľku farieb a hodnôt R_f získaných TLC postupom pre niektoré konzervačné látky je možné nájsť v publikácii: N. de Kruijf, M. A. H. Rijk, L. A. Pranato-Soetardhi a A. Schouten (1987): Stanovenie obsahu konzervačných látok v kozmetických výrobkoch I: Postup chromatografie v tenkej vrstve pre potreby zistenia prítomnosti konzervačných látok (*J. Chromatography* 410, 395 - 411).
- 7.3. Hodnoty R_f uvedené v nasledujúcej tabuľke slúžia ako indikácia hodnôt, ktoré je možné získať

Zlúčenina	hR_f	Farba
Kyselina 4-hydroxybenzoová	11	červená
Metylparabén	12	červená
Etylparabén	17	červená
Propylparabén	21	červená
Butylparabén	26	červená
Benzylparabén	16	červená
2-fenoxyetanol	29	žltá
1-fenoxypropán-2-ol	50	žltá

- 7.4. Medzi kyselinou 4-hydroxybenzoovou a metylparabénom alebo medzi benzylparabénom a etylparabénom nepríde k separácii. Prítomnosť týchto zlúčením by sa mala potvrdiť pomocou metódy HPLC popísanej v časti (B.) a porovnaním retenčných časov vzorky s retenčnými časmi štandardných roztokov.

B. STANOVENIE

1. ROZSAH A OBLASŤ PÔSOBNOSTI

Táto metóda určuje postup stanovenia 2-fenoxyetanolu, 1-fenoxypropan-2-olu, metyl 4-hydroxybenzoátu, etyl 4-hydroxybenzoátu, propyl 4-hydroxybenzoátu, butyl 4-hydroxybenzoátu a benzyl 4-hydroxybenzoátu v kozmetických výrobkoch.

2. DEFINÍCIA

Množstvá konzervačných látok stanovené touto metódou sú vyjadrené v hmotnostných percentách.

3. PRINCÍP

Vzorka sa okyslí pridaním kyseliny sírovej a potom sa rozptýli v zmesi etanolu a vody. Po pomalom ohriatí tejto zmesi na teplotu, pri ktorej sa roztopí fáza lipidov, čím sa podporí kvantitatívna extrakcia, sa zmes prefiltruje.

Množstvo konzervačných látok vo filtráte sa stanoví metódou HPLC s obrátenou fázou, pričom ako vnútorný štandard sa použije izopropyl 4-hydroxybenzoát.

4. ČINIDLÁ

4.1. Všeobecne

Všetky činidlá musia mať analytickú čistotu a podľa potreby musia byť vhodné pre metódu HPLC; voda musí byť destilovaná, alebo musí mať aspoň rovnakú čistotu,

4.2. Etanol, absolútny,

4.3. 2-fenoxyetanol,

4.4. 1-fenoxypropan-2-ol,

4.5. Metyl 4-hydroxybenzoát (metylparabén),

4.6. Etyl 4-hydroxybenzoát (etylparabén),

4.7. n-propyl 4-hydroxybenzoát (propylparabén),

4.8. Izopropyl-4-hydroxybenzoát (izopropylparabén),

4.9. n-butyl 4-hydroxybenzoát (butylparabén),

4.10. Benzyl 4-hydroxybenzoát (benzylparabén),

4.11. Tetrahydrofurán,

4.12. Metanol,

4.13. Acetonitril,

4.14. Roztok kyseliny sírovej $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 2 \text{ mol/l}$,

4.15. Zmes etanolu a vody

Zmieša sa 9 objemových dielov etanolu (4.2.) a 1 objemový diel vody.

4.16. Vnútorný štandardný roztok

Presne sa odváži približne 0,25 g izopropylparabénu (4.8.), preniesie sa do 500 ml odmernej banky, rozpustí sa a doplní do plného objemu zmesou etanolu a vody (4.15.).

4.17. Mobilná fáza: zmes tetrahydrofuránu, vody, metanolu a acetonitrilu

Zmieša sa 5 objemových dielov tetrahydrofuránu, 60 objemových dielov vody, 10 objemových dielov metanolu a 25 objemových dielov acetonitrilu.

- 4.18. Zásobný roztok konzervačnej látky
Presne sa odváži približne 0,2 g 2-fenoxyetanolu, 0,2 g 1-fenoxypropán-2-olu, 0,05 g metylparabénu, 0,05 g etylparabénu, 0,05 g propylparabénu, 0,05 g butylparabénu a 0,025 g benzylparabénu v 100 ml odmernej banke, rozpustí sa a doplní sa po značku zmesou etanolu a vody.
Roztok uložený v chladničke zostane stabilný jeden týždeň.
- 4.19. Štandardné roztoky konzervačných látok
Do 50 ml odmerných baniek sa postupne preniesie 20,00 ml, 10,00 ml, 5,00 ml, 2,00 ml a 1,00 ml zásobného roztoku (4.18.). Do každej odmerky sa pridá 10,00 ml vnútorného štandardného roztoku (4.16.) a 1,0 ml roztoku kyseliny sírovej (4.14.) a doplní sa po značku zmesou etanolu a vody. Tieto roztoky by mali byť čerstvo pripravené.
5. PRÍSTROJE
Normálne laboratórne vybavenie,
- 5.1. Vodný kúpeľ schopný udržiavať teplotu $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$,
- 5.2. Výkonný kvapalinový chromatograf s UV detektorom, vlnová dĺžka 280 nm,
- 5.3. Analytická kolóna
Nerezová oceľ, 25 cm x vnútorný priemer 4,6 mm (alebo 12,5 cm x vnútorný priemer 4,6 mm) plnená Nucleosilom 5C18 alebo ekvivalentnou látkou (viď 10.1),
- 5.4. 100 ml sklené skúmavky so skrutkovacím uzáverom,
- 5.5. Varné kamienky, karborundum, veľkosť 2 až 4 mm, alebo ekvivalentné.
6. POSTUP
- 6.1. *Príprava vzorky*
- 6.1.1. *Príprava vzorky bez pridania vnútorného štandardného roztoku*
Odváži sa približne 1,0 g vzorky v 100 ml skúmavke so skrutkovacím uzáverom. Pipetou sa preniesie do skúmavky 1,0 ml roztoku kyseliny sírovej (4.14.) a 50,0 ml zmesi etanolu a vody (4.15.). Pridá sa približne 1 g varných kamienkov (5.5.), skúmavka sa uzavrie a silno sa trasie dovtedy, kým sa nezíska homogénna suspenzia. Trasie sa najmenej minútu. Kvôli uľahčeniu extrakcie konzervačných látok do etanolovej fázy sa vloží skúmavka asi na päť minút do vodného kúpeľa (5.1.) udržiavaného na teplote $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.
Skúmavka sa rýchlo ochladí prúdom studenej vody a extrakt sa uloží na hodinu do chladničky. Extrakt sa prefiltruje cez filtračný papier. Približne 2 ml filtrátu sa preniesie do vzorkovnice s objemom 5 ml. Extrakt sa uloží do chladničky a do 24 hodín sa stanoví obsah metódou HPLC.
- 6.1.2. *Príprava vzorky s pridaním vnútorného štandardu*
S presnosťou na tri desatinné miesta sa odváži $1,0\text{ g} \pm 0,1\text{ g}$ vzorky v 100 ml skúmavke so skrutkovacím uzáverom.
Do skúmavky sa pipetou preniesie 1,0 ml roztoku kyseliny sírovej a 40,0 ml zmesi etanolu a vody. Pridá sa približne 1 g varných kamienkov (5.5) a presne 10,00 ml roztoku vnútorného štandardu. Skúmavka sa uzavrie a silno trasie dovtedy, kým sa nezíska homogénna suspenzia. Trasie sa najmenej minútu. Kvôli uľahčeniu extrakcie konzervačných látok do etanolovej fázy sa skúmavka vloží asi na päť minút do vodného kúpeľa udržiavaného na teplote $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.
Skúmavka sa rýchlo ochladí prúdom studenej vody z vodovodu a extrakt sa uloží na hodinu do chladničky. Extrakt sa prefiltruje cez filtračný papier.

Približne 2 ml filtrátu sa preniesie do vzorkovnice s objemom 5 ml (testovací roztok). Extrakt sa uloží do chladničky a do 24 hodín sa stanoví obsah metódou HPLC.

6.2. *Vysokoučinná kvapalinová chromatografia (HPLC)*

6.2.1. *Chromatografické podmienky*

Mobilná fáza: zmes tetrahydrofuránu, vody, metanolu a acetonitrilu (4.17)

Prietok: 1,5 ml/minútu

Detekčná vlnová dĺžka: 280 nm

6.2.2. *Kalibrácia*

Nadávkuje sa 10 µl každého zo štandardných roztokov konzervačných látok (4.19.). Zo získaných chromatogramov sa stanoví pomery výšok píkovo štandardných roztokov konzervačných látok k výške píku vnútorného štandardu. Zostrojí sa krivka každej konzervačnej látky vyjadrujúca vzťah medzi týmito pomermi a koncentraciami štandardných roztokov.

6.2.3. *Stanovenie*

Do chromatografu sa nadávkuje 10 µl roztoku vzorky bez vnútorného štandardu (6.1.1.) a vyhotoví sa chromatogram.

Nadávkuje sa 10 µl jedného zo štandardných roztokov konzervačných látok (4.19.) a vyhotoví sa chromatogram. Získané chromatogramy sa porovnávajú.

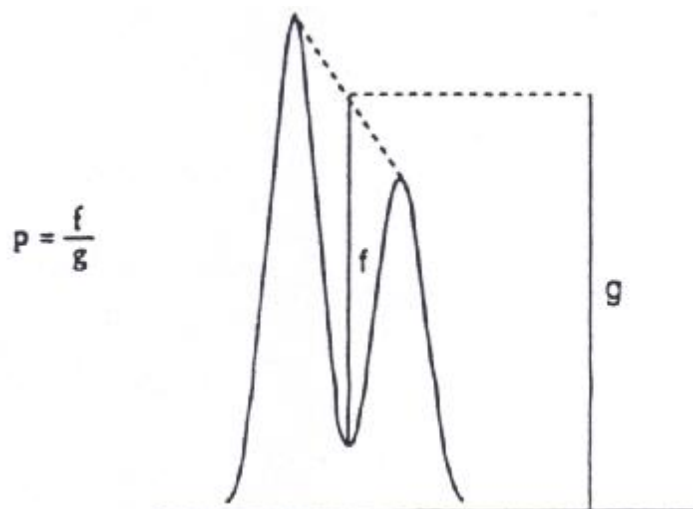
Ak sa na chromatograme extraktu vzorky (6.1.1.) nenachádza žiadny pík s približne rovnakým retenčným časom aký má izopropylparabén (odporúčaný vnútorný štandard), pokračuje sa a vstrekuje sa 10 µl roztoku vzorky s vnútorným štandardom (6.1.2.). Vyhotoví sa chromatogram a odmerajú výšky píkovo.

Ak sa na chromatograme roztoku vzorky pozoruje rušivý pík s približne rovnakým retenčným časom aký má izopropylparabén, mal by sa vybrať iný vnútorný štandard.

Ak jedna zo skúmaných konzervačných látok nie je v chromatograme vzorky prítomná, táto konzervačná látka sa môže použiť ako alternatívny vnútorný štandard. Vypočítajú sa pomery výšok píkovo stanovovaných konzervačných látok k výške píku vnútorného štandardu.

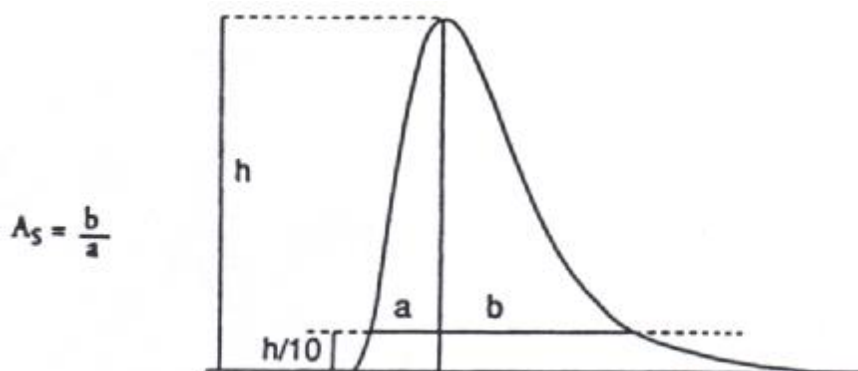
Je potrebné presvedčiť sa, že pre štandardné roztoky použité počas postupu kalibrácie je odozva lineárna.

Je potrebné presvedčiť sa, či chromatogramy získané pre niektorý štandardný roztok a roztok vzorky spĺňajú tieto požiadavky
separácia píkovo najhoršie separovanej dvojice musí byť najmenej 0,90. (Definícia separácie píkovo je znázornená na Obrázku č.1.



Obrázok č. 1: Separácia pík

Ak požadovaná separácia nebola dosiahnutá, použije sa citlivejšia kolóna alebo by sa malo upravovať zloženie mobilnej fázy dovedy, kým sa táto požiadavka nesplní. Hodnota faktora asymetrie všetkých získaných pík A_s by mala byť v rozsahu od 0,9 do 1,5. (Definícia faktora asymetrie píku je znázornená na Obrázku č. 2). Kvôli vyhotoveniu chromatogramu potrebného na určenie hodnoty faktora asymetrie sa odporúča nastaviť rýchlosť posuvu záznamového papiera najmenej na 2 cm/minútu.



Obrázok č. 2: Faktor asymetrie píku

Musí sa dosiahnuť stabilná základňa.

7. VÝPOČET

Na výpočet koncentrácie konzervačných látok v roztoku vzorky sa použije kalibračná krivka (6.2.2.) a pomery výšok pík stanovovaných konzervačných látok k výške píku vnútorného štandardu. Obsah 2-fenoxyetanolu, 1-fenoxypropán-2-olu, metyl 4-hydroxybenzoátu, etyl 4-hydroxybenzoátu, propyl 4-hydroxybenzoátu, butyl 4-hydroxybenzoátu a benzyl 4-hydroxybenzoátu, w_i , sa vyjadří ako hmotnostné percentá (% m/m) pomocou vzorca

$$\% = \frac{b_i}{200 \times a}$$

kde

b_i je koncentrácia ($\mu\text{g/ml}$) i -tej konzervačnej látky v testovacom roztoku odčítaná z kalibračnej krivky;

a je hmotnosť (g) testovacieho roztoku.

8. OPAKOVATEĽNOSŤ ²⁾

Vid' poznámky, 10.5.

9. REPRODUKOVATEĽNOSŤ ²⁾

Vid' poznámky, 10.5.

10. POZNÁMKY

10.1. *Stacionárna fáza*

Retenčné správanie sa roztokov pri stanovovaní obsahu metódou HPLC je silne závislé od typu, značky a histórie stacionárnej fázy. Záver o tom, či je možné použiť niektorú kolónu na separáciu stanovovaných konzervačných látok, možno urobiť na základe výsledkov získaných pre štandardné roztoky (vid' poznámky v 6.2.3). Ukázalo sa, že okrem navrhovaných plniacich materiálov sú vhodné aj Hypersil ODS a Zorbax ODS. Kvôli dosiahnutiu požadovanej separácie je alternatívne možné optimalizovať odporúčané zloženie mobilnej fázy.

10.2. *Detekčná vlnová dĺžka*

Test robustnosti popísanej metódy ukázal, že i veľmi malá zmena detekčnej vlnovej dĺžky môže mať významný vplyv na výsledky stanovenia obsahu. Preto sa tento parameter musí v priebehu analýzy starostlivo kontrolovať.

10.3. *Interferencie*

Aj mnohé iné zlúčeniny, ako sú konzervačné látky a kozmetické prísady, sa v podmienkach popísaných v tejto metóde tiež eluujú. Retenčné časy veľkého počtu konzervačných látok sú uvedené v publikácii: N. de Kruijf, M. A. H. Rijk, L. A. Pranato-Soetardhi a A. Schouten (1989): Stanovenie obsahu konzervačných látok v kozmetických výrobkoch II: Zistenie prítomnosti výkonnou kvapalinovou chromatografiou (*J. Chromatography* 469, 317-398).

10.4. Na ochranu analytickej kolóny je možné použiť vhodnú predkolónu.

10.5. Táto metóda bola preskúšaná formou spoločne vykonávaných experimentálnych skúšok, na ktorých sa zúčastnilo deväť laboratórií. Boli analyzované tri vzorky. V nasledujúcej tabuľke sú pre každú z troch vzoriek uvedené zistené hodnoty koncentrácie v % (hmot.) (m), opakovateľnosti (r), reprodukovateľnosti (R) pre tie analyzované látky, ktoré tieto vzorky obsahovali

Vzorka		2-fenoxy- etanol	1-fenoxy- propán-2- ol	Metyl- parabén	Etyl- parabén	Propyl- parabén	Butyl- parabén	Benzyl- parabén
Vitamínový krém	m	1,124		0,250	0,0628	0,031	0,0906	
	r	0,016		0,018	0,0035	0,0028	0,0044	
	R	0,176		0,030	0,0068	0,0111	0,0034	
Čistiaci krém	m	1,196		0,266	0,076			
	r	0,040		0,003	0,002			
	R	0,147		0,022	0,004			
Masážny krém	m		0,806			0,180	0,148	0,152
	r		0,067			0,034	0,013	0,015
	R		0,112			0,078	0,012	0,016