

107

ROZPORZĄDZENIE MINISTRA ZDROWIA¹⁾

z dnia 23 grudnia 2002 r.

w sprawie określenia procedur pobierania próbek kosmetyków oraz procedur przeprowadzania badań laboratoryjnych

Na podstawie art. 13 ust. 3 ustawy z dnia 30 marca 2001 r. o kosmetykach (Dz. U. Nr 42, poz. 473) zarządza się, co następuje:

§ 1. Rozporządzenie określa:

- 1) procedury pobierania próbek kosmetyków;
- 2) procedury przeprowadzania badań laboratoryjnych.

§ 2. 1. W upoważnieniu do nieodpłatnego pobrania próbki kosmetyku organ Państwowej Inspekcji Sanitarnej wskazuje, że pobranie jest dokonywane:

- 1) w celu dokonania rutynowej kontroli lub
- 2) w związku z uzasadnionym podejrzeniem, że kosmetyk nie spełnia wymagań jakościowych deklarowanych przez producenta, lub
- 3) w związku z uzasadnionym podejrzeniem, że kosmetyk może szkodzić zdrowiu ludzi lub środowisku.

2. Próbkę pobiera się w ilościach niezbędnych do przeprowadzenia badań laboratoryjnych.

§ 3. 1. Pobranie próbki kosmetyku stwierdza się w protokole pobrania próbki, który zawiera:

- 1) pieczęć organu Państwowej Inspekcji Sanitarnej;
- 2) numer protokołu;
- 3) imię, nazwisko i stanowisko służbowe pobierającego próbkę oraz numer upoważnienia do przeprowadzenia kontroli sanitarnej;
- 4) datę i miejsce pobrania próbki;
- 5) warunki, w jakich kosmetyk był przechowywany;
- 6) opis sposobu pobrania i zabezpieczenia próbki;
- 7) imię i nazwisko lub nazwę (firmę) oraz adres lub siedzibę producenta;
- 8) nazwę, termin trwałości i numer serii kosmetyku, którego próbkę pobrano, jeżeli numer taki znajduje się na oznakowaniu opakowania jednostkowego;
- 9) cenę kosmetyku, którego próbkę pobrano;
- 10) określenie proponowanego zakresu badań laboratoryjnych;
- 11) własnoręczne podpisy pobierającego próbkę oraz producenta lub osoby przez niego upoważnionej.

¹⁾ Minister Zdrowia kieruje działem administracji rządowej — zdrowie, na podstawie § 1 ust. 2 rozporządzenia Prezesa Rady Ministrów z dnia 28 czerwca 2002 r. w sprawie szczegółowego zakresu działania Ministra Zdrowia (Dz. U. Nr 93, poz. 833).

2. Protokół sporządza się w dwóch egzemplarzach, z których jeden pozostawia się — za pokwitowaniem — kontrolowanemu producentowi, drugi pozostawia się w aktach z przeprowadzonej kontroli sanitarnej.

§ 4. Pobrane próbki powinny być do czasu badań laboratoryjnych przechowywane w sposób i w warunkach zabezpieczających kosmetyk przed zmianą jakości i jego cech charakterystycznych.

§ 5. 1. Organ Państwowej Inspekcji Sanitarnej, na wniosek producenta, pobiera dodatkową próbkę kosmetyku z tej samej partii i tej samej serii w ilości odpowiadającej próbce pobranej do badań laboratoryjnych. Przepisy § 3 i 4 stosuje się odpowiednio.

2. Dodatkowa próbka kosmetyku powinna być przechowywana przez kontrolowanego, z zachowaniem warunków uniemożliwiających zmianę jakości lub cech charakterystycznych kosmetyku, i do czasu ustalenia wyników badań laboratoryjnych nie może być wprowadzona do obrotu.

3. Organ Państwowej Inspekcji Sanitarnej powiadamia producenta o wynikach badań laboratoryjnych.

§ 6. 1. Badania laboratoryjne przeprowadza się, stosując metody analiz niezbędnych do kontroli kosmetyku określone w załącznikach nr 1 i 2 do rozporządzenia.

2. Dokumentację dotyczącą badań, o których mowa w ust. 1, prowadzi podmiot przeprowadzający badania w sposób określony w załączniku nr 1 do rozporządzenia.

3. Organ Państwowej Inspekcji Sanitarnej sporządza protokół przeprowadzonych badań, zawierający dane określone w § 3 ust. 1 pkt 1, 2, 5, 7 i 8, a ponadto:

- 1) datę i miejsce wykonania badania;
- 2) imię, nazwisko i stanowisko służbowe przeprowadzającego badania;
- 3) opis sposobu pobrania próbki laboratoryjnej i stosowanych metod badania;
- 4) ocenę prawidłowości oznakowania kosmetyku;
- 5) wyniki badania;
- 6) własnoręczny podpis przeprowadzającego badanie.

4. Do protokołu, o którym mowa w ust. 3, stosuje się odpowiednio § 3 ust. 2.

§ 7. Rozporządzenie wchodzi w życie po upływie 14 dni od dnia ogłoszenia.

Minister Zdrowia: *M. Łapiński*

Załączniki do rozporządzenia Ministra Zdrowia
z dnia 23 grudnia 2002 r. (poz. 107)

Załącznik nr 1

KRYTERIA CZYSTOŚCI CHEMICZNEJ I MIKROBIOLOGICZNEJ KOSMETYKÓW ORAZ METODY KONTROLI ZGODNOŚCI Z TYMI KRYTERIAMI

1. Opracowywanie nowego kosmetyku

1.1. Konserwowanie wyrobu

Zadaniem środków konserwujących (ŚK) jest ochrona konsumenta i zapobieganie zanieczyszczeniom mikrobiologicznym w czasie normalnego i możliwego do przewidzenia stosowania kosmetyku. ŚK nie powinny być stosowane zamiast utrzymania na właściwym poziomie higieny produkcji. Kontrola czystości mikrobiologicznej w czasie produkcji jest osiągana poprzez zrozumienie przyczyn występowania zanieczyszczeń i ich eliminowanie.

Należy podkreślić, że ŚK nie mogą być dobierane wyłącznie o dane teoretyczne, ale konieczne jest określenie *in situ* ich efektywności poprzez stosowanie testów kontrolowanego zanieczyszczenia mikrobiologicznego wyrobów w trakcie ich opracowywania.

1.2. Opracowywanie prawidłowych receptur

W miarę możliwości powinno się tworzyć receptury, w których zastosowane surowce nie wspomagają wzrostu drobnoustrojów, dzięki czemu można ograniczyć potrzebę dodawania ŚK. Jeśli jednak użycie ŚK jest konieczne, powinien on być wybrany na początku opracowywania wyrobu i traktowany jako integralna część receptury.

Woda jest podstawą wzrostu mikroorganizmów. Układ konserwujący powinien być tak dobrany, aby w fazie wodnej systemu wielofazowego uzyskać stężenie efektywne.

Układ konserwujący powinien być skuteczny dla szerokiego zakresu mikroorganizmów i bezpieczny w użytym stężeniu. Mieszaniny ŚK mogą być czasem bardziej efektywne niż pojedyncze składniki. Bardzo ważne są temperatura, światło i stabilność podczas przedłużonego okresu przechowywania. Układ konserwujący powinien być skuteczny przy niskim stężeniu i pH wyrobu oraz wykazywać zgodność z innymi składnikami receptury.

Zaprojektowane opakowanie powinno uniemożliwiać dostęp drobnoustrojów i wydzielania wody z produktu, co może ułatwić wzrost drobnoustrojów. Należy wziąć pod uwagę możliwość inaktywacji układu konserwującego przez składniki opakowania i dyfuzję przez opakowanie.

Użycie konserwantów jest szczególnie ważne przy zastosowaniu łatwo biodegradowalnych surowców w recepturach, ponieważ surowce takie są składnikami odżywczymi dla drobnoustrojów.

Każda zmiana składu chemicznego może wpłynąć na skuteczność ŚK. W takich przypadkach należy rozważyć przeprowadzenie dodatkowych testów.

Podczas produkcji niektórych kosmetyków może być konieczne przygotowywanie mieszanin wstępnych. Wstępne wodne mieszaniny powinny zawierać konserwanty i powinny być przechowywane przez określony czas i regularnie kontrolowane. Aby określić ich podatność na zanieczyszczenia mikrobiologiczne, powinny być poddane testom kontrolowanego zanieczyszczenia mikrobiologicznego.

1.3. Testy kontrolowanego zanieczyszczenia mikrobiologicznego

Jeżeli jest konieczne przeprowadzenie testu kontrolowanego zanieczyszczenia mikrobiologicznego, powinien być wykonany przez wykwalifikowaną osobę z użyciem kompletnej receptury wyrobu w opakowaniu handlowym, nawet jeśli prowadzone były wstępne badania tej receptury podczas opracowywania kosmetyku.

Zasadą jest wprowadzanie do wyrobu różnych mikroorganizmów: bakterii, drożdży, pleśni, wśród których mogą być użyte drobnoustroje chorobotwórcze lub powodujące zepsucie kosmetyku. W tak zanieczyszczonym produkcie badana jest przeżywalność mikroorganizmów w różnych okresach — tak długo, jak uważa się to za konieczne.

2. Surowce

Surowce mogą być źródłem zanieczyszczenia mikroorganizmami wyrobu gotowego. Celem producentów surowców powinno być zatem dostarczanie ich o niskim stopniu zanieczyszczeń i wolnych od szkodliwych drobnoustrojów.

Woda jest jednym z głównych surowców kosmetycznych i w określonych warunkach może być znacznie zanieczyszczona mikrobiologicznie, co może stwarzać zagrożenie dla trwałości gotowego wyrobu. Dlatego też stanowiącą składnik receptur wodę należy regularnie kontrolować i gdy to konieczne — odpowiednio przygotować.

3. Kontrola i ocena półproduktu oraz gotowego wyrobu

3.1. Przechowywanie partii kosmetyku przed zapakowaniem

Wyrób w „masie” jest bardziej podatny na zanieczyszczenia mikrobiologiczne niż w postaci gotowego wyrobu w opakowaniu.

3.2. Pobieranie próbek

Z partii wyrobu powinny być pobierane próbki w momencie właściwym dla aktywności mikrobiologicznej receptury, zgodnie z ocenami dokony-

mi w testach kontrolowanego zanieczyszczenia mikrobiologicznego i doświadczeniem produkcyjnym. Dla każdego nowego wyrobu należy określić częstotliwość badań w okresie początkowym, przynajmniej przez trzy miesiące, aby rozpoznać jakość mikrobiologiczną wyrobu w zwykłych warunkach produkcyjnych.

4. Dobra praktyka produkcyjna

Aby spełnić warunki Dobrej Praktyki Produkcyjnej, należy stosować Zalecenia Dobrej Praktyki w Produkcji Kosmetyków opracowanych przez stowarzyszenie COLIPA (THE EUROPEAN COSMETIC TOILETRY AND PERFUMERY ASSOCIATION).

5. Dokumentacja

Powinny być prowadzone odpowiednie zapisy odnośnie do wszystkich aspektów badań mikrobiologicznych w czasie opracowywania i produkcji każdego wyrobu oraz wszystkich procedur kontrolnych stosowanych w zakładzie produkcyjnym.

6. Zalecane wymagania czystości mikrobiologicznej i metody oceny gotowego wyrobu

6.1. Uwagi ogólne

Celem wszystkich producentów musi być zagwarantowanie bezpieczeństwa wyrobów w zwykłych i możliwych do przewidzenia warunkach stosowania.

Zanieczyszczenia mikrobiologiczne mogą okazać się szkodliwe dla konsumenta i powodować zepsucie wyrobu, dlatego należy je ograniczać poprzez:

- zachowanie higieny w zakładzie i procesie produkcyjnym,
- odpowiednie zakonserwowanie wyrobu zapobiegające wzrostowi drobnoustrojów,
- przestrzeganie granic czystości mikrobiologicznej w celu zapewnienia bezpieczeństwa wyrobu.

Podczas wykonywania pojedynczych badań producent musi pamiętać, że zanieczyszczające mikroorganizmy mogą być w fazie namnażania, statycznej lub zamierania. Użycie ŚK ma na celu niedopuszczenie do wzrostu drobnoustrojów. ŚK nie zastąpi dobra higieny w zakładzie produkcyjnym, trzeba również pamiętać, że użyte stężenie tych związków jest wypadkową między aktywnością przeciwdrobnoustrojową a bezpieczeństwem użytkownika. ŚK powinny być wybierane podczas opracowywania produktu, przy zastosowaniu testów kontrolowanego zanieczyszczenia mikrobiologicznego.

Opisana niżej metodyka powinna być traktowana jako zalecana, producenci zaś mogą stosować własne metody kontroli wewnętrznej zapewniające produkowanie wyrobów zgodnych z kryteriami zawartymi w niniejszym załączniku.

Specyfikacja mikrobiologiczna odnosi się do środków kosmetycznych w nienaruszonym, zamkniętym opakowaniu.

Wyniki badań powinny być zapisywane w raporcie, który powinien zawierać następujące informacje, dotyczące:

a) identyfikacji próbek:

- rodzaj wyrobu,
- nazwę handlową,
- nazwę producenta,
- numer partii,
- datę i miejsce pobrania próbki,
- metody identyfikacji i warunki przechowywania,

b) warunków badań:

- datę,
- metodę,
- podłoże neutralizujące,

c) wyników testów.

Raport powinien zawierać wniosek oraz dane osoby odpowiedzialnej za badania.

6.2. Wymagania mikrobiologiczne

6.2.1. Wymagania ilościowe (minimalna wielkość badanej próbki — 1 g lub 1 ml)

KATEGORIA I. Kosmetyki przeznaczone dla dzieci i w okolicie oczu

Ogólna liczba drobnoustrojów tlenowych mezofilnych nie może przekraczać 100 jtk/g lub ml (jtk — jednostki tworzące kolonie).

KATEGORIA II. Inne kosmetyki

Ogólna liczba drobnoustrojów tlenowych mezofilnych nie może przekraczać 1000 jtk/g lub ml.

Bardzo ważna jest interpretacja wyników. Opisane ograniczenia powinny być interpretowane następująco:

- 10^2 — maksymalny limit akceptacji to 5×10^2 ,
- 10^3 — maksymalny limit akceptacji to 5×10^3 .

6.2.2. Wymagania jakościowe

W 0,1 g lub 0,1 ml próbki kosmetyku nie mogą być obecne następujące drobnoustroje:

- *Pseudomonas aeruginosa*,
- *Staphylococcus aureus*,
- *Candida albicans*.

6.2.3. Kryteria akceptacji

Akceptowana jest jakość próbek, które spełniają wymagania jakościowe i ilościowe.

6.3. Metody badań mikrobiologicznych środków kosmetycznych

Określenie ogólnej liczby żywych drobnoustrojów tlenowych mezofilnych powinno być prowadzone według następujących zasad:

- należy zachować ostrożność i unikać zanieczyszczenia produktu drobnoustrojami, które mogą być wykryte w próbce,

- b) eliminacja każdej przeciwdrobnoustrojowej właściwości produktu w czasie analizy powinna być dokonana przez rozcieńczenie, zobojętnienie lub filtrację,
- c) określenie ogólnej liczby żywych drobnoustrojów tlenowych mezofilnych prowadzi się, stosując techniki wylewania płytek, techniki posiewów powierzchniowych lub filtracji. „Wzbogaczone” techniki nie są konieczne,
- d) identyfikacja określonych mikroorganizmów jest prowadzona przy użyciu selektywnych podłoży hodowlanych.

6.3.1. Materiały i odczynniki

- a) podłoża hodowlane i odczynniki,
- b) przygotowanie próbki.

Ocena mikrobiologiczna powinna być przeprowadzona na próbkach wielkości minimum 1 g lub 1 ml.

Dla produktów o wadze mniejszej niż 1 g należy połączyć kilka próbek w celu otrzymania 1 g lub 1 ml.

Należy rozcieńczyć lub rozpuścić 1 ml lub 1 g wyrobu w mianowanym rozcieńczalniku neutralizującym w celu otrzymania rozcieńczenia 1:10. W przypadku słabo wilgotniejących substancji można dodać odpowiedni związek powierzchniowo czynny, np. 0,1% (m/v) polisorbátu 80.

Jeżeli konieczne jest uzyskanie kolejnych dziesiętnych rozcieńczeń, należy użyć roztworu wyjściowego, stosując ten sam rozcieńczalnik, aby osłabić aktywność przeciwdrobnoustrojową produktu lub uzyskać liczbę kolonii od 10 do 100 w celu łatwego zliczenia.

6.3.2. Określenie całkowitej liczby tlenowych drobnoustrojów mezofilnych

- a) Filtracja przez błony

Należy stosować 2 błony filtracyjne o średnicy porów nie większej niż 0,45 μ i których efektywność w zatrzymywaniu bakterii została ustalona. Niżej opisana metoda zakłada stosowanie błon o średnicy ok. 50 mm:

- na każdą błonę przenieść ilość odpowiadającą 0,1 g badanego produktu i natychmiast przesączyć. W celu uzyskania równomiernego rozkładu drobnoustrojów na błonie, można ją przepłukać sterylnym roztworem płuczącym,
- przenieść błony na powierzchnię odpowiedniego podłoża agarowego, inkubować w 30—35°C przez 3 dni w przypadku bakterii, 20—25°C przez 5 dni w przypadku grzybów, chyba że bardziej wiarygodne zliczenia są osiągalne w krótszym czasie,
- policzyć liczbę wyhodowanych kolonii i przeliczyć liczbę mikroorganizmów na gram lub mililitr badanego wyrobu.

- b) Procedura liczenia płytek:

— stosując płytki Petriego o średnicy 9—10 cm, dodać do każdej płytki 1 ml próbki odpowiadają-

jącej 0,1 g wyrobu i ok. 15 ml odpowiedniego płynnego podłoża agarowego o temperaturze nie wyższej niż 45°C, wymieszać i pozostawić na chłodnej poziomej powierzchni do zastygnięcia,

- alternatywnie: rozprowadzić rozcieńczony wyrób (zwykle 0,1 ml na płytkę, co odpowiada 0,01 g wyrobu) na powierzchni stałego podłoża na płytce Petriego o średnicy j.w.,
- inkubować płytki jak w przypadku metody filtracyjnej,
- policzyć wyhodowane kolonie i przeliczyć wyniki, używając płytek z największą liczbą kolonii, lecz nie większą niż 300 kolonii dla bakterii i 100 kolonii dla grzybów.

- c) Przedstawienie wyników

Należy policzyć i zapisać liczbę jednostek tworzących kolonie (jtk) dla każdej płytki. Wyliczyć całkowitą liczbę jtk/płytkę i przemnożyć wynik przez rozcieńczenie w celu uzyskania ilości jtk/g lub jtk/ml wyrobu.

6.3.3. Wykrywanie określonych drobnoustrojów

Specyficzne drobnoustroje:

- a. *Pseudomonas aeruginosa*

Na podłożu z cetrymidem (pkt 7 — Roztwory i podłoża hodowlane) typowe kolonie *P. aeruginosa* są płaskie, przejrzyste, żółto-zielonkawe do niebieskich.

Należy przeprowadzić co najmniej następujące testy potwierdzające:

- barwienie metodą Gramma,
- test oksydazowy,
- test na ruchliwość,
- wzrost w 42°C.

P. aeruginosa jest Gram-ujemną pałeczką, ruchliwą, oksydazo-dodatnią i rośnie w temp. 42°C.

- b. *Staphylococcus aureus*

Na podłożu Baird-Parkera (pkt 7 — Roztwory i podłoża hodowlane) typowe kolonie *S. aureus* są czarne, błyszczące, wypukłe, otoczone przejrzystym obszarem, który może opalizować.

Należy przeprowadzić co najmniej następujące testy potwierdzające:

- barwienie metodą Gramma,
- test katalazowy,
- test koagulazowy.

Gram-dodatnie ziarniaki, katalazo- i koagulazo-dodatnie mogą być uważane za *S. aureus*.

- c. *Candida albicans*

Na podłożu Sabouard-dekstrozowym (pkt 7 — Roztwory i podłoża hodowlane) typowe kolonie *C. albicans* są białe do beżowych, kremowe, wypukłe.

Należy przeprowadzić co najmniej następujące testy potwierdzające:

- badanie mikroskopowe,
- test tworzenia nibystrzępek,
- tworzenie chlamidosporów.

Drożdże tworzące nibystrzępki i dające chlami-dospory mogą być uważane za *C. albicans*.

W każdym przypadku powinny być prowadzone inne odpowiednie testy, aby potwierdzić identyfikację.

Przedstawienie wyników:

Wyniki należy zapisać w raporcie z badań jako obecność lub nieobecność swoistych mikroorganizmów: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*.

7. Roztwory i podłoża hodowlane

Poniższe roztwory i podłoża hodowlane powinny być przeznaczone do stosowania zgodnie z przeznaczeniem, jednakże można stosować odpowiednie podłoża suche, pod warunkiem że mają one identyczne właściwości odżywcze i selektywne dla testowych drobnoustrojów.

7.1. Rozcieńczalnik

Buforowany roztwór chlorku sodu z peptonem o pH 7,0.

Dwuwodorofosforan potasu	3,56 g ☆ odpowiednik
Wodorofosforan sodu	7,23 g (0,067 M
Chlorek sodu	4,30 g
Pepton (mięśny lub kazeinowy)	1,0 g
Woda destylowana	1 000 ml

Wyjaławiać w autoklawie w 121°C przez 15 minut.

W razie konieczności można dodać odpowiednie czynniki zobojętniające, np. polisorbát 20 lub 80, lecytynę, tiosiarczan.

7.2. Podłoże do określania liczby bakterii

Agar z hydrolizatem kazeinowo-sojowym.

Trzustkowy hydrolizat kazeiny	15,0 g
Papainowy hydrolizat ziaren soi	5,0 g
Chlorek sodu	5,0 g
Agar	15,0 g
Woda destylowana	1 000 ml

Wyjaławiać 15 minut w autoklawie w temperaturze 121°C; pH po wyjałowieniu powinno wynosić 7,3±0,2.

7.3. Podłoże do określania liczby grzybów

Pożywka Sabouard-dekstrozowa.

Peptony (mięśny i kazeinowy)	10,0 g
Dekstroza jednowodna	40,0 g
Agar	15,0 g
Woda destylowana	1 000 ml

Wyjaławiać 15 minut w autoklawie w temperaturze 121°C, pH po wyjałowieniu powinno wynosić 5,6±0,2.

7.4. Podłoże do wykrywania *Pseudomonas aeruginosa*

Pożywka z cetrimidem.

Trzustkowy hydrolizat żelatyny	20,0 g
Chlorek magnezu	1,4 g
Siarczan potasu	10,0 g
Cetrimid	0,3 g
Agar	13,6 g
Glicerol	10,0 ml
Woda destylowana	1 000 ml

Wyjaławiać 15 minut w autoklawie w temperaturze 121°C; pH po wyjałowieniu powinno wynosić 7,2±0,2.

7.5. Podłoże do wykrywania *Staphylococcus aureus*

Pożywka Baird-Parkera.

Trzustkowy hydrolizat kazeiny	10,0 g
Wyciąg wołowy	5,0 g
Wyciąg drożdżowy	1,0 g
Chlorek litu	5,0 g
Agar	20,0 g
Glicyna	12,0 g
Pirogronian sodu	x10,0 g
Woda destylowana	950 ml

Po wyjałowieniu pH powinno wynosić 6,8±0,2. Wyjaławiać 15 minut w autoklawie w temperaturze 121°C, oziębic do 45—50°C i dodać sterylnego 1% roztworu telurytu potasu i 50 ml emulsji żółtka jaja kurzego.

7.6. Podłoże do wykrywania *Candida albicans*

Pożywka Sabouard-dekstrozowa.

Peptony (mięśny i kazeinowy)	10,0 g
Dekstroza jednowodna	40,0 g
Agar	15,0 g
Woda destylowana	1 000 ml

Wyjaławiać 15 minut w autoklawie w temperaturze 121°C; pH po wyjałowieniu powinno wynosić 5,6±0,2.

METODY ANALIZ NIEZBĘDNYCH DO KONTROLI KOSMETYKU

I. Identyfikowanie i oznaczanie wolnego formaldehydu

1. Cel i zakres

Metoda opisuje identyfikowanie i dwie zasady oznaczania zależne od obecności lub nieobecności w próbce donorów formaldehydu. Metoda może służyć do badania wszystkich kosmetyków.

1.1. Identyfikowanie

1.2. Ogólne oznaczanie metodą kolorymetryczną z pentan-2,4-dionem

Tę metodę stosuje się, jeżeli używany jest formaldehyd sam lub z innymi środkami konserwującymi, które nie są donorami formaldehydu. W innym przypadku, gdy wynik przewyższa maksymalne dozwolone stężenie, należy zastosować niższą metodę dla potwierdzenia wyniku.

1.3. Oznaczenie w obecności donorów formaldehydu

W metodzie wspomnianej powyżej (1.2.) podczas otrzymywania pochodnych, donory formaldehydu ulegają rozczepieniu i prowadzi to do zawyżonych wyników (związany i spolimeryzowany formaldehyd). Konieczne jest wydzielenie wolnego formaldehydu metodą chromatografii cieczowej.

2. Definicja

Zawartość wolnego formaldehydu w próbce oznaczona według tej metody jest wyrażona w procentach masowych.

3. Identyfikowanie formaldehydu

3.1. Zasada

Wolny i związany formaldehyd w środowisku kwasu siarkowego nadaje odczynnikowi Schiffa barwę różową lub fioletowo-różową

3.2. Odczynniki

Wszystkie odczynniki powinny być czystości analitycznej, woda musi być zdemineralizowana

3.2.1. Fuksyna

3.2.2. Siedmiowodny siarczan sodu

3.2.3. Stężony kwas solny ($d = 1,19$)

3.2.4. Kwas siarkowy, około 1 M

3.2.5. Odczynnik Schiffa:

100 mg fuksyny (3.2.1.) odważa się do zlewki i rozpuszcza w 75 ml wody w temperaturze 80°C. Po schłodzeniu dodaje się 2,5 g siarczynu sodu (3.2.2). Uzupełnia wodą do 100 ml.

Odczynnik można używać w ciągu dwóch tygodni.

3.3. Procedura

3.3.1. Zważyć 2 g próbki w 10 ml zlewce

3.3.2. Dodać dwie krople kwasu siarkowego (3.2.4) i 2 ml odczynnika Schiffa (3.2.5). Odczynnik ten podczas stosowania powinien być całkowicie

bezbarwny. Wytrząsnąć i pozostawić do odstania na pięć minut.

3.3.3. Jeśli barwa różowa lub fioletowo-różowa pojawia się w ciągu pięciu minut, oznacza to, że formaldehyd jest obecny w stężeniu powyżej 0,01% i powinno się go oznaczyć metodą oznaczania wolnego i związanego formaldehydu (4), i, jeśli konieczne, według opisu postępowania podanego w punkcie 5.

4. Ogólne oznaczanie kolorymetryczne z pentan-2,4-dionem

4.1. Zasada

Formaldehyd reaguje z pentan-2,4-dionem w obecności octanu amonu, tworząc 3,5-diacetylo-1,4-dihydrotoluidynę. Jest ona ekstrahowana butan-1-olem i mierzy się absorbancją ekstraktu przy 410 nm.

4.2. Odczynniki

Wszystkie odczynniki powinny być czystości analitycznej, woda musi być zdemineralizowana.

4.2.1. Bezwodny octan amonu

4.2.2. Stężony kwas octowy, $d_4^{20} = 1,05$

4.2.3. Pentan-2,4-dion świeżo destylowany pod zmniejszonym ciśnieniem 25 mm Hg, w 25°C — nie powinien wykazywać żadnej absorpcji przy 410 nm.

4.2.4. Butan-1-ol

4.2.5. Kwas solny, 1 M

4.2.6. Kwas solny, około 0,1 M

4.2.7. Wodorotlenek sodu, 1 M

4.2.8. Świeżo przygotowany roztwór skrobi (1 g/50 ml wody)

4.2.9. Formaldehyd 37 do 40% (m/v)

4.2.10. Standardowy roztwór jodu, 0,05 M

4.2.11. Standardowy roztwór tiosiarczynu sodu, 0,1 M

4.2.12. Odczynnik pentan-2,4-dionu

W 1 000 ml kolbie miarowej rozpuścić: 150 g octanu amonu (4.2.1.), 2 ml pentan-2,4-dionu (4.2.3.), 3 ml kwasu octowego (4.2.2.). Uzupełnić wodą do 1 000 ml (pH roztworu około 6,4). Odczynnik ten powinien być świeżo przygotowany.

4.2.13. Odczynnik (4.2.12.) bez pentan-2,4-dionu

4.2.14. Standardowy bazowy roztwór formaldehydu

Nalać 5 g formaldehydu (4.2.9.) do 1 000 ml kolby miarowej i uzupełnić do 1 000 ml wodą. Oznaczyć stężenie tego roztworu następująco: pobrać 10,00 ml, dodać 25,00 ml standardowego roztworu jodu (4.2.10.) i 10,00 ml wodorotlenku sodu (4.2.7.). Pozostawić do odstania na

- pięć minut. Zakwasić 11,00 ml HCl (4.2.5.) i oznaczyć nadmiar jodu przez miareczkowanie standardowym roztworem tiosiarczanu sodu (4.2.11.), używając roztworu skrobi (4.2.8.) jako wskaźnika. 1 ml 0,05 M zużytego jodu (4.2.10.) odpowiada 1,5 mg formaldehydu.
- 4.2.15. Standardowy rozcieńczony roztwór formaldehydu
- Rozcieńczyć standardowy bazowy roztwór formaldehydu wodą kolejno w stosunku 1/20 i następnie 1/100. 1 ml tego roztworu zawiera około 1 mg formaldehydu. Obliczyć dokładną zawartość.
- 4.3. Aparatura
- 4.3.1. Standardowe wyposażenie laboratoryjne
- 4.3.2. Sączek do rozdziału faz, bibuła Whatman (1PS lub równoważna)
- 4.3.3. Wirówka
- 4.3.4. Łaźnia wodna o temperaturze 60°C
- 4.3.5. Spektrofotometr
- 4.3.6. Szklane naczynka pomiarowe o długości drogi optycznej 1 cm
- 4.4. Opis postępowania
- 4.4.1. Roztwór próbki
- W 100 ml kolbie miarowej zważyć z dokładnością do 0,001 g ilość (w g) badanej próbki odpowiadającej spodziewanej zawartości formaldehydu około 150 µg. Uzupełnić wodą do 100 ml i wymieszać (roztwór S). (Sprawdzić, czy pH jest bliskie 6, jeśli nie — rozcieńczyć w roztworze kwasu solnego (4.2.6.)). Do 50 ml kolby stożkowej Erlenmayera dodawać: 10,00 ml roztworu S, 5,00 ml odczynnika pentan-2,4-dionu (4.2.12.), wodę zdemineralizowaną do końcowej objętości 30 ml.
- 4.4.2. Roztwór odniesienia
- Możliwa interferencja powodowana przez barwę tła w badanej próbce jest eliminowana przez użycie takiego roztworu odniesienia. Do 50 ml kolby stożkowej Erlenmayera dodawać: 10,00 ml roztworu S, 5,00 ml odczynnika (4.2.13.), wodę zdemineralizowaną do końcowej objętości 30 ml.
- 4.4.3. Ślepa próba
- Do 50 ml kolby stożkowej Erlenmayera dodawać: 5,00 ml roztworu odczynnika pentan-2,4-dionu (4.2.12.), wodę zdemineralizowaną do końcowej objętości 30 ml.
- 4.4.4. Oznaczanie
- 4.4.4.1. Wytrząsać mieszaniny z punktów 4.4.1., 4.4.2. i 4.4.3. Umieścić kolby stożkowe Erlenmayera w łaźni wodnej o temperaturze 60°C na dokładnie 10 minut. Pozostawić do schłodzenia na dwie minuty w łaźni wodnej z lodem.
- 4.4.4.2. Przenieść mieszaniny do 50 ml rozdzielaczy zawierających po 10 ml butan-1-olu (4.2.4.). Popłukać każdą kolbę 3 do 5 ml wody. Wytrząsać energicznie mieszaninę przez dokładnie 30 sekund. Pozostawić do rozdzielenia.
- 4.4.4.3. Przesączyć fazę butan-1-olu do naczynka pomiarowego (4.3.2.) przez sączek do rozdziału faz. Można również zastosować odwirowanie 3 000 obrotów w ciągu pięciu minut.
- 4.4.4.4. Zmierzyć absorbancję A_1 ekstraktu roztworu z 4.4.1. przy 410 nm w porównaniu z ekstraktem 4.4.2. jako roztworem odniesienia.
- 4.4.4.5. Podobnie zmierzyć absorbancję A_2 ekstraktu ślepej próby z punktu 4.4.3. w porównaniu z butan-1-olem jako roztworem odniesienia.
- Uwaga.* Wszystkie te czynności muszą być wykonane w ciągu 25 minut od chwili umieszczenia kolb stożkowych w łaźni wodnej o temperaturze 60°C.
- 4.4.5. Krzywa kalibracyjna
- 4.4.5.1. W 50 ml kolbie stożkowej Erlenmayera umieścić: 5,00 ml rozcieńczonego standardowego roztworu z punktu 4.2.15, 5,00 ml odczynnika pentan-2,4-dionu (4.2.12.), uzupełnić wodą zdemineralizowaną do końcowej objętości 30 ml.
- 4.4.5.2. Postępować dalej jak opisano w punkcie 4.4.4. i zmierzyć absorbancję w porównaniu z butan-1-olem (4.2.4.) jako roztworem odniesienia.
- 4.4.5.3. Powtórzyć operację z 10, 15, 20 i 25 ml rozcieńczonego roztworu standardowego (4.2.15.)
- 4.4.5.4. Dla otrzymania wartości zerowej (odpowiadającej zabarwieniu odczynników) postępować jak w punkcie 4.4.4.5.
- 4.4.5.5. Wykreślić krzywą kalibracyjną po odjęciu wartości zerowej od każdej absorbancji oznaczonej w punktach 4.4.5.1. i 4.4.5.3. Prawo Beera obowiązuje do 30 µg formaldehydu.
- 4.5. Obliczenia
- 4.5.1. Odjąć A_2 od A_1 i odczytać z krzywej kalibracyjnej (4.4.5.5.) ilość C formaldehydu, w µg, w roztworze próbki (4.4.1.).
- 4.5.2. Obliczyć zawartość formaldehydu w próbce (% m/m) według następującego wzoru:
- $$\text{zawartość formaldehydu w \%} = \frac{C}{10^3 \times m}$$
- w którym:
- m — masa próbki analitycznej w gramach.
- 4.6. Powtarzalność
- Dla zawartości formaldehydu 0,2% różnica między wynikami dwu równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać 0,005% przy oznaczaniu metodą kolorymetryczną z pentan-2,4-dionem. Jeśli oznaczenie wolnego formaldehydu prowadzi do wyników wyższych niż maksymalne stężenie ustalone:
- a) pomiędzy 0,05% i 0,2% w wyrobie nieetykietowanym,
- b) wyższe niż 0,2% w wyrobie zarówno etykietowanym, jak i nieetykietowanym, to znaczy, że należy postępować tak, jak podano w punkcie 5 poniżej.

5. Oznaczanie formaldehydu w obecności donatorów formaldehydu

5.1. Zasada

Wydzielony formaldehyd przeprowadzany jest w żółtą pochodną lutydynową w reakcji z pentan-2,4-dionem w reaktorze po kolumnie rozdzielającej i otrzymana pochodna jest oznaczana przez pomiar absorbancji przy 420 nm.

5.2. Odczynniki

Wszystkie odczynniki powinny być czystości analitycznej, a woda musi być zdemineralizowana.

5.2.1. Woda czystości odpowiedniej dla HPLC lub woda równoważnej jakości

5.2.2. Bezwodny octan amonu

5.2.3. Stężony kwas octowy

5.2.4. Pentan-2,4-dion (przechowywany w 4°C)

5.2.5. Bezwodny fosforan dwusodowy

5.2.6. 85% kwas ortofosforowy (d = 1,7)

5.2.7. Metanol o czystości dla HPLC

5.2.8. Dichlorometan

5.2.9. Formaldehyd 37 do 40% m/v

5.2.10. Wodorotlenek sodu, 1 M

5.2.11. Kwas solny, 1 M

5.2.12. Kwas solny, 0,002 M

5.2.13. Roztwór skrobi świeżo przygotowany według Farmakopei Europejskiej (p. 4.2.8.)

5.2.14. Standardowy roztwór jodu, 0,005 m.

5.2.15. Standardowy roztwór tiosiarczanu sodu, 0,1 m.

5.2.16. Faza ruchoma

Wodny roztwór fosforanu dwusodowego (5.2.5.), 0,006 M nastawiony na pH 2,1 kwasem ortofosforowym (5.2.6.)

5.2.17. Odczynnik dla mediów schodzących z kolumny („po kolumnie”)

W 1 000 ml kolbie miarowej rozpuścić: 62,5 g octanu amonu (5.2.2.), 7,5 g kwasu octowego (5.2.3.), 5 ml pentan-2,4-dionu (5.2.4). Uzupełnić wodą do 1 000 ml (5.2.1.). Przechowywać odczynnik bez dostępu światła. Okres przechowywania: maksymalnie trzy dni w temperaturze 25°C. Nie powinny zachodzić żadne zmiany w zabarwieniu odczynnika.

5.2.18. Standardowy bazowy roztwór formaldehydu

Wlać 10 g formaldehydu (5.2.9.) do 1 000 ml kolby miarowej i uzupełnić wodą do 1 000 ml. Oznaczyć stężenie tego roztworu następująco. Pobrać 5,00 ml, dodać 25,00 ml standardowego roztworu jodu (5.2.14.) i 10,00 ml roztworu wodorotlenku sodowego (5.2.10.). Pozostawić do odstania na 5 minut. Zakwasić 11,00 ml HCl (5.2.11.) i miareczkować nadmiar standardowego roztworu jodu standardowym roztworem tiosiarczanu sodu (5.2.15.), używając roztworu skrobi (5.2.13.) jako wskaźnika. 1 ml roztworu

jodu (5.2.14.) jest równoważnikiem 1,5 mg formaldehydu.

5.2.19. Standardowy rozcieńczony roztwór formaldehydu

Rozcieńczyć bazowy roztwór do 1/100 jego początkowego stężenia w fazie ruchomej (5.2.16.). 1 ml tego roztworu zawiera około 37 mg formaldehydu. Obliczyć jego dokładną zawartość.

5.3. Aparatura

5.3.1. Standardowe wyposażenie laboratoryjne

5.3.2. Pompa HPLC o podawaniu niepulsacyjnym

5.3.3. Niskociśnieniowa pompa o podawaniu niepulsacyjnym dla odczynnika (lub druga pompa HPLC)

5.3.4. Zawór zastrzykowy do wprowadzania próbki z pętlą 10 μ l

5.3.5. Reaktor mieszaniny schodzącej z kolumny („po kolumnie”) z następującymi elementami:

a) jedna 1-litrowa kolba trójszyjna,

b) jeden płaszcz grzewczy dla kolby 1 litrowej,

c) dwie kolumny Vigreux o minimum 10 półkach z dwoma płaszczami chłodzonymi powietrzem,

d) rurka ze stali kwasoodpornej (dla wymiennika ciepła) 1,6 mm, wewnętrzna średnica 0,23 mm, długość 400 mm,

e) rurka teflonowa 1,6 mm, wewnętrzna średnica 0,30 mm, długość 5 m (splot francuski) (zob. zał. 1),

f) jeden łącznik T-kształtny bez martwej objętości (Valco lub równoważny),

g) trzy łączniki bez martwej objętości lub jeden moduł „po kolumnie” Applied Biosystems PCRS 520 lub równoważny uzupełniony o 1 ml reaktor

5.3.6. Filtr membranowy o średnicy porów 0,45 μ m.

5.3.7. Ładunek filtru SEP-PAK lub równoważny

5.3.8. Kolumny przygotowane fabrycznie:

a) Bischoff hypersil RP (typ NC, odnośnik C 25, 46 1805) (5 μ m, długość = 250 mm, średnica wewnętrzna = 4,6 mm),

b) lub Dupont, Zorbax ODS (5 μ m, długość 250 mm, średnica wewnętrzna = 4,6 mm),

c) lub Phase SEP, spherisorb ODS (5 μ m, długość 250 mm, średnica wewnętrzna = 4,6 mm).

5.3. 9. Kolumna wstępna

Bischoff K₁ hypersil RP 18 (odnośnik K1G 6301 1805) (5 μ m, długość 10 mm, lub równoważny).

5.3.10. Kolumna i kolumna wstępna są połączone układem Ecotube (odnośnik A 150 20508 Bischoff) lub równoważnym.

5.3.11. Aparaturę (5.3.5.) złożyć tak, jak pokazano na schemacie blokowym (rys.6).

Połączenia te po zastrzykowym zaworze wprowadzającym muszą być możliwie najkrótsze. W tym przypadku rurka ze stali kwasoodpornej

między wylotem reaktora i wlotem detektora jest przeznaczona do schłodzenia mieszaniny przed detekcją i temperatura w detektorze jest nieznaną, lecz stałą.

5.3.12. Detektor UV i promieniowania widzialnego

5.3.13. Rejestrator

5.3.14. Wirówka

5.3.15. Łaźnia ultradźwiękowa (płuczka wibracyjna)

5.3.16. Mieszadło wibracyjne (Vortex lub równoważne)

5.4. Procedura

5.4.1. Krzywa kalibracyjna

Tworzy się ją przez wykreślenie wysokości pików jako funkcji stężenia rozcieńczonego standardowego roztworu formaldehydu. Przygotować standardowe roztwory przez rozcieńczenie roztworu odniesienia formaldehydu (5.2.19.) fazą ruchomą (5.2.16.):

- 1,00 ml roztworu (5.2.19.) rozcieńczone do 20,00 ml (około 185 µg/100 ml),
- 2,00 ml roztworu (5.2.19.) rozcieńczone do 20,00 ml (około 370 µg/100 ml),
- 5,00 ml roztworu (5.2.19.) rozcieńczone do 25,00 ml (około 740 µg/100 ml),
- 5,00 ml roztworu (5.2.19.) rozcieńczone do 20,00 ml (około 925 µg/100 ml).

Te roztwory standardowe mogą być przechowywane w ciągu jednej godziny w temperaturze laboratorium i muszą być świeżo przygotowane. Krzywa kalibracyjna ma właściwy przebieg liniowy dla stężeń pomiędzy 1,00 i 15,00 µg/ml.

5.4.2. Przygotowanie próbek

5.4.2.1. Emulsje (kremy, bazy do makijażu, tusze do oczu)

W 100 ml kolbie z korkiem zważyć z dokładnością do 0,001 g ilość próbki analitycznej (m. g) odpowiadającą przewidywanej ilości 100 µg formaldehydu. Dodać 20,00 ml dichlorometanu (5.2.8.) i 20,00 ml kwasu solnego (5.2.12.) dokładnie odmierzonych. Mieszać mieszadłem wibracyjnym (5.3.16.) i w płuczce wibracyjnej (5.3.15.). Rozdzielić dwie fazy przez wirowanie 3.000 gⁿ w ciągu 2 minut). W międzyczasie przepłukać ładunek filtru (5.3.7.) 2 ml metanolu (5.2.7.), następnie kondycjonować go 5 ml wody (5.2.1.). Przepuścić 4 ml fazy wodnej ekstraktu przez kondycjonowany ładunek filtru, odrzucić pierwsze 2 ml i zachować następną frakcję.

5.4.2.2. Płyny, szampony

W 100 ml kolbie z korkiem zważyć z dokładnością do 0,001 g próbkę analityczną (m. g) w ilości odpowiadającej przewidywanej ilości około 500 µg formaldehydu. Uzupelnąć do 100 ml fazą ruchomą (5.2.16.). Przesączyć roztwór przez filtr (5.3.6.) i wstrzyknąć lub przepuścić przez ładunek filtru (5.3.7.) kondycjonowany tak jak poprzednio (5.4.2.1.). Przed ponownym kondycjonowaniem układu należy przepuścić przez filtr

wodę, aby uniknąć rekrytalizacji. Wszystkie roztwory muszą być wstrzykiwane bezpośrednio po przygotowaniu.

5.4.3. Warunki chromatograficzne:

- szybkość przepływu fazy ruchomej: 1 ml/min,
- szybkość przepływu odczynnika: 0,5 ml/min,
- całkowita szybkość przepływu przy wylocie z detektora: 1,5 ml/min,
- wstrzykiwana objętość: 10 µl,
- temperatura eluowania: w przypadku trudności w rozdiale należy zanurzyć kolumnę w łaźni lodowo-wodnej i poczekać 15-20 minut na ustabilizowanie się temperatury,
- temperatura reakcji po kolumnie: 100°C,
- detekcja: 420 nm

Cały układ chromatograficzny łącznie z reaktorem po kolumnie musi być przepłukany wodą po użyciu (5.2.1.). Jeśli układ nie jest używany dłużej niż w ciągu dwóch dni, to po płukaniu wodą należy układ przepłukać metanolem (5.2.7.). Przed ponownym kondycjonowaniem należy układ przepłukać wodą, aby uniknąć krystalizacji.

5.5. Obliczenia

Emulsje: (5.4.2.1.):

$$\text{zawartość formaldehydu w \% (m/m)} = \frac{C \times 10^{-6} \times 100}{5 \text{ m}} = \frac{C \times 10^{-4}}{5 \text{ m}}$$

Płyny, szampony:

$$\text{zawartość formaldehydu w \% (m/m)} = \frac{C \times 10^{-6} \times 100}{m} = \frac{C \times 10^{-4}}{m}$$

gdzie:

- m — masa analizowanej próbki w g (5.4.2.1),
C — stężenie formaldehydu w mg/100 ml odczytane z krzywej kalibracyjnej (5.4.1.).

5.6. Powtarzalność.

Dla zawartości formaldehydu 0,05 % różnica pomiędzy wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać 0,001%.

Dla zawartości formaldehydu 0,2 % różnica pomiędzy wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać 0,005 %.

INSTRUKCJA WYKONANIA „SPLOTU FRANCUSKIEGO”

Wymagane przybory

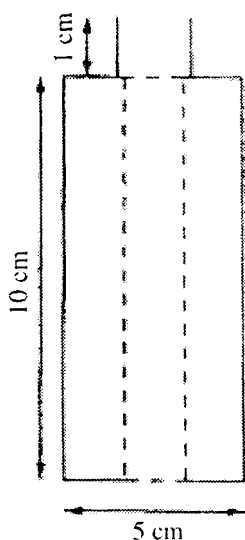
- Jedna drewniana szpula o średnicy zewnętrznej 5 cm z otworem o średnicy 1,5 cm przechodzącym przez środek. Umieścić cztery stalowe gwoździe (jak pokazano na rys. 1 i 2). Odległość między dwoma gwoździami musi wynosić 1,8 cm, a gwoździe od otworu 0,5 cm (rys. 2).
- Jedna sztywna igła (w formie rozwidlonego haczyka) dla zaczeplenia rurki teflonowej.

c) Rurka teflonowa długości 5 m o średnicy zewnętrznej 1,6 mm i średnicy wewnętrznej 0,3 mm.

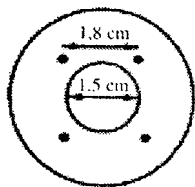
PROCEDURA

Dla rozpoczęcia „splotu francuskiego” należy przeprowadzić rurkę teflonową od góry do dołu przez otwór szpuli (pozostawiając około 10 cm rurki wystającej z dolnego końca szpuli, aby umożliwić tworzenie łańcucha podczas procesu wykonywania splotu); następnie nawinąć rurkę na gwoździe, jak pokazano na rys.3. Góra i dół splotu francuskiego będą chronione metalowymi pierścieniami i śrubami, należy uważać, aby nie zgnieć rurki teflonowej podczas zaciskania splotu. Nawinąć rurkę na około każdego gwoźdźdźa po raz drugi i zrobić „oczka” następująco: podnieść dolną rurkę nad górną z pomocą haczyka (patrz rys.4). Powtórzyć te czynności z każdym gwoździem w kolejności (1, 2, 3, 4 w kierunku przeciwnym do kierunku wskazówek zegara) do momentu uzyskania 5 m lub wymaganej długości splotu.

Pozostawić około 10 cm rurki na zakończenie łańcucha. Przewlec rurkę przez każdą z czterech pętli i przeciągnąć delikatnie w celu zamknięcia końca łańcucha.



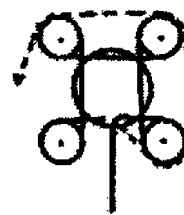
Rys. 1. Schematyczny rysunek szpuli



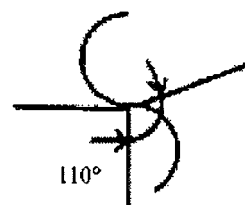
Rys. 2. Umiejscowienie gwoździ na szpuli



Rys. 3. Pierwsza rurka

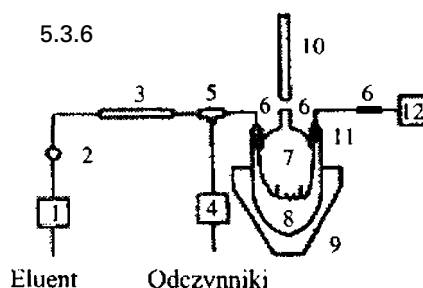
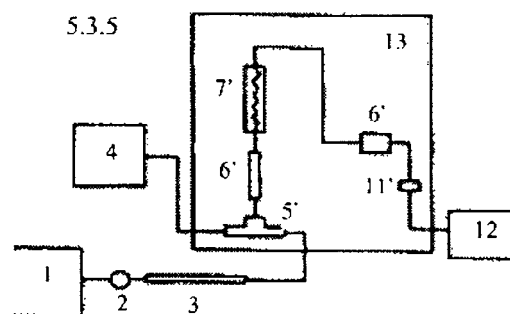


Rys. 4. Druga rurka. Aby wykonać „oczko”, podnieść dolną rurkę (linia ciągła) powyżej drugiej rurki — linia przerywana



Rys. 5.

Rys. 6:



1. Pompa HPLC
2. Zawór zastrzykowy do wprowadzania próbki
3. Kolumna z kolumną wstępną
4. Pompa dla odczynnika
5. Łącznik T(vortex)
- 5'. Łącznik T-kształtny bez martwej objętości
- 6-6'. Połączenie bez martwej objętości
7. Splot francuski
- 7'. Reaktor
8. Trójżyjna kolba z wrzącą wodą
9. Płaszcz grzewczy dla kolby
10. Chłodnica
11. Rurka wymiennika ciepła ze stali kwasoodpornej
12. Detektor w zakresie promieniowania UV i widzialnego
13. Zestaw po kolumnie PCRS-520

II. Identyfikowanie i ilościowe oznaczanie wybranych barwników utleniających w farbach do włosów

1. Cel i zakres

Metoda jest odpowiednia do identyfikowania i ilościowego oznaczania następujących substancji w farbach do włosów w postaci kremu lub płynu:

Substancje	Symbol
Fenylendiaminy	
o-fenylendiamina	(OPD)
m-fenylendiamina	(MPD)
p-fenylendiamina (Aneks V Dyrektywy Kosmetycznej)	(PPD)
Metylofenylendiaminy	
4-metylo-1,2-fenylendiamina (3,4-diaminotoluen)	(OTD)
4-metylo-1,3-fenylendiamina (2,4-diaminotoluen)	(MTD)
2-metylo-1,4-fenylendiamina (2,5-diaminotoluen)	(PTD)
Diaminofenole	
2,4-diaminofenol	(DAP)
Hydrochinon	
1,4-benzenodiol	(H)
α -naftol	(α -N)
Pirogallol	
1,2,3-trihidroksybenzen	(P)
Rezorcyna	
1,3-dihidroksybenzen	R

2. Zasada

Barwniki utleniające ekstrahuje się z farb w postaci kremu lub płynu 96% etanolem przy pH 10 i identyfikuje metodą chromatografii cienkowarstwowej, jedno- i dwukierunkowej. Dla ilościowego oznaczania tych substancji chromatogramy próbek otrzymane z pomocą czterech układów rozwijających są porównywalne z chromatogramami substancji odniesienia otrzymanymi w tym samym czasie i w warunkach tak podobnych, jak jest to możliwe.

3. Odczynniki

Wszystkie odczynniki powinny być czystości analitycznej

- 3.1. Bezwodny etanol
- 3.2. Aceton
- 3.3. Etanol, 96% (v/v)
- 3.4. Roztwór amoniaku, 25% ($d_4^{20} = 0,91$)
- 3.5. Kwas L(+)-askorbinowy
- 3.6. Chloroform
- 3.7. Cykloheksan
- 3.8. Azot techniczny
- 3.9. Toluenu
- 3.10. Benzen
- 3.11. n-Butanol
- 3.12. Butan-2-ol
- 3.13. Kwas podfosforawy, roztwór 50% (v/v)

3.14. Odczynniki do diazowania, jeden z dwóch do wyboru:

- a) chlorobenzenosulfonian 3-nitrobenzenodiazoniowy (stabilizowany w postaci soli), taki jak odczynnik Red 2 NJ Francolor,
- b) 2-naftalenosulfonian 2-chloro-4-nitrobenzenodiazoniowy (stabilizowany w postaci soli), taki jak odczynnik NNCD Reagent Nr 74150 Fluka lub równoważny.

3.15. Azotan srebra

3.16. Aldehyd p.-dimetyloaminobenzoesowy

3.17. 2,5-Dimetylofenol

3.18. Chlorek żelaza sześciowodny

3.19. Kwas solny, roztwór 10% m/v

3.20. Substancje odniesienia.

Substancje odniesienia przedstawiono w ustępie 1 „Cel i zakres”. W przypadku związków aminowych, substancją odniesienia mogą być chlorowodorek (mono- lub di-) lub wolna zasada.

3.21. Roztwory odniesienia 0,5% (m/v).

Przygotowuje się 0,5% (m/v) roztwory wszystkich substancji odniesienia podanych w punkcie 3.20. Odważyć 50 mg \pm 1 mg substancji odniesienia w 10 ml kolbie miarowej. Dodać 5 ml 96% etanolu (3.3.), 250 mg kwasu askorbinowego (3.5) i wymieszać. Zalkalizować, dodając roztwór amoniaku (3.4.) do uzyskania wyraźnego odczynu o pH 10 (z badać papierkiem wskaźnikowym). Uzupełnić

96% etanolem (3.3.) do 10 ml i wymieszać. Roztwory można przechowywać w ciągu tygodnia w chłodnym miejscu bez dostępu światła. W pewnych przypadkach, po dodaniu kwasu askorbinowego i amoniaku, może wytrącać się osad. Należy wówczas pozwolić na jego osadzenie przed zastosowaniem.

3.22. Rozpuszczalniki rozwijające.

3.22.1. Aceton-chloroform-toluen (35:25:40 obj.)

3.22.2. Chloform-cykloheksan-etanol absolutny — 25% amoniak (80:10:10 :1obj.)

3.22.3. Benzen-butan-2-ol — woda (50:25:25 obj.)

Wytrząsać dobrze i stosować górną fazę po rozdeleniu w temperaturze pokojowej (20 do 25°C).

3.22.4. n-Butanol-chloroform — odczynnik M (7:70:23 obj.)

Rozdzielać starannie w temperaturze pokojowej (20 do 25°C i stosować dolną fazę.

Przygotowanie odczynnika M:

25% (v/v) roztwór amoniaku	24 objętości
50% kwas podfosforawy (3.13.)	1 objętość
woda	75 objętości

Rozpuszczalniki rozwijające zawierające amoniak należy dobrze wytrząsać bezpośrednio przed użyciem.

3.23. Rozpylane roztwory wywołujące

3.23.1. Odczynnik do diazowania

Przygotować 5% (m/v) wodny roztwór wybranego odczynnika (3.14). Roztwór ten należy przygotować bezpośrednio przed użyciem.

3.23.2. Odczynnik Ehrlicha

Rozpuścić 2 g aldehydu p.-dimetyloaminobenzoesowego (3.16.) w 100 ml 10% (m/v) wodnego roztworu kwasu solnego (3.19.).

3.23.3. 2,5-dimetylofenol — sześciowodny chlorek żelaza

Roztwór 1: Rozpuścić 1 g dimetylofenolu (3.17.) w 100 ml 96% etanolu (3.3.)

Roztwór 2: Rozpuścić 4 g sześciowodnego chlorku żelaza (3.18.) w 100 ml 96% etanolu (3.3.)

Do wywoływania należy te roztwory rozpylać oddzielnie, najpierw roztwór 1, następnie roztwór 2.

3.23.4. Amoniakalny azotan srebra

Do 5%(m/v) wodnego roztworu azotanu srebra (3.15.) dodaje się 25% amoniak aż do rozpuszczenia osadu. Odczynnik ten musi być przygotowany bezpośrednio przed użyciem. Nie należy go przechowywać.

4. Aparatura

4.1. Standardowe wyposażenie laboratoryjne do chromatografii cienkowarstwowej.

4.1.1. Osłona z tworzywa lub szklana tak skonstruowana, aby azot mógł opływać płytkę chromatograficzną podczas nanoszenia kropli próbek i suszenia. Ostrożność ta jest konieczna ze względu na podatność pewnych barwników na utlenianie.

4.1.2. Mikrostrzykawka 10 µl, kalibrowana z podziałkami 0,2 µl, z okrągło zakończoną igłą lub lepiej 50 µl wielokrotny dozownik, zmontowany na statywie śrubowym w taki sposób, że płytka może być utrzymywana w atmosferze azotu.

4.1.3. Cienkowarstwowe płytki krzemionkowe gotowe do stosowania, o grubości 0,25 mm, o wymiarach 20 x 20 cm (firmy Macherey and Nagel, Siliica G-HR, które mają podłoże tworzywowe lub równoważne).

4.2. Wirówka 4 000 obrotów/minutę

4.3. Probówki do wirówki, 10 ml z korkiem gwintowanym pokryte PTFE lub równoważne.

5. Procedura

5.1 Przygotowanie próbek

Odrzucać pierwsze 2 lub 3 cm kremu wyciśniętego z tuby. Umieścić następujące materiały w probówce wirówki (4.3.) uprzednio przepłukanej azotem; 300 mg kwasu askorbinowego, z 3 g kremu lub 3 g homogenizowanego płynu. Dodać kroplami 25% amoniak (3.4.) do uzyskania pH 10.

Uzupełnić 96% etanolem (3.3.) do 10 ml. Homogenizować w atmosferze azotu (3.8.), zamknąć i następnie wirować przy 4 000 obrotów/minutę w ciągu 10 minut. Do analizy stosować ciecz znajdującą się na górze.

5.2. Chromatografia

5.2.1. Nanoszenie kropli na płytki

W atmosferze azotu (3.8.) nanieść na płytkę chromatograficzną (4.1.3.) po 1 µl wszystkich opisanych powyżej roztworów odniesienia w dziewięciu punktach umieszczonych w odległości po około 1,5 cm wzdłuż linii znajdującej się średnio 1,5 cm od krawędzi płytki. Naniesienia roztworów odniesienia należy rozmieścić następująco:

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

Dodatkowo nanieść w punktach 10 i 11 odpowiednio po 2 µl próbek badanych roztworów otrzymanych zgodnie z opisem w punkcie 5.1. Utrzymać płytkę w atmosferze azotu aż do chwili, kiedy jest podana rozdziałowi chromatograficznemu.

5.2.2. Rozwijanie

Umieścić płytkę w komorze uprzednio przepłukanej azotem (3.8.) wysyconej jednym z czterech rozpuszczalników (3.22.) i pozostawić do rozwijania w temperaturze pokojowej (20 do 25°C, w ciemności do chwili, kiedy czoło rozpuszczalnika osiągnie wysokość około 15 cm od linii bazowej.

Wyjąć płytkę z komory i suszyć w atmosferze azotu (3.8.) w temperaturze pokojowej.

5.2.3. Spryskiwanie

Spryskać płytkę bezzwłocznie jednym z czterech rozpuszczalników wymienionych w punkcie 3.23.

5.2.4. Identyfikowanie

Porównać wartości R_f i barwy otrzymanych plam z tymi otrzymanymi dla substancji odniesienia

poddanych chromatograficznemu rozdzielaniu. Tab. I podaje przykłady wartości R_f i barwy dla każdej substancji zależnie od stosowanych rozpuszczalników i środków wywołujących. Potwierdzenie wątpliwego identyfikowania można czasem uzyskać metodą wzorca wewnętrznego, dodając roztwór odpowiedniej substancji odniesienia do ekstraktu próbki.

5.2.5. Ocena ilościowa

Porównać wizualnie intensywność plam dla każdej substancji identyfikowanej w punkcie 5.2.4. z odpowiednim zakresem stężeń substancji odniesienia. Jeśli stężenie jednej lub więcej substancji znalezionych w próbce jest zbyt wysokie, rozcieńczyć ekstrakt próbki i powtórzyć pomiar.

Tab. I. Wartości R_f i barwy otrzymane bezpośrednio po spryskaniu

Substancja odniesienia (3.20)	Rozpuszczalniki rozwijające				Rozpylane roztwory rozwijające			
	wartości RF				otrzymane barwy			
	(3.22.1.)	(3.22.2.)	(3.22.3.)	(3.22.4.)	Diazowy (3.23.1.)	Ehrlich (3.23.2.)	Dimetylofenol (3.23.3.)	AgNO ₃ (3.24.4.)
OPD	0,62	0,60	0,30	0,57	bladobrzęzowa	—	—	bladobrzęzowa
MPD	0,40	0,60	0,47	0,48	fioletowo-brązowa(*)	żółta	bladobrzęzowa	bladobrzęzowa
PPD	0,20	0,50	0,30	0,48	brązowa	jasnoczerwona(*)	fioletowa(*)	szara
OTD	0,60	0,60	0,53	0,60	brązowa(*)	bladopomarańczowa	bladobrzęzowa	szarawobrzęzowa
MPD	0,40	0,67	0,45	0,60	czerwonawo-brązowa(*)	żółta	brązowa	czarna
PTD	0,33	0,65	0,37	0,70	brązowa	pomarańczowa	fioletowa(*)	szara
DAP	0,07	—	0	0,05	brązowa(*)	pomarańczowa	fioletowa	brązowa
H	0,50	0,35	0,80	0,20	—	pomarańczowa	fioletowa	czarna(*)
α-N	0,90	0,80	0,90	0,75	pomarańczowo-brązowa	—	fioletowa(*)	czarna
P	0,37	—	0,67	0,05	brązowa	bardzo bladofioletowa	bardzo bladobrzęzowa	brązowa(*)
R	0,50	0,37	0,80	0,17	pomarańczowa(*)	bladofioletowa	bardzo bladobrzęzowa	bladobrzęzowa

Uwaga

OPD jest tylko słabo widoczny; należy użyć rozpuszczalnika(3.22.3), aby rozdzielić go od OTD.

(*) Wskazuje najlepszą wywołaną barwę.

6. Badanie metodą dwukierunkowej chromatografii cienkowarstwowej

Procedura chromatografii dwukierunkowej wymaga użycia dodatkowych substancji standardowych i odczynników

6.1. Dodatkowe roztwory i substancje odniesienia

6.1.1. β-naftol (β-N)

6.1.2. 2-aminofenol (OAP)

6.1.3. 3-aminofenol (MAP)

6.1.4. 4-aminofenol (PAP)

6.1.5. 2-nitro-1,4-fenylendiamina (2-NPPD)

6.1.6. 4-nitro-1,2-fenylenodiamina (4-NOPD)

Przygotować 0,5% (m/v) roztworów wszystkich dodatkowych substancji odniesienia jak opisano w punkcie 3.21.

6.2. Dodatkowy rozpuszczalnik rozwijający

6.2.1. Octan etylu-cykloheksan-25% roztwór amoniaku (65:30:0,5 obj.)

6.3. Dodatkowy układ wywołujący

Umieścić szklane naczynie w komorze do chromatografii cienkowarstwowej, dodać około 2 g kryształów jodu i zamknąć komorę odpowiednią pokrywką.

6.4. Chromatografia

6.4.1. Narysować dwie linie (rys. 1) na powierzchni adsorbenta płytki cienkowarstwowej (4.1.3.).

6.4.2. W atmosferze azotu (4.1.1.) nanieść 1 do 4 μ l ekstraktu (5.1.) w punkcie bazowym 1 (rys. 1), który znajduje się w odległości 2 cm od obu krawędzi. Ilość naniesionego ekstraktu zależy od intensywności plam na chromatogramach (5.2).6.4.3. Między punktami 2 i 3 rozdzielać (rys. 1) barwniki utleniające zidentyfikowane lub uważane za zidentyfikowane przez rozdział chromatograficzny (5.2.) (odległość między punktami wynosi 1,5 cm). Nanosić po 2 μ l wszystkich roztworów odniesienia, z wyjątkiem DAP, który trzeba nanieść w ilości 6 μ l. Działania prowadzić w atmosferze azotu (6.4.2.).

6.4.4. Powtórzyć operację z punktu 6.4.3. w punktach bazowych 4 i 5 (rys. 1) i utrzymywać płytkę w atmosferze azotu aż do chwili rozpoczęcia rozdzielania chromatograficznego (odległość między punktami wynosi 1,5 cm).

6.4.5. Przepłukać komorę chromatograficzną azotem (3.8.) i umieścić w niej odpowiednią ilość rozpuszczalnika rozwijającego (3.22.2). Umieścić płytkę (6.4.4.) w komorze i rozwijać ją w ciemno-

ści w pierwszym kierunku elucji (rys. 1). Eluować do chwili, kiedy czoło rozpuszczalnika osiągnie linię zaznaczoną na płytce (około 13 cm).

6.4.6. Wyjąć płytkę z komory i umieścić ją w komorze chromatograficznej przepłukanej uprzednio azotem przez co najmniej 60 minut, aby odparować rozpuszczalnik eluujący.

6.4.7. Za pomocą kalibrowanej probówki wprowadzić odpowiednią ilość rozpuszczalnika eluującego (6.2.) do komory przepłukanej azotem (3.8.), umieścić płytkę obróconą o 90° w komorze (6.4.6.), wprowadzić rozdział chromatograficzny w drugim kierunku (również w ciemności) do chwili, kiedy czoło rozpuszczalnika osiągnie linię narysowaną na powierzchni adsorbenta. Wyjąć płytkę z komory i odparować rozpuszczalnik eluujący na powietrzu.

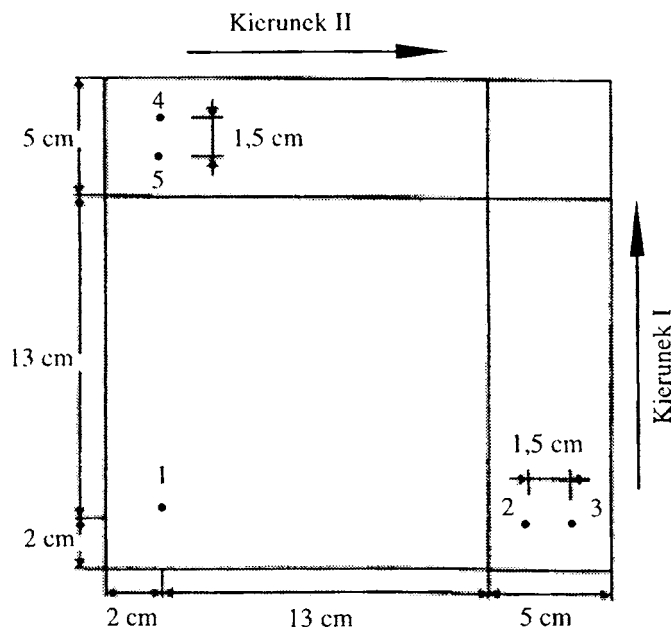
6.4.8. Umieścić płytkę w komorze chromatograficznej wysyconej parami jodu (6.3.) na 10 minut i interpretować dwukierunkowy chromatogram korzystając z wartości R_f i walorów barwy substancji odniesienia rozdzielanych chromatograficznie w tym samym czasie (tab. II stanowi przewodnik po wartości R_f i walorach barw).

Uwaga. Dla otrzymania maksymalnego wybarwienia plam należy pozostawić chromatogram wystawiony na działanie powietrza w ciągu pół godziny po rozwinięciu.

6.4.9. Obecność barwników utleniających stwierdzoną w punkcie 6.4.8. można wyraźnie potwierdzić przez powtórzenie operacji opisanych w punktach 6.4.1. do 6.4.8. i dodanie w 1 punkcie bazowym do ilości ekstraktu podanej w punkcie 6.4.2. 1 μ l substancji odniesienia zidentyfikowanej w punkcie 6.4.8. Jeśli nie zostanie znaleziona dodatkowa plama w porównaniu z chromatogramem otrzymanym według punktu 6.4.8., interpretacja chromatogramu z punktu 6.4.8. jest prawidłowa.

Tab. II. Barwa substancji odniesienia po procesie chromatografii i wywołaniu parami jodu

Substancja odniesienia	Barwa po wywołaniu parami jodu
R	beżowa
P	brązowa
alfa-N	fioletowa
beta-N	bladobrązowa
H	fioletowo-brązowa
MPD	żółtawobrązowa
PPD	fioletowo-brązowa
MTD	ciemnobrązowa
PTD	żółtawobrązowa
DAP	ciemnobrązowa
OAP	pomarańczowa
MAP	żółtawobrązowa
PAP	fioletowo-brązowa
2-NPPD	brązowa
4-NOPD	pomarańczowa



Rys 1.

III. Identyfikacja i oznaczanie kwasu szczawiowego i jego soli alkalicznych w środkach do pielęgnacji włosów

1. Cel i zakres metody

Opisana poniżej metoda jest odpowiednia do identyfikacji i oznaczania kwasu szczawiowego i jego soli alkalicznych w środkach do pielęgnacji włosów. Może być ona stosowana dla bezbarwnych wodnych/alkoholowych roztworów i płynów, które zawierają około 5% kwasu szczawiowego lub równoważną ilość alkalicznych szczawianów.

2. Definicja

Zawartość kwasu szczawiowego lub jego soli alkalicznych oznaczona według tej metody jest wyrażona jako zawartość w procentach masowych m/m wolnego kwasu szczawiowego w próbce.

3. Zasady

Po usunięciu wszystkich obecnych anionowych środków powierzchniowo czynnych chlorowodorkiem p-toluidyny, kwas szczawiowy i/lub szczawiany wytrącane są jako szczawian wapnia, po czym roztwór jest przesączany. Osad jest rozpuszczany w kwasie siarkowym i miareczkowany roztworem nadmanganianu potasu.

4. Odczynniki

Wszystkie odczynniki powinny być czystości analitycznej

- 4.1. 5% (m/m) roztwór octanu amonu,
- 4.2. 10% (m/m) roztwór chlorku wapnia,
- 4.3. 95% (v/v) etanol,
- 4.4. czterochlorek węgla,

4.5. eter dietylowy,

- 4.6. 6—8% (m/m) roztwór dichlorowodorku p-toluidyny,
- 4.7. 0.1 N roztwór nadmanganianu potasu,
- 4.8. 20% (m/m) kwas siarkowy,
- 4.9. 10% (m/m) kwas chlorowodorowy,
- 4.10. trójwodny octan sodu,
- 4.11. kwas octowy lodowaty,
- 4.12. kwas siarkowy (1:1),
- 4.13. nasycony roztwór wodorotlenku baru.

5. Aparatura

- 5.1. rozdzielacze 500 ml
- 5.2. zlewki 50 i 600 ml
- 5.3. tygły z filtrem szklanym G-4
- 5.4. cylindry miarowe 25 i 100 ml
- 5.5. pipety 10 ml
- 5.6. kolby ssawkowe 500 ml
- 5.7. próżniowa pompa wodna (smoczek parowy)
- 5.8. termometr o zakresie skali 0—100°C
- 5.9. mieszadło magnetyczne z elementem grzewczym
- 5.10. pręty magnetyczne pokryte teflonem
- 5.11. biureta 25 ml
- 5.12. kolby stożkowe 250 ml.

6. Procedura

- 6.1. Odważyć 6—7 g próbki do zlewki o pojemności 50 ml, doprowadzić do pH 3 rozcieńczonym kwasem chlorowodorowym (4.9) i myć w rozdzielaczu 100 ml wody destylowanej. Dodawać stopniowo 25 ml etanolu (4.3), 25 ml roztworu dichlorowodoru p-toluidyny (4.6) i 25 do 30 ml czterochlorku węgla (4.4) i energicznie wytrząsać mieszaninę.
- 6.2. Po rozdzieleniu faz usunąć dolną (organiczną) fazę, powtórzyć ekstrakcję, używając reagentów podanych w punkcie 6.1. i znowu usunąć fazę organiczną.
- 6.3. Przełać wodny roztwór do zlewki o pojemności 600 ml i usunąć obecny jeszcze czterochlorek węgla przez ogrzewanie roztworu do wrzenia.
- 6.4. Dodać 50 ml roztworu octanu amonu (4.1), doprowadzić roztwór do wrzenia (5.9) i wmieszać 10 ml gorącego roztworu chlorku wapnia (4.2) do wrzącego roztworu; pozwolić wytrącić się osadowi.
- 6.5. Sprawdzić, czy wytrącenie osadu jest całkowite, dodając kilka kropli roztworu chlorku wapnia (4.2), pozostawić do schłodzenia do temperatury pokojowej i następnie wmieszać do 200 ml etanolu (4.3); (5.10) pozostawić do odstania na 30 minut.
- 6.6. Przesączyć ciecz przez tygiel z filtrem szklanym (5.3), przenieść osad z małą ilością gorącej wody (50 do 60°C) do tygla z filtrem szklanym i myć osad zimną wodą.
- 6.7. Przemyc osad pięć razy małą ilością etanolu (4.3) i potem pięć razy małą ilością eteru etylowego (4.5) i rozpuścić osad w 50 ml gorącego kwasu siarkowego (4.8) przez przeciąganie tego ostatniego przez szklany filtr tygla pod zmniejszonym ciśnieniem.
- 6.8. Przenieść roztwór bez strat do kolby stożkowej (5.1.1) i miareczkować roztworem nadmanganianu potasu (4.7) aż do wystąpienia jasnoróżowego zabarwienia.

7. Obliczenia

Zawartość kwasu szczawiowego w próbce wyrażoną jako procent masowy oblicza się z wzoru:

$$\% \text{ kwasu szczawiowego} = \frac{A \times 4.50179 \times 100}{E \times 1000}$$

w którym:

A oznacza zużyty 0.1N roztwór nadmanganianu potasu zmierzony zgodnie z p. 6.8,

E oznacza masę próbki analitycznej wyrażoną w gramach (6.1),

4.50179 oznacza współczynnik przeliczeniowy kwasu szczawiowego.

8. Powtarzalność

Dla zawartości kwasu szczawiowego wynoszącej około 5% różnica pomiędzy wynikami z dwóch równoległe prowadzonych analiz na tej samej próbce nie powinna przekraczać wartości bezwzględnej 0,15%.

9. Identyfikowanie

9.1. Zasady

Kwas szczawiowy i/lub szczawiany wytrącane są w postaci szczawianu wapnia i rozpuszczane w kwasie siarkowym. Do roztworu dodaje się niewielką ilość roztworu nadmanganianu potasu, który odbarwia się i powoduje tworzenie się dwutlenku węgla. Kiedy powstały dwutlenek węgla przechodzi przez roztwór wodorotlenku baru, tworzy się biały osad (zmętnienie) węglanu baru.

9.2. Procedura

9.2.1. Poddać próbkę przeznaczoną do analizy działaniu opisanemu w punktach od 6.1. do 6.3.; usunie ono każdy obecny środek powierzchniowo czynny.

9.2.2. Dodać na czubku łopatką octanu sodu (4.10) do około 10 ml roztworu otrzymanego zgodnie z p. 9.2.1. i zakwasić roztwór kilkoma kroplami kwasu octowego lodowatego (4.11).

9.2.3. Dodać 10% roztwór chlorku wapnia (4.2) i przesączyć. Rozpuścić osad szczawianu wapnia w 2 ml kwasu siarkowego (1:1) (4.12).

9.2.4. Przenieść roztwór do probówki i dodać kroplami około 0,5 ml 0.1N roztworu nadmanganianu potasu (4.7) i przesączyć. Jeżeli szczawian jest obecny, roztwór traci kolor najpierw stopniowo, później gwałtownie.

9.2.5. Bezpośrednio po dodaniu nadmanganianu potasu umieścić odpowiednią szklaną rurkę z korkiem nad probówką, ogrzewać lekko zawartość i zbierać powstający dwutlenek węgla w nasyconym roztworze wodorotlenku baru (4.13). Pojawienie się po trzech do pięciu minutach mlecznego zmętnienia węglanu baru świadczy o obecności kwasu szczawiowego.

IV. Oznaczanie chloroformu w paście do zębów

1. Cel i zakres metody

Metoda ta jest stosowana do oznaczania chloroformu w paście do zębów za pomocą chromatografii gazowej. Metoda ta jest odpowiednia do oznaczania chloroformu na poziomie 5% lub poniżej.

2. Definicja

Zawartość chloroformu oznaczona tą metodą jest wyrażona jako procent masowy w wyrobie.

3. Zasady

Otrzymuje się zawiesinę pasty do zębów w mieszaninie dimetyloformamidu/metanolu, do której dodaje się znaną ilość acetonitrylu jako standard we-

- wewnętrzny. Po odwirowaniu próby faza ciekła jest analizowana metodą chromatografii gazowej i obliczana jest zawartość chloroformu.
- #### 4. Odczynniki
- Wszystkie odczynniki powinny być czystości analitycznej.
- ##### 4.1. Porapak Q, Chromosorb 101 lub równoważny, 80 do 100 mesh
- ##### 4.2. Acetonitryl
- ##### 4.3. Chloroform
- ##### 4.4. Dimetyloformamid
- ##### 4.5. Metanol
- ##### 4.6. Roztwór standardu wewnętrznego.
- Do 50 ml kolbki miarowej dodać pipetą 5 ml dime-tyloformamidu (4.4.) i dodać około 300 mg (Mmg) acetonitrylu, dokładnie odważonego. Uzupełnić do kreski dimetyloformamidem i wymieszać.
- ##### 4.7. Roztwór do oznaczania względnego współczyn- nika odpowiedzi. Do 10 ml kolbki miarowej dodać pipetą dokładnie 5 ml roztworu wewnętrznego standardu (4.6.) i dodać około 300 mg (M₁mg) chloroformu, dokładnie odważonego. Uzupełnić do kreski dimetyloformamidem i wymieszać.
- #### 5. Aparatura i wyposażenie
- ##### 5.1. Waga analityczna
- ##### 5.2. Chromatograf gazowy z detektorem płomieniowo- jonizacyjnym
- ##### 5.3. Mikrostrzykawką pojemności 5 do 10 µl i kalibracji co 0,1 µl
- ##### 5.4. Pipety ze zbiornikiem gruszkowym pojemności 1, 4 i 5 ml
- ##### 5.5. Kolby miarowe 10 i 50 ml
- ##### 5.6. Probówki, około 20 ml, z nakrętką, Sovirel France nr 20 lub równoważne. Nakrętka ma wewnętrzną płytkę uszczelniającą, pokrytą z jednej strony teflo- nem
- ##### 5.7. Wirówka.
- #### 6. Procedura
- ##### 6.1. Odpowiednie warunki chromatografii gazowej
- ###### 6.1.1. Materiał kolumny: szkło
- | | |
|----------------------|--------|
| długość: | 150 cm |
| średnica wewnętrzna: | 4 mm |
| średnica zewnętrzna: | 6 mm |
- ###### 6.1.2. Wypełnić kolumnę wypełnieniem Porapak Q, Chromosorb 101 lub równoważnym 80 do 100 mesh (4.1.) z pomocą wibratora.
- ###### 6.1.3. Detektor płomieniowo-jonizacyjny: należy nastawić jego czułość tak, aby przy wprowadzeniu 3 µl roztworu według 4.7 wysokość pików aceto- nitylu wynosiła około trzech czwartych pełnego zakresu wysokości pików.
- ###### 6.1.4. Gazy:
- Nośnik azot, szybkość przepływu 65 ml/min
- Pomocniczy: nastawić przepływ gazów do detek- tora tak, aby przepływ powietrza lub tlenu był pięć do dziesięciu razy większy niż wodoru.
- ###### 6.1.5. Temperatury:
- | | |
|---------------|-------|
| dozownik: | 210°C |
| detektor: | 210°C |
| piec kolumny: | 175°C |
- ###### 6.1.6. Szybkość przesuwu papieru: około 100 cm na go- dzinę.
- #### 6.2. Przygotowanie próbeki
- Pobrać próbkę do analizy z nieotwieranej tubki. Usunąć jedną trzecią zawartości, założyć z powro- tem nakrętkę na tubę, wymieszać starannie w tubie i następnie pobrać próbkę analityczną.
- #### 6.3. Oznaczenie
- ###### 6.3.1. Do probówki z nakrętką (5.6.) odważyć 6 do 7 g (Mog) z dokładnością do 10 mg pasty do zę- bów, przygotowanej zgodnie z punktem 6.2, i do- dać trzy małe szklane ziarenka.
- ###### 6.3.2. Do probówki dodać pipetą dokładnie 5 ml roz- tworu wewnętrznego standardu (4.6.), 4 ml di- metyloformamidu (4.4.) i 1 ml metanolu (4.5.), zamknąć probówkę i wymieszać.
- ###### 6.3.3. Wytrząsnąć zamkniętą probówkę w mechanicz- nej wytrząsarce w ciągu pół godziny i odwirować ją w ciągu 15 minut z taką szybkością, aby otrzy- mać wyraźny rozdział faz. Uwaga: czasami zda- rza się, że faza ciekła jest mętna po wirowaniu. Pewną poprawę można uzyskać przez: dodanie 1 do 2 g chlorku sodowego do fazy ciekłej, pozo- stawienie do odstania i ponowne odwirowanie.
- ###### 6.3.4. Wprowadzić do chromatografu 3 µl tego roztwó- ru (6.3.3.) w warunkach opisanych w punkcie 6.1. Powtórzyć tę operację w warunkach opisanych powyżej, można podać następujące czasy reten- cji jako wartości orientacyjne:
- | | |
|------------------|-------------------|
| Metanol | średnio 1 minuta |
| Acetonitryl | średnio 2—5 minut |
| Chloroform | średnio 6 minut |
| Dimetyloformamid | >15 minut |
- ###### 6.3.5. Oznaczenie względnego współczynnika odpo- wiedz. Wprowadzić 3 µl roztworu (4.7.) dla ozna- czenia tego współczynnika. Powtórzyć operację. Oznaczyć względny współczynnik odpowiedzi codziennie.
- #### 7. Obliczenia
- ##### 7.1. Obliczenie względnej odpowiedzi
- ###### 7.1.1. Zmierzyć wysokość i szerokość w połowie wyso- kości pików acetonitrylu i chloroformu i obliczyć powierzchnie obu pików, zgodnie z wzorem: wy- sokość x szerokość w połowie wysokości.
- ###### 7.1.2. Oznaczyć powierzchnie pików acetonitrylu i chloroformu w chromatogramie, otrzymanym

zgodnie z punktem 6.3.5., i obliczyć względną odpowiedź f_s za pomocą następującego wzoru:

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

w którym:

- f_s — współczynnik względnej odpowiedzi dla chloroformu,
- A_s — powierzchnia pików chloroformu (6.3.5.),
- A_i — powierzchnia pików acetonitrylu (6.3.5.),
- M_s — ilość chloroformu w mg na 10 ml roztworu omówionego w punkcie 6.3.5. (= M_1),
- M_i — ilość acetonitrylu w mg na 10 ml roztworu omówionego w punkcie 6.3.5. (= $1/10 M$).

Obliczyć średnią z otrzymanych wyników.

7.2. Obliczenie zawartości chloroformu

7.2.1. Obliczyć zgodnie z punktem 7.1.1. powierzchnie pików chloroformu i acetonitrylu na chromatogramie otrzymanym w procedurze opisanej w punkcie 6.3.4.

7.2.2. Obliczyć zawartość chloroformu w paście do zębów za pomocą następującego wzoru:

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

w którym:

- $\%X$ — zawartość chloroformu w paście do zębów wyrażona jako procent wagowy,
- A_s — powierzchnia pików chloroformu (6.3.5.),
- A_i — powierzchnia pików acetonitrylu (6.3.5.),
- M_{SX} — masa w mg próbki omówionej w punkcie 6.3.1. (= $1\ 000 \times M_0$),
- M_i — ilość acetonitrylu w mg na 10 ml roztworu otrzymanego zgodnie z punktem 6.3.2. (= $1/10 M$).

Obliczyć średnią oznaczoną zawartość i przedstawić wynik z dokładnością do 0,1%.

8. Powtarzalność

Dla zawartości chloroformu wynoszącej około 3% różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekroczyć bezwzględnej wartości 0,3%.

V. Oznaczanie cynku

1. Cel i zakres metody

Metoda ta jest odpowiednia do oznaczania cynku w kosmetykach, występującego jako chlorek, siarczan lub 4-hydroksybenzenosulfonian lub jako połączenie kilku z tych soli cynkowych.

2. Definicja

Zawartość cynku w próbce jest oznaczana grawimetrycznie jako bis (tlenek 2-metylo-8-chinolinowy) i wyrażana jako procent masowy cynku w próbce.

3. Zasada

Cynk znajdujący się w roztworze jest w środowisku kwaśnym wytrącany jako bis (tlenek 2-metylo-8-chinolinowy) cynkowy. Po odsączeniu osad suszy się i waży.

4. Odczynniki

Wszystkie odczynniki powinny być czystości analitycznej.

4.1. 25% (m/m) stężony amoniak; $d_4^{20} = 0,91$

4.2. Lodowaty kwas octowy

4.3. Octan amonu

4.4. 2-metylocholin-8-ol

4.5. 6% (m/v) roztwór amoniaku.

Przenieść 240 g stężonego amoniaku (4.1.) do 1 000 ml kolby miarowej, uzupełnić wodą destylowaną do kreski i wymieszać.

4.6. 0,2 M roztwór octanu amonu.

Rozpuścić 15,4 g octanu amonu (4.3.) w wodzie destylowanej w kolbie miarowej 1 000 ml, uzupełnić wodą do kreski i wymieszać.

4.7. Roztwór 2-metylocholin-8-olu.

Rozpuścić 5 g 2-metylocholin-8-olu w 12 ml kwasu octowego lodowatego i następnie przenieść z destylowaną wodą do 1 000 ml kolby. Rozcieńczyć wodą do kreski i wymieszać.

5. Aparatura i wyposażenie

5.1. Kolby miarowe, 100 i 1 000 ml

5.2. Zlewki, 400 ml

5.3. Cylindry miarowe, 50 i 150 ml

5.4. Pipety kalibrowane, 10 ml

5.5. Tygły z filtrem G-4

5.6. Kolby próżniowe, 500 ml

5.7. Wodna pompa próżniowa

5.8. Termometr kalibrowany od 0 do 100°C

5.9. Eksykator z odpowiednim środkiem odwadniającym i wskaźnikiem wilgotności, np. żelazem krzemionkowym lub równorzędnym

5.10. Piec do suszenia z temperaturą uregulowaną na $150 \pm 2^\circ\text{C}$

5.11. Pehametr

- 5.12. Ogrzewana płytka
- 5.13. Bibuła filtracyjna, firmy Whatman nr 4 lub równorzędna.
6. Procedura
- 6.1. Do zlewki pojemności 400 ml zważyć 5 do 10 g (M gramów) analizowanej próbki, zawierającej około 50 do 100 mg cynku, dodać 50 ml wody destylowanej i wymieszać.
- 6.1.1. Przesączyć, jeśli potrzeba, z pomocą pompy próżniowej, zachować przesącz.
- 6.1.2. Powtórzyć operację ekstrakcji z dalszymi 50 ml wody destylowanej. Przesączyć i połączyć przesącza.
- 6.2. Dla każdego 10 mg cynku, znajdujących się w roztworze (6.1.2.), dodać 2 ml roztworu 2-metylocholinol-8-olu (4.7.) i wymieszać.
- 6.3. Rozcieńczyć mieszaninę 150 ml wody destylowanej, doprowadzić temperaturę mieszaniny do 60°C (5.12.) i dodać 45 ml 0,2 M roztworu octanu amonu (4.6.), stale mieszając.
- 6.4. Doprowadzić pH roztworu do 5,7—5,9, dodawać mieszając 6% roztwór amoniaku (4.5.), pH roztworu zmierzyć pehametrem.
- 6.5. Odstawić roztwór na 30 minut. Przesączyć z pomocą wodnej pompy próżniowej przez tygiel z filtrem G-4, który wysuszono uprzednio (150°C) i zważono po schłodzeniu (M_0 gramów) i przemyć osad 150 ml wody destylowanej o temperaturze 95°C.
- 6.6. Umieścić tygiel z filtrem w piecu suszącym o temperaturze nastawionej na 150°C i suszyć w ciągu jednej godziny.
- 6.7. Wyjąć filtr z pieca, umieścić w eksykatorze (5.9) i — po schłodzeniu do temperatury pokojowej — oznaczyć masę (M_1 gramów).
7. Obliczenie
- Obliczyć zawartość cynku w próbce jako procent masowy (% m/m) za pomocą następującego wzoru:
- $$\% \text{ cynku} = \frac{(M_1 - M_0) \times 17,12}{M}$$
- w którym:
- M — masa w gramach próbki pobranej do analizy według 6.1.,
- M_0 — masa w gramach pustego i suchego tygla z filtrem (6.5.),
- M_1 — masa w gramach tygla z filtrem i osadem (6.7.).
8. Powtarzalność
- Dla zawartości cynku około 1% (m/m) różnica między wynikami dwu równoległych oznaczeń, wykonywanych dla tej samej próbki, nie powinna przekraczać bezwzględnej wartości 0,1%.

VI. Identyfikacja i oznaczanie kwasu 4-hydroksybenzenosulfonowego

1. Cel i zakres metody
- Metoda jest odpowiednia do identyfikacji i oznaczania kwasu 4-hydroksybenzenosulfonowego w kosmetykach takich, jak aerozole i płyny do twarzy.
2. Definicja
- Zawartość kwasu 4-hydroksybenzenosulfonowego, oznaczona zgodnie z tą metodą, jest wyrażona jako procent wagowy bezwodnego 4-hydroksybenzenosulfonianu cynku w wyrobie.
3. Zasada
- Próbka analityczna zostaje zatężona pod zmniejszonym ciśnieniem, rozpuszczona w wodzie i oczyszczona przez ekstrakcję chloroformem. Kwas 4-hydroksybenzenosulfonowy oznacza się jodometrycznie na części przesączonego roztworu wodnego.
4. Odczynniki
- Wszystkie odczynniki powinny być czystości analitycznej.
- 4.1. 36% (m/m) stężony kwas chlorowodorowy $d_4^{20} = 1,18$
- 4.2. Chloroform
- 4.3. Butan-1-ol
- 4.4. Kwas octowy lodowaty
- 4.5. Jodek potasu
- 4.6. Bromek potasu
- 4.7. Węglan sodu
- 4.8. Kwas sulfanililowy
- 4.9. Azotyn sodu
- 4.10. 0,1 N bromian potasu
- 4.11. 0,1 N roztwór tiosiarczanu sodu
- 4.12. 1% (m/v) wodny roztwór skrobi
- 4.13. 2% (m/v) wodny roztwór węglanu sodu
- 4.14. 4,5% (m/v) wodny roztwór azotynu sodu
- 4.15. 0,05% (m/v) roztwór ditizonu w chloroformie
- 4.16. Roztwór rozwijający : butan-1-ol/kwas octowy lodowaty/woda (4:1:5 części objętościowych); po zmieszaniu w rozdzielaczu oddzielić dolną fazę
- 4.17. Odczynnik Pauly'ego: rozpuścić 4,5 g kwasu sulfanililowego (4.8.) w 45 ml stężonego kwasu chlorowodorowego (4.1.) ogrzewając i rozcieńczyć roztwór wodą do 500 ml. Schłodzić 10 ml roztworu w naczyniu z wodą i lodem i dodać, mieszając, 10 ml zimnego roztworu azotynu sodu (4.14.). Odstawić roztwór na 15 minut w temperaturze 0°C (w tej temperaturze roztwór jest trwały w ciągu jednego do trzech dni) i — bezpośrednio przed spryskiwaniem (7.5.) — dodać 20 ml roztworu węglanu sodu (4.13.).

4.18. Gotowe przygotowane płytki celulozowe do chromatografii cienkowarstwowej; wielkość 20 x 20 cm, grubość warstwy adsorbenta 0,25 mm.

5. Aparatura i wyposażenie

5.1. Okrągłodenne kolby ze szlifowanym korkiem szklanym, 100 ml

5.2. Rozdzielacz, 100 ml

5.3. Kolba stożkowa ze szlifowanym korkiem szklanym, 250 ml

5.4. Biureta, 25 ml

5.5. Pipety ze zbiornikiem gruszkowym, 1, 2 i 10 ml

5.6. Pipeta kalibrowana, 5 ml

5.7. Mikrostrzykawka, 10 µl z kalibracją co 0,1 µl

5.8. Termometr kalibrowany od 0 do 100°C

5.9. Łaźnia wodna z elementem grzewczym

5.10. Piec do suszenia, dobrze przewietrzany i nastawiony na temperaturę 80°C

5.11. Typowe urządzenie do wykonania chromatografii cienkowarstwowej.

6. Przygotowanie próbki

W opisanej poniżej metodzie identyfikacji i oznaczania kwasu hydroksybenzenosulfonowego w aerozolu używana jest pozostałość otrzymana przez usunięcie z pojemnika aerozolu rozpuszczalników i propelentów, które wyparowują pod normalnym ciśnieniem.

7. Identyfikacja

7.1. Nanieść za pomocą mikrostrzykawki (5.7.) po 5 µl pozostałości (6) lub próbki w każdym z sześciu punktów na linii początkowej w odległości 1 cm od dolnej krawędzi płytki do chromatografii cienkowarstwowej (4.18.).

7.2. Umieścić płytkę w komorze rozwijającej, która już zawiera roztwór rozwijający (4.16.) i rozwijać do osiągnięcia przez czoło rozpuszczalnika odległości 15 cm od linii początkowej.

7.3. Wyjąć płytkę z roztworu rozwijającego i wysuszyć w 80°C do momentu, kiedy opary kwasu octowego nie będą wyczuwalne. Spryskać płytkę roztworem węglanu sodu (4.13.) i wysuszyć na powietrzu.

7.4. Przykryć połowę płytki szklaną płytką i spryskać nieprzykrytą część 0,05% roztworem ditizonu (4.15.). Pojawienie się purpurowo-czerwonych plam na chromatogramie wskazuje na obecność jonów cynku.

7.5. Przykryć napryskaną część płytki szklaną płytką i spryskać pozostałą część odczynnikiem Pau-

ly'ego (4.17.). Na obecność kwasu 4-hydroksybenzenosulfonowego wskazuje pojawienie się żółto-brązowych plam o wartości Rf około 0,26, podczas gdy żółta plama o wartości Rf około 0,45 na chromatogramie wskazuje na obecność kwasu 3-hydroksybenzenosulfonowego.

8. Oznaczenie

8.1. Do okrągłodennej kolby pojemności 100 ml odważyć 10 g próbki lub pozostałości (6) i odparować prawie do sucha pod próżnią w wyparce obrotowej na łaźni wodnej o temperaturze 40°C.

8.2. Wprowadzić pipetą do kolby 10 ml (V_1 ml) wody i rozpuścić pozostałość po odparowaniu (8.1.) przez ogrzewanie.

8.3. Ilościowo przenieść roztwór do rozdzielacza (5.2.) i ekstrahować wodny roztwór dwukrotnie porcjami po 20 ml chloroformu (4.2.). Po każdej ekstrakcji odrzucać fazę chloroformową.

8.4. Przesączyć wodny roztwór przez karbowany sączek. Zależnie od oczekiwanej zawartości kwasu hydroksybenzenosulfonowego przenieść pipetą 1,0 lub 2 ml (V_2) przesącza do 250 ml kolby stożkowej (5.3.) i rozcieńczyć wodą do 75 ml.

8.5. Dodać 2,5 ml 36% kwasu chlorowodorowego (4.1.) i 2,5 g bromku potasu (4.6.), zmieszać i doprowadzić temperaturę roztworu do 50°C z pomocą łaźni wodnej.

8.6. Dodawać z biurety 0,1 N roztworu bromianu potasu (4.10.) aż roztwór, stale o temperaturze 50°C, stanie się żółty.

8.7. Dodać dalsze 3,0 ml roztworu bromianu potasu (4.10.), zamknąć kolbę korkiem i pozostawić na 10 minut w łaźni wodnej o temperaturze 50°C. Jeśli po 10 minutach roztwór straci swoją barwę, dodać dalsze 2,0 ml roztworu bromianu potasu (4.10.), zamknąć kolbę korkiem i ogrzewać przez 10 minut w łaźni wodnej, utrzymywanej w temperaturze 50°C. Zanotować całkowitą ilość dodanego roztworu bromianu potasu (a).

8.8. Schłodzić roztwór do temperatury pokojowej, dodać 2 g jodku potasu (4.5.) i wymieszać.

8.9. Odmiareczkować powstały jod 0,1 N roztworem tiosiarczanu sodu (4.11.). Przy końcu miareczkowania dodać kilka kropli roztworu skrobi (4.12.) jako wskaźnika. Zanotować ilość użytego tiosiarczanu sodu (b).

9. Obliczenie

Obliczyć zawartość hydroksybenzenosulfonianu cynku w próbce lub pozostałości (6) jako procent masowy (m/m) za pomocą następującego wzoru:

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

w którym:

a — całkowita ilość w mililitrach dodanego 0,1 N roztworu bromianu potasu (8.7.),

b — ilość w mililitrach 0,1 N roztworu tiosiarczanu sodu (4.11.) użytego do odmiareczkowania (8.9.),

- m — ilość analizowanego produktu lub pozostałości wyrażona w miligramach (8.1.),
- V_1 — objętość roztworu otrzymanego według 8.2. wyrażona w mililitrach,
- V_2 — objętość rozpuszczonej pozostałości po odparowaniu użytej do analizy (8.4.) wyrażona w mililitrach.

W przypadku aerozoli wynik pomiaru w % (m/m) pozostałości (6) musi być wyrażony w odniesieniu do oryginalnego wyrobu. W celu wykonania tej zamiany podano zasady pobierania próbek aerozoli.

10. Powtarzalność

Dla zawartości około 5% hydroksybenzenosulfonianu cynku różnica między wynikami dwu oznaczeń, przeprowadzonych równoległe dla tej samej

próbki, nie powinna przekraczać bezwzględnej wartości 0,5%.

11. Interpretacja wyników

Maksymalna zawartość 4-hydroksybenzenosulfonianu cynku w płynach do twarzy i dezodorantach wynosi 6% (m/m). Sformułowanie to oznacza, że obok zawartości kwasu hydroksybenzenosulfonowego należy oznaczyć zawartość cynku. Pomnożenie obliczonej zawartości hydroksybenzenosulfonianu cynku (9) przez współczynnik 0,1588 daje minimalną zawartość cynku w % (m/m), która teoretycznie musi się znajdować w wyrobie w związku z oznaczoną zawartością kwasu hydroksybenzenosulfonowego. Zawartość cynku — rzeczywiście oznaczona grawimetrycznie — może jednak być wyższa, ponieważ chlorek cynku i siarczan cynku mogą być również używane w kosmetykach.

VII. Identyfikowanie środków utleniających i oznaczanie nadtlenu wodoru w kosmetykach do pielęgnacji włosów

CEL I ZAKRES

Jodometryczne oznaczanie nadtlenu wodoru w kosmetykach jest możliwe jedynie w przypadku nieobecności innych środków utleniających, które uwalniają jod z jodków. W konsekwencji konieczne jest przed jodometrycznym oznaczeniem nadtlenu wodoru wykrycie i zidentyfikowanie innych obecnych środków utleniających. Identyfikacja ta dzieli się na dwa etapy: pierwszy obejmuje nadsiarczany, bromiany i nadtlenek wodoru, a drugi nadtlenek baru.

A. IDENTYFIKOWANIE NADSIARCZANÓW, BROMIANÓW I NADTLENU WODORU

1. Zasada

Nadsiarczan sodu, nadsiarczan potasu i nadsiarczan amonu oraz bromian potasu, bromian sodu i nadtlenek wodoru — pochodzące lub nie z nadtlenu baru — są identyfikowane przez bibułową chromatografię zstępującą, z zastosowaniem dwóch rozpuszczalników rozwijających.

2. Odczynniki

Wszystkie odczynniki powinny być czystości analitycznej.

2.1 0,5% (m/v) wodne roztwory następujących związków:

2.1.1. Nadsiarczan sodu

2.1.2. Nadsiarczan potasu

2.1.3. Nadsiarczan amonu

2.1.4. Bromian potasu

2.1.5. Bromian sodu

2.1.6. Nadtlenek wodoru

2.2. Rozpuszczalnik rozwijający A, etanol 80% (v/v)

2.3. Rozpuszczalnik rozwijający B, benzen - metanol - 3-metylobutan-1-ol - woda (34:38:18:10 obj.)

2.4. Środek wywołujący A, 10% (m/v) wodny roztwór jodku potasu

2.5. Środek wywołujący B, 1% (m/v) wodny roztwór skrobi

2.6. Środek wywołujący C, 10% (m/m) kwas solny

2.7. 4 N kwas solny

3. Aparatura i wyposażenie

3.1. Bibuła chromatograficzna (Whatman Nr 3 i 4 lub ich równoważniki)

3.2. Mikropipeta, 1 μ l

3.3. Kolba miarowa, 100 ml

3.4. Sączone karbowane

3.5. Aparatura do zstępującej chromatografii bibułowej

4. Przygotowanie próbek

4.1. Wyroby rozpuszczalne w wodzie

Przygotować po dwa roztwory każdej próbki przez rozpuszczenie 1 g i 5 g wyrobu kolejno w 100 ml wody. Pobrać po 1 ml każdego z tych roztworów do analizy metodą chromatografii bibułowej opisaną w punkcie 5.

4.2. Wyroby słabo rozpuszczalne w wodzie

Odważyć 1 g i 5 g próbki i zawiesić w 50 ml wody, uzupełnić do 100 ml wodą w obu przypadkach i wymieszać. Przesączyć obie dyspersje przez karbowany lejek (3.4.) i pobrać 1 μ l każdego filtratu do analizy metodą chromatografii bibułowej opisaną w punkcie 5.

4.3. Kremy

Zawiesić 5 g i 20 g każdego wyrobu w 100 ml wody i zastosować dyspersję do wykonania analizy metodą chromatografii bibułowej opisaną w punkcie 5.

5. Metoda

5.1. Umieścić odpowiednią ilość rozpuszczalników A (2.2.) i B (2.3.) w dwóch oddzielnych komorach chromatograficznych w celu przeprowadzenia zstępującej chromatografii bibułowej. Nasycić komory chromatograficzne oparami rozpuszczalników w ciągu co najmniej 24 godzin.

5.2. Nanieść po 1 μ l jednego roztworu próbki i jednego roztworu odniesienia przygotowanych według opisu w punkcie 4 i 2.1. w każdym punkcie startowym paska bibuły chromatograficznej (Whatman Nr 3 lub równoważnik) długości 40 cm i szerokości 20 cm (3.1.) lub innego odpowiedniego formatu i odparować rozpuszczalnik na powietrzu.

5.3. Umieścić pasek chromatograficzny (5.2.) w komorze chromatograficznej z rozpuszczalnikiem rozwijającym A (5.1.) i rozwijać do chwili, kiedy czoło rozpuszczalnika osiągnie odległość 35 cm (około 15 godzin).

5.4. Powtórzyć procedurę opisaną w punkcie 5.2. i 5.3. z użyciem bibuły chromatograficznej (Whatman Nr 4 lub równoważnik) (3.1.) i rozpuszczalnikiem rozwijającym B. Rozdział chromatograficzny prowadzi do chwili, kiedy czoło rozpuszczalnika osiągnie odległość 35 cm (około pięciu godzin).

5.5. Po rozwinięciu wyjąć chromatogramy z komory i wysuszyć na powietrzu.

5.6. Wywołać plamy na chromatogramie przez spryskanie go kolejno:

5.6.1. Środkiem wywołującym A (2.4.) i następnie po krótkim czasie środkiem wywołującym B (2.5.). Plamy nadsiarczanów pojawią się pierwsze na chromatogramie, a następnie wywołane zostają plamy nadtlenu wodoru.

Obrysować plamy ołówkiem.

5.6.2. Środkiem wywołującym C (2.6.) chromatogramy otrzymane zgodnie z opisem w punkcie 5.6.1.; szaroniebieskie plamy na chromatogramie wskażą na obecność bromianów.

5.7. W opisanych powyżej warunkach właściwych dla rozpuszczalników rozwijających A (2.2.) i B (2.3.), wartości R_f dla substancji odniesienia (2.1.) są w przybliżeniu następujące:

roztwór rozwijający A (2.2.)	roztwór rozwijający B (2.3.)	
nadsiarczan sodu	0,40	0,10
nadsiarczan potasu	0,40	0,02 + 0,05
nadsiarczan amonu	0,50	0,10 + 0,20
bromian sodu	0,40	0,20
bromian potasu	0,40	0,10 + 0,20
nadtlenek wodoru	0,80	0,80

B. IDENTYFIKOWANIE NADTLENU BARU

1. Zasada

Nadtlenek baru jest identyfikowany na podstawie powstawania nadtlenu wodoru po zakwaszeniu próbki (A.4.2.) i obecności jonu baru:

— w nieobecności nadsiarczanów (A) przez dodanie rozcieńczonego kwasu siarkowego do części kwaśnego roztworu próbki (B.4.1.), w wyniku czego powstaje biały osad siarczanu baru. Obecność jonów baru w próbce (B.4.1.) jest ponownie potwierdzona metodą chromatografii bibułowej według metody opisanej poniżej (B.5.),

— jeśli równocześnie w próbce obecne są nadtlenek baru i nadsiarczany (B.4.2.) przez poddanie stapaniu pozostałości z roztworu (B.4.2.) w środowisku alkalicznym, po rozpuszczeniu w kwasie solnym, obecność jonów baru w roztworze stopu (B.4.2.3.) stwierdza się metodą chromatografii bibułowej i/lub przez wytrącenie osadu siarczanu baru.

2. Odczynniki

2.1. Metanol

2.2. 36% (m/m) stężony kwas solny

2.3. 6 N kwas solny

2.4. 4 N kwas siarkowy

2.5. Sól sodowa kwasu rodyzonowego (3,4,5,6-tetraokso-cykloheksen-1,2-diolu)

2.6. Chlorek baru ($BaCl_2 \times 2H_2O$)

2.7. Bezwodny węgiel sodu

2.8. 1% (m/v) wodny roztwór chlorku baru

2.9. Rozpuszczalnik rozwijający zawierający metanol, stężony kwas solny (stężenie 36%) i wodę (80:10:10 obj.)

2.10. Środek wywołujący, 0,1% (m/v) wodny roztwór soli disodowej kwasu rodyzonowego, świeżo przygotowany bezpośrednio przed użyciem.

3. Aparatura i wyposażenie

3.1. Mikropipeta, 5 μ l

3.2. Tygły platynowe

3.3. Kolby miarowe, 100 ml

3.4. Bibuła chromatograficzna firmy Schleicher and Schull 2043b lub równoważna. Bibułę oczyszcza się przez pozostawienie jej na noc w komorze chromatograficznej (A.3.5.) zawierającej rozpuszczalnik rozwijający (B.2.9.) i następnie suszy.

3.5. Karbowany sącdek bibułowy

3.6. Aparatura do zstępującej chromatografii bibułowej

4. Przygotowanie próbki

4.1. Wyroby niezawierające nadsiarczanów

4.1.1. Zawiesić 2 g wyrobu w 50 ml wody i doprowadzić kwasem solnym (B.2.3.) pH dyspersji do wartości około 1.

4.1.2. Za pomocą wody przenieść dyspersję do 100 ml kolby miarowej, uzupełnić wodą do kreski i wymieszać. Używać tej dyspersji do analizy metodą chromatografii bibułowej opisanej w punkcie 5 i do identyfikowania obecności baru przez wytrącanie siarczanu.

4.2. Wyroby zawierające nadsiarczany.

4.2.1. Zawiesić 2 g wyrobu w 100 ml wody i przesączyć.

4.2.2. Do wysuszonej pozostałości dodać siedem do dziesięciu razy więcej wagowo węgla sodu (B.2.7.), wymieszać i stapać mieszaninę w tyglu platynowym (B.3.2.) w ciągu pół godziny.

4.2.3. Schłodzić do temperatury pokojowej, rozpuścić stop w 50 ml wody i przesączyć (B.3.5.).

4.2.4. Rozpuścić pozostałość ze stopu w kwasie solnym (B.2.3.) i uzupełnić wodą do 100 ml. Używać tego roztworu do analizy metodą chromatografii bibułowej opisaną w punkcie 5 i do identyfikowania obecności baru przez wytrącanie siarczanu.

5. Metoda

5.1. Umieścić odpowiednią ilość rozpuszczalnika rozwijającego (B.2.9.) w komorze do zstępującej chromatografii bibułowej i wysycić komorę w ciągu co najmniej 15 godzin.

5.2. Na kawałku bibuły chromatograficznej — przygotowanej tak jak opisano w punkcie B.3.4. — nanosić po 5 µl każdego roztworu przygotowanego według punktu B.4.1.2. i B.4.2.4. i roztworu odniesienia B.2.8. w trzech punktach startowych.

5.3. Wysuszyć bibułę z naniesionymi próbkami i roztworem odniesienia na powietrzu. Rozwijać chromatogram do chwili, kiedy czoło rozpuszczalnika osiągnie 30 cm.

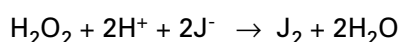
5.4. Wyjąć chromatogram z komory i wysuszyć na powietrzu.

5.5. Wywołać plamy na chromatogramie przez spryskanie bibuły środkiem wywołującym (B.2.10.). W przypadku obecności baru pojawiają się na chromatogramie czerwone plamy o wartości R_f około 0,10.

C. OZNACZANIE NADTLENUKU WODORU

1. Zasada

Jodometryczne oznaczanie nadtlenuku wodoru polega na następującej reakcji:



Przemiana ta zachodzi powoli, lecz można ją przyspieszyć przez dodatek molibdenianu amonu. Ilość powstałego jodu jest oznaczona miareczkowo tiosiarczanem sodu i stanowi miarę zawartości nadtlenuku wodoru.

2. Definicja

Zawartość nadtlenuku wodoru oznaczona w sposób opisany poniżej jest wyrażona jako procent masowy (%m/m) wyrobu.

3. Odczynniki

Wszystkie odczynniki powinny być czystości analitycznej

3.1. 2 N kwas siarkowy

3.2. Jodek potasu

3.3. Molibdenian amonu

3.4. 0,1 N tiosiarczan sodu

3.5. 10% (m/v) roztwór jodku potasu, świeżo przygotowany bezpośrednio przed użyciem

3.6. 20% (m/v) roztwór molibdenianu amonu

3.7. 1% (m/v) roztwór skrobi

4. Aparatura i wyposażenie

4.1. Zlewki, 100 ml

4.2. Biureta, 50 ml

4.3. Kolby miarowe, 250 ml

4.4. Cylindry miarowe, 25 i 100 ml

4.5. Pipety z jednym oznaczeniem objętości, 10 ml

4.6. Kolby stożkowe, 250 ml

5. Metoda

5.1. Odważyć około 10 g (m gramów) wyrobu zawierającego około 0,6 g nadtlenuku wodoru w zlewce 100 ml. Przenieść zawartość zlewki z pomocą wody do kolby miarowej 250 ml, uzupełnić wodą do kreski i wymieszać.

5.2. Odmierzyć pipetą 10 ml roztworu próbki (5.1.) do 250 ml kolby stożkowej (4.6.) i dodawać kolejno 100 ml 2 N kwasu siarkowego (3.1.), 20 ml roztworu jodku potasu (3.5.) i trzy krople roztworu molibdenianu amonu (3.6.).

5.3. Odmiareczkować powstały jod bezzwłocznie 0,1 N roztworem tiosiarczanu sodu (3.4.) i bezpośrednio przed osiągnięciem punktu końcowego dodać kilka mililitrów roztworu skrobi jako wskaźnika (3.7.). Zarejestrować zużycie 0,1 N roztworu tiosiarczanu sodu (3.4.) w mililitrach (V).

5.4. Wykonać według sposobu opisanego w punkcie 5.2. i 5.3. analizę ślepej próby, zastępując 10 ml roztworu próbki 10 ml wody. Zarejestrować zużycie 0,1 N roztworu tiosiarczanu sodu w analizie ślepej próby (V₀ ml).

6. Obliczenie

Obliczyć zawartość nadtlenuku wodoru w wyrobie w procentach masowych (% m/m) według następującego wzoru:

$$\begin{aligned} \% \text{ nadtlenuku wodoru} &= \frac{(V - V_0) \times 1,7008 \times 250 \times 100}{m \times 10 \times 1\,000} = \\ &= \frac{(V - V_0) \times 4,252}{m} \end{aligned}$$

w którym:

m — ilość analizowanego wyrobu (5.1.),

V₀ — zużycie 0,1 N roztworu tiosiarczanu sodu do analizy ślepej próby w mililitrach (5.4.),

V — zużycie 0,1 N roztworu tiosiarczanu sodu do analizy roztworu próbki w mililitrach (5.3.).

7. Powtarzalność

Dla wyrobu zawierającego około 6% (m/m) nadtlenu wodoru różnica pomiędzy wynikami dwóch ozna-

czeń przeprowadzonych równoległe dla tej samej próbki nie powinna przekraczać wartości bezwzględnej 0,2%.

VIII. Identyfikowanie i oznaczanie azotynów

A. IDENTYFIKOWANIE

1. Cel i zakres

Metoda jest odpowiednia do identyfikowania azotynu w kosmetykach, szczególnie w kremach i pastach.

2. Zasada

Na obecność azotynu wskazuje powstawanie barwnych pochodnych z fenylohydrazonem aldehydu 2-aminobenzoesowego (Nitrin®).

3. Odczynniki

Wszystkie odczynniki powinny być czystości analitycznej.

3.1. Rozcieńczony kwas siarkowy; rozcieńczyć 2 ml stężonego kwasu siarkowego ($d_4^{20} = 1,84$) w 11 ml wody destylowanej.

3.2. Rozcieńczony kwas solny: rozcieńczyć 1 ml stężonego kwasu solnego ($d_4^{20} = 1,19$) w 11 ml wody destylowanej.

3.3. Metanol

3.4. Roztwór fenylohydrazonu aldehydu 2-aminobenzoesowego (odczynnik Nitrin®) w metanolu. Odważyć 2,0 g Nitrinu® i przenieść ilościowo do 100 ml kolby miarowej. Dodać kroplami 4 ml rozcieńzonego kwasu solnego (3.2.) i wytrząsać. Uzupełnić do kreski metanolem i mieszać do chwili, aż roztwór stanie się całkowicie przezroczysty. Przechowywać roztwór w brązowej szklanej butli (4.3.).

4. Aparatura

4.1. Zlewki, 50 ml

4.2. Kolba miarowa, 100 ml

4.3. Butla z brązowego szkła, 125 ml

4.4. Płytką szklana, 10x10 cm

4.5. Łopatką z tworzywa sztucznego

4.6. Bibuła filtracyjna, 10 x 10 cm

5. Procedura

5.1. Rozsmarować część badanej próbki równomiernie na płytce szklanej (4.4.), tak aby pokryć powierzchnię do grubości nie większej niż 1 cm.

5.2. Zanurzyć część arkusza bibuły filtracyjnej (4.6.) w wodzie destylowanej. Położyć ją na próbce i przycisnąć bibułę filtracyjną łopatką z tworzywa sztucznego (4.5.).

5.3. Odczekać około jednej minuty i nanieść na środek bibuły filtracyjnej:

Dwie krople rozcieńzonego kwasu siarkowego (3.1.) i następnie dwie krople roztworu Nitrinu® (3.4.).

5.4. Po 5 do 10 sekundach zdjęć bibułę filtracyjną i obejrzeć ją w świetle dziennym. Czerwonawopurpurowe zabarwienie wskazuje na obecność azotynu. Jeśli zawartość azotynu jest niewielka, czerwonawopurpurowa barwa zmienia się w żółtą po 5 do 15 sekundach. Jeśli obecne są duże ilości azotynu, taka zmiana barwy zachodzi dopiero po 1 do 2 minut.

6. Intensywność czerwonawopurpurowej barwy i czas, który upływa przed jej zmianą na żółtą może być wskazówką do oceny zawartości azotynu w próbce.

B. OZNACZANIE AZOTYNÓW

1. Cel

Metoda opisuje znaczenie azotynów w kosmetykach

2. Definicja

Zawartość azotynów w próbce, oznaczona zgodnie z tą metodą, jest wyrażona w % masowych azotynu sodu.

3. Zasada

Po rozcieńczeniu próbki wodą i wyklarowaniu roztworu azotyn obecny w próbce jest poddany reakcji z sulfaniloamidem i N-1-naftyloetylenodiaminą i oznacza się gęstość optyczną otrzymanej barwy przy 538 nm.

4. Odczynniki

Wszystkie odczynniki powinny być czystości analitycznej.

4.1. Odczynniki klarujące: odczynniki te nie mogą być używane dłużej niż w ciągu tygodnia po przygotowaniu:

4.1.1. Odczynnik I Carreza:

Rozpuścić 106 g cyjanożelazianu potasu (II), $K_4Fe(CN)_6 \times 3 H_2O$ w wodzie destylowanej i rozcieńczyć wodą do 1 000 ml.

4.1.2. Odczynnik II Carreza:

Rozpuścić 219,5 g octanu cynku, $Zn(CH_3COO)_2 \times 2 H_2O$ i 30 ml lodowatego kwasu octowego w wodzie destylowanej i rozcieńczyć wodą do 1 000 ml.

4.2. Roztwór azotynu sodu:

Rozpuścić 0,500 g azotynu sodu w wodzie destylowanej w kolbie miarowej 1 000 ml i rozcieńczyć wodą do kreski, rozcieńczyć 10,0 ml tego bazowego standardowego roztworu do 500 ml; 1 ml tego roztworu = 10 mikrogramów $NaNO_2$.

4.3. 1N roztwór wodorotlenku sodu

- 4.4. 0,2% chlorowodorku sulfaniloamidu: rozpuścić 2,0 g sulfaniloamidu w 800 ml wody podczas ogrzewania. Schłodzić i dodać mieszając 100 ml stężonego kwasu solnego. Rozcieńczyć wodą do 1 000 ml.
- 4.5. 5 N kwas solny
- 4.6. Odczynnik N-1-naftyłowy
- Ten roztwór musi być przygotowany w dniu zastosowania. Rozpuścić 0,1 g chlorowodorku N-1-naftylenodiaminy w wodzie i rozcieńczyć wodą do 100 ml.
5. Aparatura
- 5.1. Waga analityczna
- 5.2. Kolby miarowe 100, 250, 500 i 1 000 ml
- 5.3. Pipety ze zbiornikiem lub kalibrowane
- 5.4. Cylindry miarowe 100 ml
- 5.5. Sączki filtracyjne karbowane o średnicy 15 cm, niezawierające azotynów
- 5.6. Łaźnia wodna
- 5.7. Spektrofotometr z naczynkami pomiarowymi o długości drogi optycznej 1 cm
- 5.8. Pehametr
- 5.9. Mikrobiureta, 10 ml
- 5.10. Zlewki, 250 ml.
6. Procedura
- 6.1. Odważyć około 0,5 g (m gramów) z dokładnością do 0,1 mg homogenizowanej próbki, przenieść z pomocą gorącej wody destylowanej ilościowo do 250 ml zlewki (5.10.) i uzupełnić objętość gorącą wodą destylowaną do około 150 ml. Umieścić zlewkę (5.10) w łaźni wodnej (5.6.) o temperaturze 80°C na pół godziny. Podczas tego okresu od czasu do czasu potrząsać zlewkę.
- 6.2. Schłodzić do temperatury pokojowej i dodawać kolejno, podczas mieszania, 2 ml odczynnika I Carreza (4.1.1.) i 2 ml odczynnika II Carreza (4.1.2.).
- 6.3. Dodawać 1 N roztwór wodorotlenku sodu (4.3.) aż do uzyskania pH 8,3 (Używać pehametru (5.8.)). Przenieść zawartość ilościowo do 250 ml kolby miarowej (5.2.) i uzupełnić do kreski wodą destylowaną.
- 6.4. Wymieszać zawartość i przesączyć przez sączek karbowany (5.5).
- 6.5. Przenieść pipetą (5.3.) odpowiednią ilość (V ml) klarownego przesączu, lecz nie więcej niż 25 ml, do 100 ml kolby miarowej (5.2.) i dodać wody destylowanej do objętości 60 ml.
- 6.6. Po zmieszaniu dodać 10,0 ml roztworu chlorowodorku sulfaniloamidu (4.4.) i następnie 6,0 ml 5N roztworu kwasu solnego (4.5.). Wymieszać i pozostawić do odstania na pięć minut. Dodać 2 ml odczynnika N-1-naftyłowego (4.6.), wymieszać i pozostawić do odstania na trzy minuty. Rozcieńczyć wodą do kreski i wymieszać.
- 6.7. Przygotować ślepą próbę, powtarzając operację 6.5. i 6.6. bez dodawania odczynnika N-1-naftyłowego (4.6.).
- 6.8. Zmierzyć za pomocą spektrofotometru (5.7.) gęstość optyczną przy 538 nm roztworu otrzymanego według punktu 6.6, używając ślepej próby (6.7.) jako odnośnika.
- 6.9. Odczytać z wykresu kalibracyjnego (6.10.) zawartość azotynu sodu w mikrogramach na 100 ml roztworu (m_1 mikrogramów), która odpowiada gęstości optycznej zmierzonej w punkcie 6.8.
- 6.10. Przygotować wykres kalibracyjny dla stężeń 0, 20, 40, 60, 80, 100 μg azotynu sodu w 100 ml, stosując roztwór azotynu sodowego o stężeniu 10 μg na ml (4.2.).
7. Obliczenia
- Obliczyć zawartość azotynu sodu w procentach masowych za pomocą następującego wzoru:
- $$\begin{aligned} \%(m/m) \text{ NaNO}_2 &= \frac{250}{V} \times m_1 \times 10^{-6} \times \frac{100}{m} \\ &= \frac{m_1}{V \times m \times 40} \end{aligned}$$
- w którym:
- m — masa próbki pobranej do analizy w gramach,
 - m_1 — zawartość azotynu sodu w mikrogramach oznaczona w punkcie 6.9,
 - V — ilość m_1 przesączu użytego do pomiaru (6.5.).
8. Powtarzalność
- Dla zawartości około 0,2% m/m azotynu sodu różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekroczyć wartości absolutnej 0,005%.

IX. Identyfikacja i oznaczanie wolnych wodorotlenków sodu i potasu

1. Cel i zakres metody

Metoda podaje dokładną procedurę identyfikacji kosmetyków zawierających znaczne ilości wodorotlenków sodu i/lub potasu i oznaczania takich wolnych wodorotlenków sodu i/lub potasu w środkach do prostowania włosów i rozpuszczalnikowych środkach do usuwania skórek paznokci.

2. Definicja

Wolny wodorotlenek sodu i potasu są określane objętością (ilością) standardowego roztworu kwasu, wymaganą do zobojętnienia produktu w podanych warunkach; otrzymana ilość wyraża się jako % m/m wolnego wodorotlenku.

3. Zasady

Próbka zostaje rozpuszczona lub zdyspergowana w wodzie i miareczkowana standardowym roztworem kwasu. Wartość pH jest rejestrowana równocześnie z dodawaniem kwasu do roztworu wodorotlenku sodu lub potasu: punktem końcowym jest wyraźny wzrost szybkości zmian wartości pH. Krzywa miareczkowania może być niewyraźna w obecności:

- (a) amoniaku lub innych słabych zasad organicznych, które same mają raczej spłaszczoną krzywą miareczkowania z kilkoma punktami przegięcia. W tej metodzie amoniak usuwa się przez odparowanie pod zmniejszonym ciśnieniem, ale w pokojowej temperaturze,
- (b) soli słabych kwasów, które mogą powodować wzrost krzywej miareczkowania z kilkoma punktami przegięcia. W tych przypadkach tylko pierwsza część krzywej do pierwszego z tych punktów przegięcia odpowiada zobojętnianiu jonu wodorotlenowego pochodzącego z wolnego wodorotlenku sodu lub potasu. Podano inną procedurę miareczkowania, odpowiednią dla przypadku, gdy zauważa się nadmierne oddziaływanie soli słabych kwasów nieorganicznych. Chociaż istnieje teoretyczna możliwość, że inne rozpuszczalne mocne zasady, np. wodorotlenek litu, czwartorzędowy wodorotlenek amonu, mogłyby być obecne, dając wzrost pH do wysokich wartości, jednak obecność ich w tym rodzaju kosmetyków jest wysoce nieprawdopodobna.

4. Identyfikowanie

4.1. Odczynniki

4.1.1. Standardowy alkaliczny roztwór buforowy o pH 9.18 w 25°C 0.05M roztwór tetraboranu sodu.

4.2. Aparatura

4.2.1. Zwyczajne szklane wyposażenie laboratoryjne

4.2.2. Pehametr

4.2.3. Szklana elektroda membranowa

4.2.4. Standardowa kalomelowa elektroda odniesienia

4.3. Procedura

Skalibrować pehametr za pomocą elektrod z zastosowaniem standardowego roztworu buforowego. Przygotować 10% roztwór lub dyspersję analizowanego wyrobu w wodzie i przesączyć go. Zmierzyć pH. Jeżeli pH wynosi 12 lub więcej, należy wykonać ilościowe oznaczenie.

5. Oznaczanie

5.1. Miareczkowanie w środowisku wodnym

5.1.1. Odczynnik

5.1.1.1. Standardowy 0.1 N kwas chlorowodorowy

5.1.2. Aparatura

5.1.2.1. Zwyczajne szklane wyposażenie laboratoryjne

5.1.2.2. Pehametr, korzystnie, jeśli wyposażony w rejestrator

5.1.2.3. Szklana elektroda membranowa

5.1.2.4. Standardowa kalomelowa elektroda odniesienia

5.1.3. Procedura

Zwarzyć dokładnie w zlewce o pojemności 150 ml próbkę o wielkości 0.5—1.0 g. Jeżeli w próbce znajduje się amoniak, dodać kilka ziaren porowatych, umieścić zlewkę w eksykatorze próżniowym, usuwać amoniak za pomocą pompy wodnej tak długo, aż zapach jego będzie niewyczuwalny (około trzech godzin). Dodać 100 ml wody, rozpuścić lub zdyspergować pozostałość i miareczkować 0.1 N roztworem kwasu chlorowodorowego (5.1.1.1.), rejestrując zmiany pH (5.1.2.2.).

5.1.4. Obliczanie

Umieścić punkty przegięcia na krzywych miareczkowania. Jeżeli pierwszy punkt przegięcia występuje przy pH niższym niż 7, próbka nie zawiera wodorotlenku sodu lub potasu. Jeżeli na krzywej znajdują się dwa lub więcej punktów przegięcia, tylko pierwszy punkt ma znaczenie. Zanotować objętość roztworu zużytego do miareczkowania do pierwszego punktu przegięcia.

Oznaczyć symbolem V objętość roztworu zużytego do miareczkowania, w ml.

Oznaczyć symbolem M masę próbki analitycznej, w gramach. Zawartość wodorotlenku sodu i/lub potasu w próbce wyrażoną jako % (m/m) wodorotlenku sodu oblicza się, stosując wzór:

$$\% (m/m) = 0.4 \frac{V}{M}$$

Może powstać sytuacja, w której pomimo oznak obecności znaczącej ilości wodorotlenków sodu i/lub potasu krzywa miareczkowania nie wykazuje wyraźnego punktu przegięcia. W takim wypadku należy powtórzyć oznaczenie w izopropanolu.

5.2. Miareczkowanie w izopropanolu

5.2.1. Odczynniki

5.2.1.1. Izopropanol

5.2.1.2. Standardowy 1.0 N roztwór wodny kwasu chlorowodorowego

5.2.1.3. 0.1 N roztwór kwasu chlorowodorowego w izopropanolu przygotowany bezpośrednio przed użyciem przez rozcieńczenie 1.0 N wodnego roztworu kwasu chlorowodorowego izopropanolem.

5.2.2. Aparatura

5.2.2.1. Zwyczajne szklane wyposażenie laboratoryjne

5.2.2.2. Pehametr, korzystnie, jeśli z rejestratorem

5.2.2.3. Szklana elektroda membranowa

5.2.2.4. Standardowa kalomelowa elektroda odniesienia

5.2.3. Procedura

Odważyć dokładnie w zlewce o pojemności 150 ml próbkę o wielkości 0.5—1.0 g. Jeżeli w próbce znajduje się amoniak, dodać kilka zia-

ren porowatych, umieścić zlewkę w eksykatorze próżniowym, usuwać amoniak za pomocą pompy wodnej tak długo, aż zapach jego będzie niewyczuwalny (około trzech godzin). Dodać 100 ml izopropanolu, rozpuścić lub zdyspergować pozostałość i miareczkować 0.1 N roztworem kwasu chlorowodorowego w izopropanolu (5.2.1.3.), rejestrując zmiany pH (5.2.2.2.).

5.2.4. Obliczenia

Jak w punkcie 5.1.4. Pierwszy punkt przeięcia występuje przy odczytanej wartości pH około 9.

5.3. Powtarzalność

Dla wodorotlenku sodu lub potasu na poziomie 5% m/m wyrażonym jako wodorotlenek sodu różnica między wynikami dwóch oznaczeń wykonywanych równolegle na tej samej próbce nie powinna przekraczać wartości bezwzględnej 0.25%.

X. Oznaczanie dichlorometanu oraz 1,1,1-trichloroetanu

1. Cel i zakres stosowania

Metoda opisuje oznaczanie dichlorometanu (chlorku metylenu) i 1,1,1-trichloroetanu (metylochloformu) we wszystkich kosmetykach mogących zawierać te rozpuszczalniki.

2. Definicja

Zawartość dichlorometanu i 1,1,1-trichloroetanu w próbce wyrobu oznaczana zgodnie z tą metodą jest wyrażona w procentach masowych.

3. Zasada

W metodzie używana jest chromatografia gazowa z chloroformem jako wewnętrznym standardem.

4. Odczynniki

Wszystkie odczynniki muszą być czystości analitycznej.

4.1. Chloroform (CHCl₃)

4.2. Cząsteczka węgla (CCl₄)

4.3. Dichlorometan (CH₂Cl₂)

4.4. 1,1,1-Trichloroetan (CH₃CCl₃)

4.5. Aceton

4.6. Azot

5. Aparatura

5.1. Typowe wyposażenie laboratoryjne

5.2. Chromatograf gazowy wyposażony w detektor przewodnictwa termicznego

5.3. Butelka do przenoszenia 50 do 100 ml

5.4. Ciśnieniowa strzykawka gazowa, 25 lub 50 µl

6. Procedura

6.1. Próbkę pod normalnym ciśnieniem: odważyć dokładnie próbkę w kolbie stożkowej zamykanej korkiem. Wprowadzić dokładnie zważoną ilość chloroformu (4.1) jako standard wewnętrzny równoważny przewidywanej ilości dichlorometanu i 1,1,1-trichloroetanu zawartych w próbce. Dokładnie wymieszać.

6.2. Próbkę pod zwiększonym ciśnieniem: zastosować metodę pobierania próbek opisaną w rozdziale o pobieraniu próbek, ale z następującymi poprawkami:

6.2.1. Po przeniesieniu próbki do butelki do przenoszenia (5.3.) wprowadzić następnie do tej butelki pewną objętość chloroformu (4.1.) jako standard wewnętrzny równoważny przewidywanej ilości dichlorometanu i/lub 1,1,1-trichloroetanu zawartych w próbce. Dokładnie wymieszać. Przemyc martwą objętość zaworu 0.5 ml czterochlorku węgla (4.2.). Po wysuszeniu oznaczyć dokładnie dodaną masę standardu wewnętrznego jako różnicę.

6.2.2. Po napełnieniu strzykawki próbką dysza strzykawki powinna być przepłukana azotem (4.6.), tak aby żadna pozostałość próbki nie została w niej przed wprowadzeniem do chromatografu.

6.2.3. Po każdym pobraniu próbki powierzchnia zaworu i część przenosząca powinny być przepłukane kilkakrotnie acetonem (4.5.) (z użyciem strzykawki do iniekcji podskórnych) i wysuszone dokładnie azotem (4.6.).

6.2.4. Dla każdej analizy należy wykonać pomiary z użyciem dwóch różnych butelek do przenoszenia i powtarzać pięciokrotnie pomiary dla każdej butelki.

7. Warunki analizy chromatograficznej

7.1. *Kolumna wstępna:* połączenia rurowe: stal nierdzewna, długość: 300 mm, średnica: 3 lub 6 mm. Wypełnienie: to samo, które jest używane do wypełnienia kolumny analitycznej.

7.2. Kolumna

Faza stacjonarna jest przygotowana z Hallcomidu M18 osadzonego na chromosorbie. Kolumna powinna mieć zdolność rozdzielczą „R” równą lub wyższą niż 1,5

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

oznaczono:

r_1 i r_2 = czasy retencji (w minutach)

W_1 i W_2 = szerokość pików w połowie wysokości (w milimetrach)

d' = szybkość przesuwu papieru (w milimetrach na minutę)

7.3 Poniższe (przykładowe) kolumny spełniają wymagania metody:

7.4

Kolumna	I	II
materiał:	rurka ze stali nierdzewnej	rurka ze stali nierdzewnej
długość:	350 cm	400 cm
średnica:	3 mm	6 mm
nośnik:		
chromosorb:	WAW	WAW-DMCS-HP
analiza sitowa:	100 do 120 mesh	60 do 80 mesh
faza stacjonarna:	Hallcomid M18, 10%	Hallcomid M18, 20%

Warunki temperaturowe mogą się różnić zależnie od aparatu. W przykładach ustalono je następująco:

Kolumna:	I	II
temperatury:		
kolumna:	65°C	75°C
dozownik:	150°C	125°C
detektor:	150°C	200°C
gaz nośny:		
szybkość przepływu helu:	45 ml/min	60ml/min
ciśnienie wlotowe:	2,5 bara	2 bary
dozowanie:	15 µl	15 µl

8. Mieszanina do ustalenia współczynnika korekcyjnego

Sporządzić następującą dokładnie odważoną mieszaninę w kolbie stożkowej z korkiem: dichlorometan (4.3.) 30% (m/m), 1,1,1-trichloroetan (4.4.), 35% (m/m), chloroform (4.1.), 35% (m/m).

9. Obliczenia

9.1. Obliczenie współczynnika korekcyjnego substancji „p” w stosunku do substancji „a” wybranej jako standard wewnętrzny

Podać najpierw substancję oznaczoną „p”, gdzie:

- k_p = jej współczynnik korekcyjny,
- m_p = jej masa w mieszaninie,
- A_p = powierzchnia jej piku,

Podać następnie substancję „a”, gdzie:

- k_a = jej współczynnik odpowiedzi (przyjęty za jedność),
- M_a = jej masa w mieszaninie,
- A_a = powierzchnie jej piku,

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

Jako przykłady otrzymano następujące współczynniki korekcyjne (dla chloroformu $k = 1$)

- Dichlorometan: $k_1 = 0,78 \pm 0,03$
- 1,1,1-trichloroetan: $k_2 = 1,00 \pm 0,03$

9.2. Obliczyć % (m/m) dichlorometanu i 1,1,1-trichloroetanu w analizowanej próbce:

Przyjęto:

- m_a = masa (w gramach) wprowadzonego chloroformu,
- M_s = masa (w gramach) analizowanej próbki,
- A_a = powierzchnia piku chloroformu,
- A_1 = powierzchnia piku dichlorometanu,
- A_2 = powierzchnia piku 1,1,1-trichloroetanu,

następnie:

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

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

XI. Oznaczanie rezorcyny w szamponach i płynach do włosów

1. Cel i zakres

Metoda podaje opis oznaczania rezorcyny metodą chromatografii gazowej w szamponach i płynach do włosów. Metoda jest odpowiednia dla stężeń od 0,1 do 2,0% masowych w próbce.

2. Definicja

Zawartość rezorcyny w próbce określona tą metodą jest wyrażana jako procent masowy.

3. Zasada

Rezorcyna i 3,5-dihydroksytoluen (5-metylorezorcyna) dodawany jako standard wewnętrzny są wydzielone z próbki metodą chromatografii cienkowarstwowej. Oba związki są izolowane przez zdrapywanie ich plam z płytki cienkowarstwowej i ekstrahowanie metanolem. Na zakończenie ekstrahowane związki suszy się, siluluje i oznacza metodą chromatografii gazowej.

4. Odczynniki

Wszystkie odczynniki muszą być czystości analitycznej

4.1. Kwas solny 25% (m/m)

4.2. Metanol

4.3. Etanol 96% (v/v)

4.4. Gotowe płytki do chromatografii cienkowarstwowej (TLC) (pokryte żelom krzemionkowym, tworzywowe lub aluminiowe) ze wskaźnikiem fluorescencyjnym. Należy dezaktywować płytki w następujący sposób: spryskać zwykle pokryte żelom krzemionkowym płytki wodą do chwili, aż staną się szkliste. Pozostawić spryskane płytki do wyschnięcia w temperaturze pokojowej na jedną do trzech godzin.

Uwaga. Jeśli płytki nie zostaną dezaktywowane, mogą wystąpić straty rezorcyny na skutek nieodwracalnej adsorpcji na żelu krzemionkowym.

4.5. Roztwór rozwijający: aceton-chloroform-kwas octowy (20 : 75 : 5 obj.)

4.6. Standardowy roztwór rezorcyny: rozpuścić 400 mg rezorcyny w 100 ml 96 % etanolu (4.3.) (1 ml odpowiada 4 000 µg rezorcyny).

4.7. Roztwór standardu wewnętrznego: rozpuścić 400 mg 3,5-dihydroksytoluenu (DHT) w 100 ml 96% etanolu (4.3.) 1 ml odpowiada 4 000 µg DHT).

4.8. Mieszanina standardowa: zmieszać 10 ml roztworu (4.6.) i 10 ml roztworu (4.7.) w 100 ml kolbie miarowej, uzupełnić 96% etanolem (4.3.) do kreski i wymieszać (1 ml odpowiada 400 µg rezorcyny i 400 µg DHT).

4.9. Środki sililujące:

4.9.1. N,O-bis-(trimetylosililo)trójfluoroacetamid (BSTFA)

4.9.2. Sześciometylodisilazan (HMDS)

4.9.3. Trimetylochlorosilan (TMCS)

5. Aparatura

5.1. Zwykle wyposażenie do chromatografii cienkowarstwowej i gazowej

5.2. Szkło laboratoryjne

6. Procedura

6.1. Przygotowanie próbek

6.1.1. Zważyć dokładnie do 150 ml zlewki próbkę analityczną (m gramów) produktu, która zawiera około 20 do 50 mg rezorcyny.

6.1.2. Zakwaszać kwasem solnym (4.1.) dopóki mieszanina nie stanie się kwaśna (średnio potrzeba 2 do 4 ml), dodać 10 ml (40 mg DHT) roztworu standardu wewnętrznego (4.7.) i wymieszać. Przenieść z etanolem (4.3.) do 100 ml kolby miarowej, uzupełnić do kreski etanolem i wymieszać.

6.1.3. Nanieść 250 µl roztworu (6.1.2.) na zdezaktywowaną płytkę z żelom krzemionkowym (4.4.) jako ciągłą linię o długości około 8 cm. Należy zadbać o to, aby otrzymać linię tak wąską, jak jest to możliwe.

6.1.4. Nanieść 250 µl mieszaniny standardowej (4.8.) na tę samą płytkę w ten sam sposób (6.1.3.).

6.1.5. Nakroplic w dwóch punktach linii początkowej po 5 µl każdego z roztworów (4.6. i 4.7.) dla ułatwienia umiejscowienia po rozwinięciu płytki.

6.1.6. Rozwijać płytkę w komorze bez arkusza bibuły (niewysyconej) zawierającej rozpuszczalnik rozwijający (4.5.) do chwili, kiedy czoło rozpuszczalnika osiągnie linię w odległości 12 cm od linii początkowej; zwykle trwa to około 45 minut. Wysuszyć płytkę na powietrzu i umiejscowić strefę rezorcyny/DHT w świetle nadfioletowym o krótkich falach (254 nm). Te dwa związki mają zwykle te same wartości R_f. Oznaczyć pasma ołówkiem w odległości 2 mm od zewnętrznej linii brzowej pasm. Usunąć te strefy z płytki i zebrać adsorbent z każdego pasma w kolbie 10 ml.

6.1.7. Ekstrahować adsorbent zawierający próbkę i adsorbent zawierający mieszaninę standardową, każdy w następujący sposób: dodać 2 ml metanolu (4.2.) i ekstrahować w ciągu jednej godziny z ciągłym mieszaniem. Przesączyć mieszaninę i powtórzyć ekstrakcję w ciągu dalszych 15 minut z 2 ml metanolu.

6.1.8. Połączyć ekstrakty i odparować rozpuszczalnik, susząc przez noc w eksykatorze próżniowym zawierającym odpowiedni środek suszący. Nie korzystać z żadnego ogrzewania.

6.1.9. Sililować pozostałość (6.1.8.), jak wskazano w punkcie 6.1.9.1. i 6.1.9.2.

6.1.9.1. Dodać 200 µl BSTFA (4.9.1.) mikrostrzykawką i pozostawić mieszaninę w zamkniętym naczyniu na 12 godzin w temperaturze pokojowej.

6.1.9.2. Dodać 200 µl HMDS (4.9.2.) i 100 µl TMCS (4.9.3.) mikrostrzykawką i ogrzewać mieszaninę w ciągu 30 minut w 60°C w zamkniętym naczyniu. Schłodzić mieszaninę.

6.2. Chromatografia gazowa

6.2.1. Warunki chromatograficzne

Kolumna musi mieć zdolność rozdzielczą R równą lub lepszą niż 1,5, gdzie:

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

w którym:

- r_1 i r_2 — czasy retencji w minutach dwóch pików,
 w_1 i w_2 — szerokości tych dwóch pików w poziomie wysokości, w mm,
 d' — szybkość przesuwu papieru w mm na minutę.

Następujące kolumny i warunki chromatografii gazowej uznano za odpowiednie:

Kolumna — materiał: stal kwasoodporna, długość 200 cm, średnica wewnętrzna: ~ 3 mm, wypełnienie: 10% OV-17 na Chromosorbie WAW 100 do 120 mesh.

Detektor płomieniowo-jonizacyjny — temperatury: kolumna 185°C (izotermiczna), detektor 250°C, dozownik 250°C, gaz nośny — azot, przepływ 45 ml/min.

Dla ustawienia przepływów wodoru i powietrza należy przestrzegać instrukcji producentów.

6.2.2. Wprowadzić strzykawką 1 do 3 µl roztworów otrzymanych w punkcie 6.1.9. do chromatografu

gazowego. Wykonać pięć iniekcji dla każdego roztworu (6.1.9.), zmierzyć powierzchnię pików, obliczyć średnią wartość i stosunek powierzchni pików: S = powierzchnia pików rezorcyny/powierzchnia pików DHT.

7. Obliczenia

Stężenie rezorcyny w próbce, wyrażone w procentach masowych (% m/m) jest wyrażone przez wzór:

$$\% \text{ (m/m) rezorcyny} = \frac{4}{M} \times \frac{S \text{ próbki}}{S \text{ mieszaniny standardowej}}$$

w którym:

- M — próbka analityczna w gramach (6.1.1.)
 S próbki — średni stosunek powierzchni pików według 6.2.2. dla roztworu próbki
 S mieszaniny standardowej — średni stosunek powierzchni pików według 6.2.2. dla mieszaniny standardowej.

8. Powtarzalność

Dla zawartości rezorcyny około 0,5% różnica między wynikami dwu równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekroczyć wartości absolutnej 0,025%.

XII. Oznaczanie metanolu w stosunku do etanolu lub propan-2-olu

1. Cel i zakres

Metoda opisuje analizę metanolu metodą chromatografii gazowej we wszystkich kosmetykach (łącznie z aerozolowymi). Oznaczać można względne poziomy stężenia od 0 do 10%.

2. Definicja

Zawartość metanolu oznaczana tą metodą wyrażana jest w procentach masowych metanolu w stosunku do etanolu lub propan-2-olu.

3. Zasada

Oznaczenie wykonuje się metodą chromatografii gazowej.

4. Odczynniki

Należy używać odczynników analitycznych.

4.1. Metanol

4.2. Absolutny etanol

4.3. Propan-2-ol

4.4. Chloroform, z którego usunięto alkohole przez płukanie wodą

5. Aparatura

5.1. Chromatograf gazowy z detektorem katarometrycznym dla aerozoli, z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym dla próbek nieaerolowych.

5.2. Kolby miarowe, 100 ml

5.3. Pipety, 2 ml, 20 ml, od 0 do 1 ml

5.4. Mikrostrzykawki 0 do 100 µl i 0 do 5 µl (tylko dla próbek aerozolowych), specjalne szczelne gazowe strzykawki z zaworem suwakowym.

6. Procedura

6.1. Przygotowanie próbek

6.1.1. Próbki wyrobów aerozolowych są przygotowywane i następnie analizowane metodą chromatografii gazowej w warunkach jak w punkcie 6.2.1.

6.1.2. Próbki wyrobów nieaerolowych przygotowywane według wymienionego powyżej rozdziału II są rozcieńczane wodą do poziomu stężenia od 1 do 2% etanolu lub propan-2-olu i następnie analizowane metodą chromatografii gazowej w warunkach jak w punkcie 6.2.2.

6.2. Chromatografia gazowa

6.2.1. Dla próbek aerozolowych używany jest detektor katarometryczny

6.2.1.1. Wypełnienie kolumny: 10% Hallcomid M 18 na Chromosorbie WAW 100 do 200 mesh

6.2.1.2. Kolumna musi mieć zdolność rozdzielczą R równą lub lepszą niż 1,5, gdzie:

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

w której:

r_1 i r_2 — czasy retencji w minutach dla dwóch pików

w_1 i w_2 — szerokość tych dwóch pików w połowie wysokości

d' — szybkość przesuwu papieru w mm na minutę

6.2.1.3. Następujące warunki pozwalają na uzyskanie tego rozdziału:

Kolumna: materiał — stal kwasoodporna, długość 3—5 metrów, średnica — 3 mm,

Natężenie prądu mostka katarometru — 150 mA,

Gaz nośny — hel, ciśnienie — 2,5 bara, przepływ — 45 ml/min,

Temperatury: dozownik 150°C, detektor 150°C, piec kolumny 65°C.

Dokładność pomiarów powierzchni pików można poprawić poprzez zastosowanie integracji elektronicznej.

6.2.2. Dla próbek nieaerozolowych

6.2.2.1. Wypełnienie kolumny: Chromosorb 105 lub Porapak QS i używa się detektora płomienio-jonizacyjnego.

6.2.2.2. Kolumna musi mieć zdolność rozdzielczą R równą lub lepszą niż 1,5, gdzie:

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

r_1 i r_2 — czasy retencji, w minutach dla dwóch pików,

w_1 i w_2 — szerokości tych dwóch pików w połowie wysokości, w mm

d' — szybkość przesuwu papieru, w mm na minutę.

6.2.2.3. Rozdział uzyskano w następujących warunkach:

Kolumna: materiał — stal kwasoodporna, długość — 2 metry, średnica — 3 mm,

Czułość elektrometru: 8×10^{-10} A,

Gaz nośny: azot, ciśnienie — 2,1 bara, przepływ — 40 ml/min,

Gaz pomocniczy: wodór, ciśnienie — 1,5 bara, przepływ — 20 ml/min,

Temperatury: dozownik — 150°C, detektor — 230°C, piec kolumny 120 do 130°C.

7. Standardowy wykres

7.1. Do wykonania analizy metodą chromatografii gazowej według 6.2.1. (kolumna Hallcomid M 18) należy używać poniższych mieszanin standardowych. Mieszaniny przygotowuje się przez odmierzanie pipetami, jednak należy ustalić dokładną ilość składnika przez bezpośrednie zważenie pipety lub kolby po każdym dodaniu składnika.

Stężenie względne (m/m %)	Metanol	Etanol lub propan-2-ol (ml)	Woda dodana do objętości (ml)
W przybliżeniu 2,5	0,5	20	100
W przybliżeniu 5,0	1,0	20	100
W przybliżeniu 7,5	1,5	20	100
W przybliżeniu 10,0	2,0	20	100

Wprowadzić 2 do 3 μl do chromatografu, stosując warunki podane w punkcie 6.2.1. Obliczyć stosunek powierzchni pików (metanol/etanol) lub (metanol/propan-2-ol) dla wszystkich mieszanin. Wykreślić standardowy wykres z użyciem oznaczeń:

OŚ X: % metanolu w stosunku do etanolu lub propan-2-olu,

OŚ Y: stosunek powierzchni pików (metanol/etanol) lub (metanol/propan-2-ol).

Stężenie względne (m/m %)	Metanol (μl)	Etanol lub propan-2-ol (ml)	Woda dodana do objętości (ml)
W przybliżeniu 2,5	50	2	100
W przybliżeniu 5,0	100	2	100
W przybliżeniu 7,5	150	2	100
W przybliżeniu 10,0	200	2	100

Wprowadzić 2 do 3 μl do chromatografu, stosując warunki podane w punkcie 6.2.2. Obliczyć stosunek powierzchni pików (metanol/etanol) lub (metanol/propan-2-ol) dla wszystkich mieszanin. Wykreślić standardowy wykres z użyciem oznaczeń:

OŚ X: % metanolu w stosunku do etanolu lub propan-2-olu,

OŚ Y: stosunek powierzchni pików (metanol/etanol) lub (metanol/propan-2-ol).

7.2. Dla wykonania analizy metodą chromatografii gazowej według punktu 6.2.2. (kolumna Porapak QS lub Chromosorb 105) należy używać poniższych mieszanin standardowych. Mieszaniny przygotowuje się przez odmierzanie mikrostrzykawką i pipetą, jednak należy ustalić dokładną ilość składnika przez bezpośrednie zważenie pipety lub kolby po każdym dodaniu składnika.

7.3. Standardowy wykres musi być linią prostą

8. POWTARZALNOŚĆ

Dla zawartości metanolu 5% w stosunku do etanolu lub propan-2-olu różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać 0,25%.