

ROZPORZĄDZENIE MINISTRA ZDROWIA¹⁾

z dnia 16 lipca 2004 r.

**zmieniające rozporządzenie 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, z późn. zm.²⁾) zarządza się, co następuje:

¹⁾ Minister Zdrowia kieruje działem administracji rządowej — zdrowie, na podstawie § 1 ust. 2 rozporządzenia Prezesa Rady Ministrów z dnia 11 czerwca 2004 r. w sprawie szczegółowego zakresu działania Ministra Zdrowia (Dz. U. Nr 134, poz. 1439).

²⁾ Zmiany wymienionej ustawy zostały ogłoszone w Dz. U. z 2003 r. Nr 73, poz. 659, Nr 189, poz. 1852 i Nr 208, poz. 2019.

§ 1. W rozporządzeniu Ministra Zdrowia z dnia 23 grudnia 2002 r. w sprawie określenia procedur pobierania próbek kosmetyków oraz procedur przeprowadzania badań laboratoryjnych (Dz. U. z 2003 r. Nr 9, poz. 107) załącznik nr 2 otrzymuje brzmienie określone w załączniku do niniejszego rozporządzenia.

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

Minister Zdrowia: *M. Balicki*

METODY ANALIZ NIEZBĘDNYCH DO KONTROLI KOSMETYKU

Pobieranie próbek produktów kosmetycznych

1. **Przedmiot i zakres zastosowania**
Poniższy opis pobierania próbek ma na celu ujednoczenie procedur stosowanych przy analizach składu kosmetyków.
2. **Definicje**
 - 2.1. **Próbka podstawowa:**
część pobrana z partii przeznaczonej na sprzedaż.
 - 2.2. **Próbka ogólna:**
suma wszystkich próbek podstawowych mających ten sam numer partii.
 - 2.3. **Próbka laboratoryjna:**
reprezentatywna część próbki ogólnej przeznaczona do analizy w poszczególnych laboratoriach.
 - 2.4. **Próbka analityczna:**
reprezentatywna część próbki laboratoryjnej wymagana do jednej analizy.
 - 2.5. **Pojemnik:**
opakowanie, które zawiera produkt i jest z nim w stałym bezpośrednim kontakcie.
3. **Procedura pobierania próbek**
 - 3.1. **Próbki produktów kosmetycznych** powinny być pobierane w oryginalnych opakowaniach i przesyłane do laboratorium analitycznego bez otwierania.
 - 3.2. Dla produktów kosmetycznych, które są dostarczane na rynek hurtowo lub sprzedawane detalicznie w pojemnikach różnych od oryginalnego opakowania producenta, powinny być podane odpowiednie instrukcje pobierania próbek w miejscach ich stosowania lub sprzedaży.
 - 3.3. Liczba próbek podstawowych, wymaganych do przygotowania próbki laboratoryjnej, powinna być odpowiednia do metody analitycznej, jak i liczby analiz wykonywanych w każdym laboratorium.
4. **Identyfikacja próbki**
 - 4.1. **Próbki** powinny być zabezpieczone w momencie pobierania i zidentyfikowane zgodnie z przepisami.
 - 4.2. Każda pobrana próbka podstawowa powinna zawierać na etykiecie następujące informacje:
 - nazwę produktu kosmetycznego,
 - datę, godzinę i miejsce pobrania próbki,
 - nazwisko osoby odpowiedzialnej za pobranie próbki,
 - nazwę urzędu kontrolującego.
 - 4.3. Należy sporządzić protokół pobrania próbki.
5. **Przechowywanie próbek**
 - 5.1. **Próbki podstawowe** powinny być przechowywane zgodnie z zaleceniami producenta (jeśli takie zalecenia podane są na etykiecie).
 - 5.2. Jeśli nie wymieniono innych warunków, próbki laboratoryjne powinny być przechowywane w ciemności, w temperaturze między 10-25 °C.
 - 5.3. **Próbek podstawowych** nie wolno otwierać przed rozpoczęciem analizy.

Praktyczne przygotowanie próbek laboratoryjnych

1. Ogólne zasady
 - 1.1. W przypadku gdy to możliwe, analiza powinna być wykonywana na każdej próbce podstawowej. Jeśli próbka podstawowa jest zbyt mała, należy posługiwać się minimalną liczbą próbek podstawowych. Przed pobraniem próbki laboratoryjnej próbki podstawowe powinny być ze sobą starannie wymieszane.
 - 1.2. Jeśli wymaga tego metoda analityczna, pojemnik należy otworzyć, pod osłoną gazu obojętnego, i możliwie szybko pobrać odpowiednią liczbę próbek laboratoryjnych oraz niezwłocznie przeprowadzić ich analizę. Jeśli próbka podstawowa ma być zachowana, pojemnik należy szczelnie zamknąć pod osłoną gazu obojętnego.
 - 1.3. Produkty kosmetyczne mogą być wytwarzane w postaci ciekłej lub stałej, a także półstałej. Jeśli nastąpiła separacja faz pierwotnie homogenicznego produktu, przed pobraniem próbki laboratoryjnej należy go ponownie ujednorodnić.
 - 1.4. Jeśli produkty kosmetyczne trafiają do sprzedaży specjalną drogą, czego konsekwencją jest brak możliwości zastosowania się do niniejszej instrukcji, i jeśli nie ma uregulowań dotyczących odpowiednich metod badawczych, możliwe jest zastosowanie oryginalnej procedury pod warunkiem, że zostanie ona sformułowana na piśmie, a opis ten będzie stanowił część raportu analitycznego.
2. Ciecze
 - 2.1. Produkty te mogą występować w takich formach jak: roztwory w oleju, w alkoholu i w wodzie, wody toaletowe, płyny lub mleczka. Mogą być one pakowane w butelki, ampułki lub tuby.
 - 2.2. Pobieranie próbki laboratoryjnej:
 - przed otwarciem pojemnik energicznie wstrząsnąć,
 - otworzyć pojemnik,
 - wlać kilka mililitrów cieczy do próbówki w celu obejrzenia, czy materiał nadaje się do pobrania próbki laboratoryjnej,
 - ponownie zamknąć pojemnik lub
 - pobrać wymagane próbki laboratoryjne,
 - starannie ponownie zamknąć pojemnik.
3. Substancje półstałe
 - 3.1. Produkty mogą występować w takich formach jak: pasty, kremy, sztywne emulsje i żele. Mogą być pakowane w tuby, butelki z tworzyw sztucznych lub słoiki.
 - 3.2. Pobieranie próbki laboratoryjnej może następować w różny sposób:
 - 3.2.1. Pojemniki z wąską szyjką. Usunąć przynajmniej pierwszy centymetr produktu. Wycisnąć próbkę laboratoryjną i niezwłocznie zamknąć pojemnik.
 - 3.2.2. Pojemniki z szeroką szyjką. Zdjąć równomiernie całą wierzchnią warstwę produktu i odrzucić ten materiał. Pobrać próbkę laboratoryjną i niezwłocznie ponownie zamknąć pojemnik.
4. Ciała stałe
 - 4.1. Produkty te mogą występować w takich formach jak: sypkie proszki, sprasowane proszki, sztyfty i mogą być pakowane w różnego rodzaju pojemniki.
 - 4.2. Pobieranie próbki laboratoryjnej może następować w różny sposób:
 - 4.2.1. Sypki proszek – wstrząsnąć energicznie przed odkorkowaniem lub otwarciem. Otworzyć i pobrać próbkę laboratoryjną.
 - 4.2.2. Prasowany proszek lub sztyft – usunąć wierzchnią warstwę przez równomierne drapanie. Pobrać próbkę laboratoryjną spod spodu.

5. Produkty w pojemnikach pod ciśnieniem („dozowniki aerozolowe”)
- 5.1. Próbkę laboratoryjną:
Po energicznym wstrząśnięciu reprezentatywną część zawartości dozownika aerozolowego przenieść za pomocą odpowiedniego łącznika (patrz rys. 1: w szczególnych przypadkach metoda analityczna może wymagać użycia innych łączników) do pokrytej tworzywem sztucznym szklanej butelki (rys. 4) wyposażonej w zawór aerozolowy nieposiadający rurki zanurzeniowej. Podczas przenoszenia próbki butelkę trzyma się zaworem skierowanym w dół. Takie przeniesienie próbki zapewnia dobrą widoczność zawartości pojemnika i odpowiada jednemu z następujących czterech przypadków:
- 5.1.1. Wyrób aerozolowy w postaci jednorodnego roztworu do bezpośredniej analizy.
- 5.1.2. Wyrób aerozolowy składający się z dwóch faz ciekłych. Każda z faz może być analizowana po oddzieleniu dolnej fazy do drugiej pomocniczej butelki do przenoszenia. W tym przypadku pierwsza butelka do przenoszenia jest skierowana zaworem w dół. W takim przypadku dolna faza jest często fazą wodną i nie zawiera gazu nośnego (np. wyrób z butanem i wodą).
- 5.1.3. Wyrób aerozolowy zawierający proszek w zawiesinie. Fazę ciekłą można analizować po oddzieleniu proszku.
- 5.1.4. Wyrób w postaci piany lub kremu. Najpierw należy odważyć do pomocniczej butelki do przenoszenia 5 do 10 g 2-metoksyetanolu. Substancja ta zabezpiecza przed tworzeniem się piany podczas operacji odgazowania, wtedy można usuwać gaz nośny bez strat cieczy.
- 5.2. Wyposażenie.
Łącznik (rys. 1) jest wykonany z duraluminium lub mosiądzu. Jest przeznaczony do połączenia różnych zaworów poprzez łącznik polietylenowy (patrz rys. 2 i 3). Można również używać innych łączników.
Pomocnicza butelka do przenoszenia (rys. 4) jest wykonana z białego szkła pokrytego zewnętrzną warstwą ochronną z przezroczystego tworzywa. Jej pojemność wynosi 50 do 100 ml i jest wyposażona w zawór aerozolowy bez rurki zanurzeniowej.
- 5.3. Metoda.
Aby można było przenieść wystarczającą ilość próbki, z butelki do przenoszenia musi być usunięte powietrze. W tym celu, należy wprowadzić przez łącznik około 10 ml dichlorodifluorometanu lub butanu (zależnie od rodzaju badanego wyrobu aerozolowego) i całkowicie odgazować aż do zaniku fazy ciekłej, trzymając butelkę do przenoszenia zaworem skierowanym do góry. Usunąć łącznik. Zważyć butelkę do przenoszenia („a” gramów). Energicznie wytrząsnąć pojemnik aerozolowy, z którego ma być pobierana próbka. Połączyć łącznik z zaworem na pojemniku aerozolowym z badaną zawartością (zawór skierowany do góry), dopasować butelkę do przenoszenia próbki (szyjką skierowaną w dół) do łącznika i nacisnąć. Napełnić butelkę do przenoszenia do około dwóch trzecich pojemności. Jeśli przenoszenie przedwcześnie ustaje na skutek wyrównania ciśnień, można je wznowić przez chłodzenie butelki do przenoszenia. Usunąć łącznik, zważyć napełnioną butelkę („b” gramów) i oznaczyć masę przeniesionej próbki, m_1 ($m_1 = b - a$).
Otrzymaną w ten sposób próbkę można użyć do:
- 1) normalnej analizy chemicznej;
 - 2) analizy lotnych składników metodą chromatografii gazowej.

5.3.1. Analiza chemiczna

Trzymając butelkę do przenoszenia zaworem do góry, należy postępować następująco:

- odgazować; jeśli czynność ta powoduje powstawanie piany, należy użyć butelki do przenoszenia, do której uprzednio za pomocą strzykawki dodano przez łącznik dokładnie odważoną ilość (5 do 10 g) 2-metoksyetanolu,
- bez straty próbki zakończyć usuwanie lotnych składników przez wytrząsanie w łaźni wodnej o temperaturze 40 °C; zdjęć łącznik,
- ponownie zważyć butelkę do przenoszenia („c” gramów) w celu ustalenia ciężaru pozostałości m_2 ($m_2 = c - a$).
(*Uwaga:* Przy obliczaniu ciężaru pozostałości należy odjąć ciężar ewentualnie użytego 2-metoksyetanolu.)
- otworzyć butelkę do przenoszenia przez zdjęcie zaworu,
- całkowicie rozpuścić pozostałość w znanej ilości odpowiedniego rozpuszczalnika,
- przeprowadzić wymagane oznaczenie na części pobranej próbki.

Wzory do obliczeń są następujące:

$$R = \frac{r \times m_2}{m_1} \quad \text{oraz} \quad Q = \frac{R \times P}{100},$$

gdzie:

- m_1 – masa aerozolu pobrana do butelki do przenoszenia,
- m_2 – masa pozostałości po ogrzewaniu w 40 °C,
- r – procent określonej substancji w m_2 (ustalony według właściwej metody),
- R – procent określonej substancji w aerozolu, jaki otrzymano do analizy,
- Q – całkowita masa określonej substancji w dozowniku aerozolowym,
- P – początkowa masa netto dozownika aerozolowego (próbka podstawowa).

5.3.2. Analiza lotnych składników metodą chromatografii gazowej

5.3.2.1. Zasady

Za pomocą strzykawki do chromatografii gazowej pobrać właściwą ilość materiału z butelki do przenoszenia. Następnie wstrzyknąć zawartość strzykawki do chromatografu gazowego.

5.3.2.2. Oprzyrządowanie

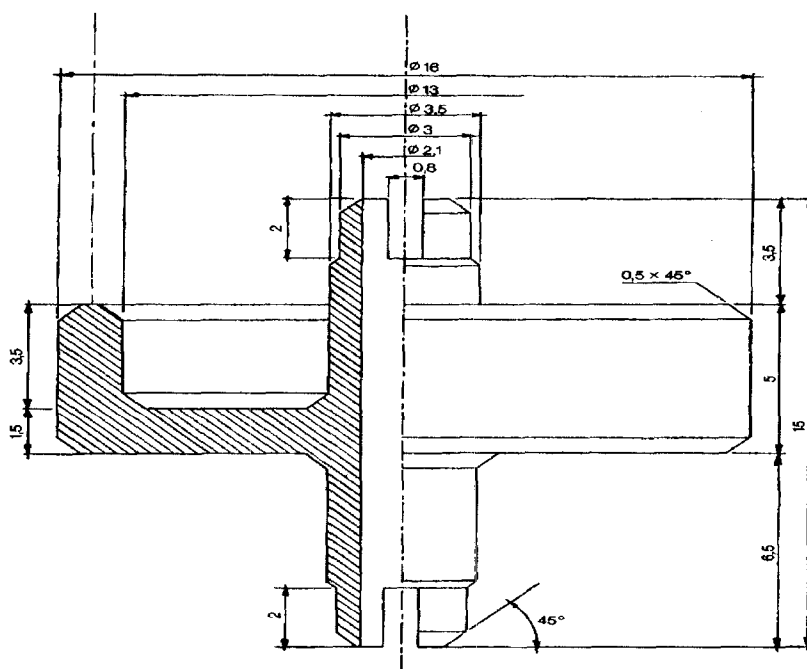
Precyzyjna strzykawka o pojemności 25 μ l lub 50 μ l szeregu A2 (rys. 5) do pobierania próbek dla chromatografii gazowej lub równoważna. Ta strzykawka wyposażona jest w zawór odcinający przy nasadzie igły. Strzykawka jest połączona z butelką do przenoszenia za pomocą łącznika przy butelce i polietylenowej rurki (długość 8 mm, wewnętrzna średnica 2,5 mm) przy strzykawce.

5.3.2.3. Metoda

Po pobraniu do butelki do przenoszenia właściwej ilości produktu aerozolowego dopasować stożkowe zakończenie strzykawki do butelki, jak opisano w pkt 5.3.2.2. Otworzyć zawór i nabrać właściwą ilość cieczy. Usunąć pęcherzyki gazu przez kilkakrotne poruszenie tłokiem (schłodzić strzykawkę, jeśli to konieczne). Jeśli strzykawka zawiera właściwą ilość pozbawionej pęcherzyków cieczy, zamknąć zawór i odłączyć strzykawkę od butelki do przenoszenia. Założyć igłę, włożyć strzykawkę do iniektora chromatografu gazowego i wstrzyknąć.

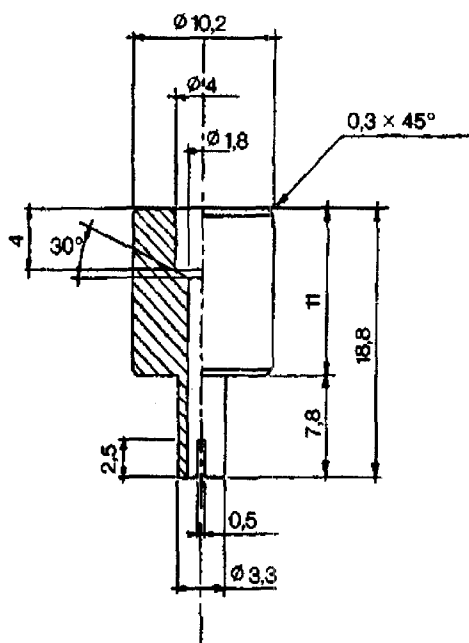
5.3.2.4. Wzorzec wewnętrzny

Jeśli potrzebny jest wzorzec wewnętrzny, to jest on wprowadzany do butelki do przenoszenia (za pomocą zwykłej szklanej strzykawki z użyciem łącznika).



Rys. 1

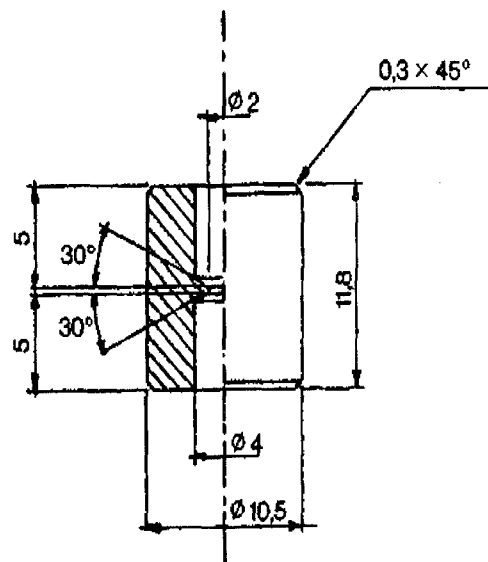
Łącznik P1



Rys. 2

Łącznik M₂

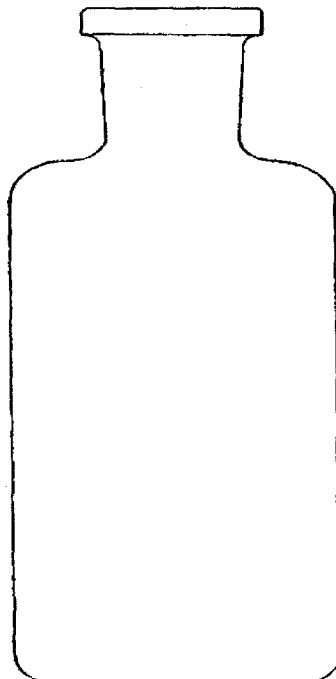
Dla przenoszenia między zaworem „męskim” i „żeńskim”



Rys. 3

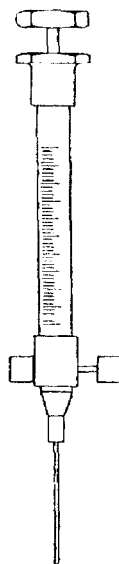
Łącznik M₁

Dla przenoszenia między dwoma zaworami „męskimi”



Rys. 4

Butelka do przenoszenia; pojemność od 50 do 100 ml



Rys. 5

Strzykawka do gazu pod ciśnieniem

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 poniższą 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 fioletoworóżową.

3.2. Odczynniki

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

3.2.1. Fuksyna

3.2.2. Heptawodny siarczan sodu

- 3.2.3. Stężony kwas chlorowodorowy, $d = 1,19$
- 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.
Odczynnika 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. Wyrząsnąć i pozostawić do odstania na pięć minut.
 - 3.3.3. Jeśli barwa różowa lub fioletoworóżowa 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 absorbancję 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 chlorowodorowy, 1 M
 - 4.2.6. Kwas chlorowodorowy, 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 tiosiarczanu 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 rozdzielu 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. Kuwety 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 chlorowodorowego (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 rozdzielania.

4.4.4.3. Przesączyć fazę butan-1-olu do kuwety przez sączek (4.3.2.) do rozdzielu 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 wzorcowa

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 wzorcową 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 wzorcowej (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:
- pomiędzy 0,05 % i 0,2 % w wyrobie nieetykietowanym,
 - 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 donorów 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 disodowy
 - 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 chlorowodorowy, 1 M
 - 5.2.12. Kwas chlorowodorowy, 0,002 M
 - 5.2.13. Roztwór skrobi świeżo przygotowany według Farmakopei Europejskiej (pkt 4.2.8.)
 - 5.2.14. Standardowy roztwór jodu, 0,05 M
 - 5.2.15. Standardowy roztwór tiosiarczanu sodu, 0,1 M
 - 5.2.16. Faza ruchoma
Wodny roztwór fosforanu disodowego (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 µl
- 5.3.5. Reaktor mieszaniny schodzącej z kolumny („po kolumnie”) z następującymi elementami:
- jedna 1-litrowa kolba trójszyjna,
 - jeden płaszcz grzewczy dla kolby 1-litrowej,
 - dwie kolumny Vigreux o minimum 10 półkach z dwoma płaszczami chłodzonymi powietrzem,
 - rurka ze stali kwasoodpornej (dla wymiennika ciepła) 1,6 mm, wewnętrzna średnica 0,23 mm, długość 400 mm,
 - rurka teflonowa 1,6 mm, wewnętrzna średnica 0,30 mm, długość 5 m (splot francuski) (zob. dodatek 1),
 - jeden łącznik T-kształtny bez martwej objętości (Valco lub równoważny),
 - 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 µm
- 5.3.7. Ładunek filtra SEP-PAK lub równoważny
- 5.3.8. Kolumny przygotowane fabrycznie:
- Bischoff hypersil RP (typ NC, odnośnik C 25, 46 1805) (5 µm, długość = 250 mm, średnica wewnętrzna = 4,6 mm) lub
 - Dupont, Zorbax ODS (5 µm, długość = 250 mm, średnica wewnętrzna = 4,6 mm), lub
 - Phase SEP, spherisorb ODS (5 µm, długość = 250 mm, średnica wewnętrzna = 4,6 mm).
- 5.3.9. Kolumna wstępna
Bischoff K₁ hypersil RP 18 (odnośnik K1G 6301 1805) (5 µm, 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 wzorcowa
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 wzorcowa 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 gramów) odpowiadającą przewidywanej ilości 100 µg formaldehydu. Dodać 20,00 ml dichlorometanu (5.2.8.) i 20,00 ml kwasu chlorowodorowego (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 filtra (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 filtra, 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 gramów) 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 filtra (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 rozdziale należy zanurzyć kolumnę w łaźni lodowo-wodnej i poczekać 15-20 minut na ustabilizowanie się temperatury,

f) temperatura reakcji po kolumnie: 100 °C,

g) 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 wg $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ odczytane z krzywej wzorcowej (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 %.

Dodatek 1

Instrukcja wykonania „splotu francuskiego”

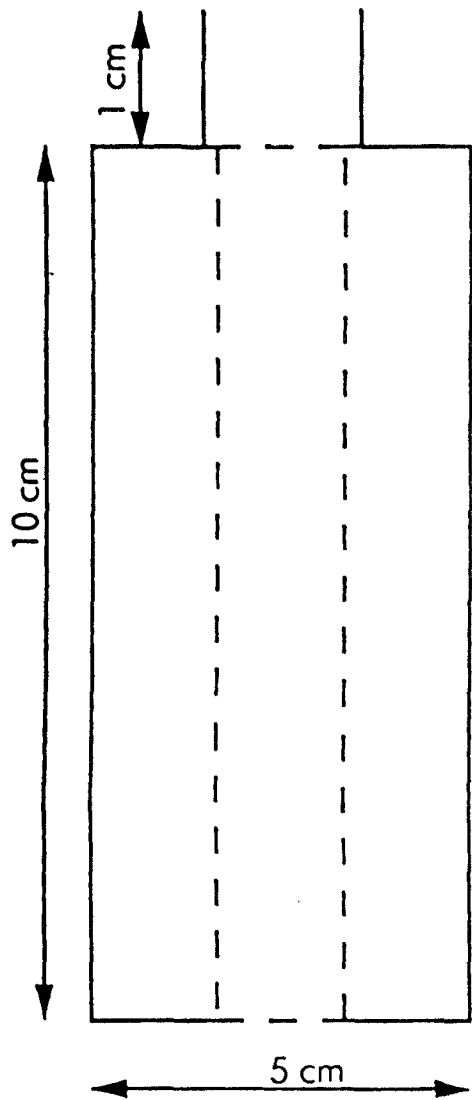
Wymagane przybory:

- 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 gwoźdź od otworu 0,5 cm (rys. 2),
- jedna sztywna igła (w formie rozwidłonego haczyka) dla zaczepienia rurki teflonowej,
- rurka teflonowa długości 5 m o średnicy zewnętrznej 1,6 mm i średnicy wewnętrznej 0,3 mm.

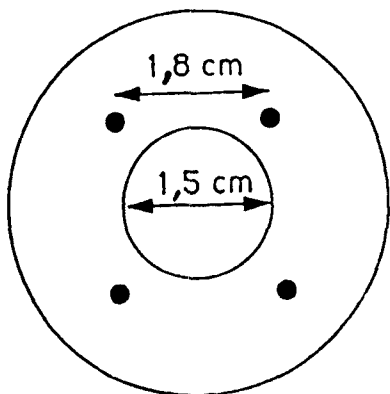
Procedura

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 nawinać rurkę na gwoździe, jak pokazano na rys. 3. Góra i dół splotu francuskiego będą chronione metalowymi pierścieniami i śrubami, należy uważać, aby nie zgnieść rurki teflonowej podczas zaciskania splotu. Nawinać rurkę dookoła każdego gwoźdź po raz drugi i zrobić „oczka” następująco: podnieść dolną rurkę nad górną za pomocą haczyka (patrz rys. 4). Powtórzyć te czynności z każdym gwoździami w kolejności (1, 2, 3, 4 w kierunku przeciwnym do kierunku wskazówek zegara) do momentu uzyskania 5 m lub wymaganej długości splotu.

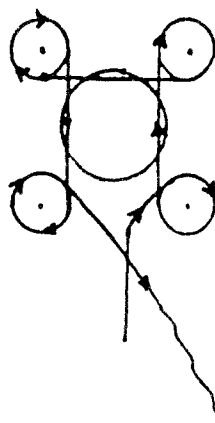
Pozostawić około 10 cm rurki na zamknięcie łańcucha. Przewlec rurkę przez każdą z czterech pętli i przeciągnąć delikatnie w celu zamknięcia końca łańcucha.



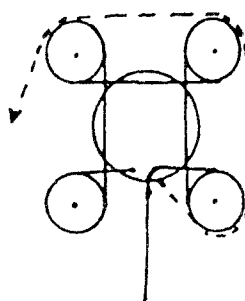
Rys. 1
Schematyczny wykres szpuli



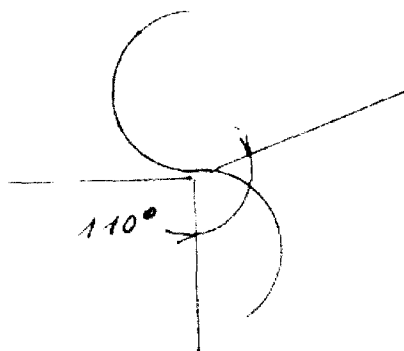
Rys. 2



Rys. 3
Pierwsza rurka



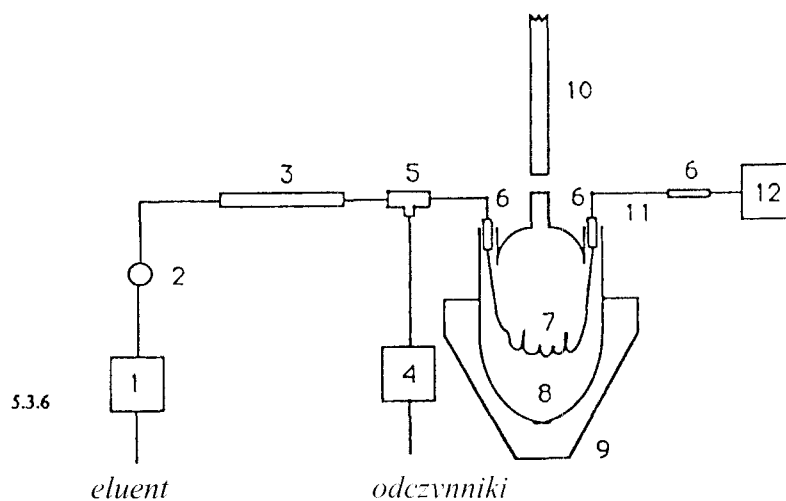
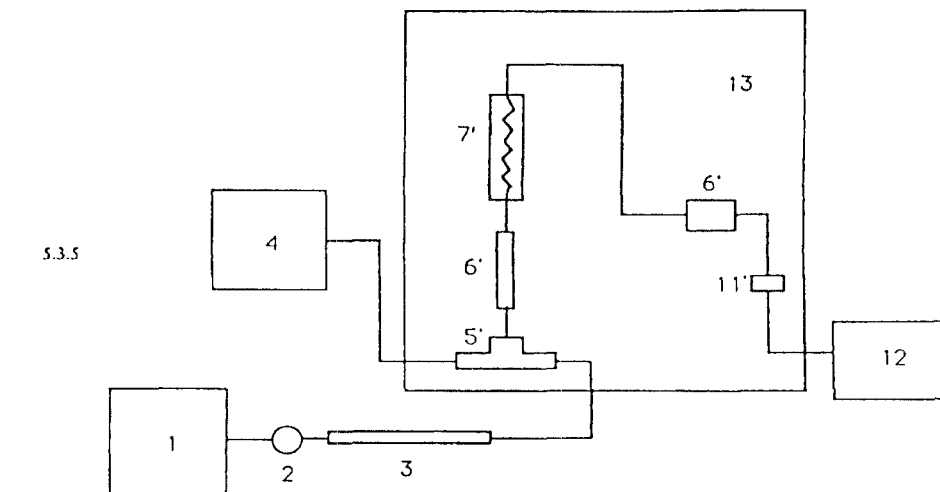
Rys. 4
Druga rurka. Aby utworzyć „ścieg”, należy unieść niższą rurkę (linia ciągła) nad drugą rurkę (linia przerywana)



Rys. 5

Dodatek 2

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. Trójzcyjna 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



Rys. 6

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
<i>Fenylenodiaminy</i>	
o-fenylenodiamina	(OPD)
m-fenylenodiamina	(MPD)
p-fenylenodiamina (Aneks V Dyrektywy Kosmetycznej)	(PPD)
<i>Metylofenylenodiaminy</i>	
4-metylo-1,2-fenylenodiamina (3,4-diaminotoluen)	(OTD)
4-metylo-1,3-fenylenodiamina (2,4-diaminotoluen)	(MTD)
2-metylo-1,4-fenylenodiamina (2,5-diaminotoluen)	(PTD)
<i>Diaminofenole</i>	
2,4-diaminofenol	(DAP)
<i>Hydrochinon</i>	
1,4-benzenodiol	(H)
α -naftol	(α -N)
<i>Pirogallol</i>	
1,2,3-trihydroksybenzen	(P)
<i>Rezorcyna</i>	
1,3-dihydroksybenzen	(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 za 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. Toluen
- 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:
- chlorobenzenosulfonian 3-nitrobenzenodiazoniowy (stabilizowany w postaci soli), taki jak odczynnik Red 2 NJ Francolor,
 - 2-naftalenosulfonian 2-chloro-4-nitrobenzenodiazoniowy (stabilizowany w postaci soli), taki jak odczynnik NNCD Reagent Nr 74150 Fluka lub równoważny.
- 3.15. Azotan (V) srebra
- 3.16. Aldehyd p-dimetyloaminobenzoesowy
- 3.17. 2,5-dimetylofenol
- 3.18. Chlorek żelaza heksawodny
- 3.19. Kwas chlorowodorowy, 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 (80:10:10:1 obj.)
- 3.22.3. Benzen-butan-2-ol - woda (50:25:25 obj.)
Wytrząsać dobrze i stosować górną fazę po rozdzieleniu 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 chlorowodorowego (3.19.).
- 3.23.3. 2,5-dimetylofenol - heksawodny 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 (V) srebra

Do 5 % (m/v) wodnego roztworu azotanu (V) 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 μ l, kalibrowana z podziałkami 0,2 μ l, z okrągło zakończoną igłą lub lepiej 50 μ l 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, Silica 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 askrobinowego, 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 μ l 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	6	7	8	9
R	P	H	PPD	DAP	PTD	OPD	OTD	MPD
MTD	α -N							

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

5.2.2. Rozwijanie

Umieścić płytkę w komorze uprzednio przepłukanej azotem (3.8.) wysyczonej 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. Tabela 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.

Tabela I. Wartości R_F i barwy otrzymane bezpośrednio po spryskaniu

Substancja odniesienia (3.20.)	Rozpuszczalniki rozwijające				Rozpylane wskaźniki wywołujące				
	wartości R_F				otrzymane barwy				
	(3.22.1.)	(3.22.2.)	(3.22.3.)	(3.22.4.)	diazowy (3.23.1.)	Ehrlicha (3.23.2.)	dimetylofenol (3.23.3.)	$AgNO_3$ (3.24.4.)	
OPD	0,62	0,60	0,30	0,57	bladobrazowa	—	—	blado-brązowa	
MPD	0,40	0,60	0,47	0,48	fioletowo-brązowa*	żółta	bladobrazowa	blado-brązowa	
PPD	0,20	0,50	0,30	0,48	brązowa	jasnoczerwona*	fioletowa	szara	
OTD	0,60	0,60	0,53	0,60	brązowa*	blado-pomarańczowa	bladobrazowa	szarawo-brązowa	
MTD	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	0,90	0,90	0,75	pomarańczowo-brązowa	—	fioletowa*	czarna	
P	0,37	—	0,67	0,05	brązowa	bardzo blado-fioletowa	bardzo blado-brązowa	brązowa*	
R	0,50	0,37	0,80	0,17	pomarańczowa*	bladofioletowa	bardzo blado-brązowa	blado-brązowa	

Uwaga

OPD jest słabo widoczna; należy użyć rozpuszczalnika (3.22.3.), aby rozdzielić ją wyraźnie od OTD.

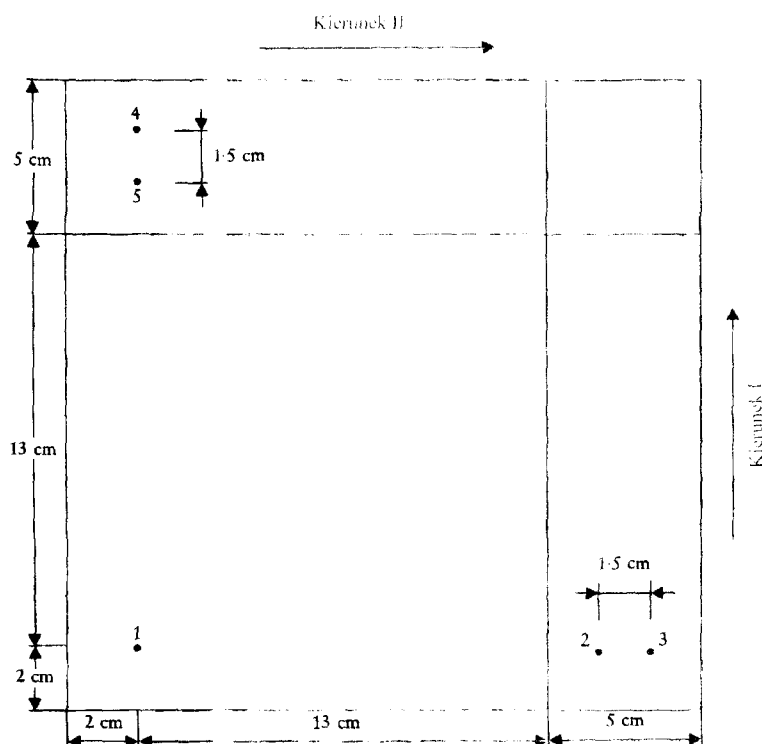
* Wskazuje najlżejszą wywołaną barwę.

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-fenylendiamina (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 rozdzielac (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 rozdziału 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 ciemności 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 elujący.
 - 6.4.7. Za pomocą kalibrowanej probówki wprowadzić odpowiednią ilość rozpuszczalnika elującego (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 elujący na powietrzu.
 - 6.4.8. Umieścić płytkę w komorze chromatograficznej wysyczonej 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 (tabela 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 od 6.4.1. do 6.4.8. i dodanie w 1 punkcie bazowym do ilości ekstraktu podanej w punkcie 6.4.2. 1 ml 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.

Tabela 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.

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 szczawiony i/lub szczawiany wytrącane są jako szczawian wapnia, po czym roztwór jest przesączany. Osad jest rozpuszczany w kwasie siarkowym i miareczkowany roztworem manganianu (VII) 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. tetrachlorek węgla,
- 4.5. eter dietylowy,
- 4.6. 6–8 % (m/m) roztwór dichlorowodoru p-toluidyny,
- 4.7. 0,1 N roztwór manganianu (VII) potasu,
- 4.8. 20 % (m/m) kwas siarkowy,
- 4.9. 10 % (m/m) kwas chlorowodorowy,
- 4.10. triwodny 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 tetrachloru 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. Przebrać wodny roztwór do zlewki o pojemności 600 ml i usunąć obecny jeszcze tetrachlorek 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. Przemyć 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 (5.12.) i miareczkować roztworem manganianu (VII) potasu (4.7.) aż do wystąpienia jasnoróżowego zabarwienia.
7. Obliczenia
- Zawartość kwasu szczawowego w próbce wyrażoną jako procent masowy oblicza się ze wzoru:

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

w którym:

A oznacza zużyty 0,1 N roztwór manganianu (VII) potasu zmierzony zgodnie z pkt 6.8,
E oznacza masę próbki analitycznej wyrażoną w gramach (6.1.),
4,50179 oznacza współczynnik przeliczeniowy kwasu szczawowego.

8. Powtarzalność
- Dla zawartości kwasu szczawowego 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 szczawowy i/lub szczawiany wytrącają się w postaci szczawianu wapnia i rozpuszczają w kwasie siarkowym. Do roztworu dodaje się niewielką ilość roztworu manganianu (VII) potasu, który odbarwia się i powoduje tworzenie się ditlenku węgla. Kiedy powstały ditlenek 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 pkt 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, dodać kroplami około 0,5 ml 0,1 N roztworu manganianu (VII) potasu (4.7.) i przesączyć. Jeżeli szczawian jest obecny, roztwór odbarwia się najpierw stopniowo, później gwałtownie.
- 9.2.5. Bezpośrednio po dodaniu manganianu (VII) potasu umieścić odpowiednią szklaną rurkę z korkiem nad probówką, ogrzewać lekko zawartość i zbierać powstający ditlenek węgla w nasyconym roztworze wodorotlenku baru (4.13.). Pojawienie się po trzech do pięciu minutach mlecznego zmętnienia węglanu baru świadczy o obecności kwasu szczawowego.

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 wzorzec 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 wzorca wewnętrznego

Do 50 ml kolbki miarowej dodać pipetą 5 ml dimetyloformamidu (4.4.) i dodać około 300 mg (M mg) acetonitrylu, dokładnie odważonego. Uzupełnić do kreski dimetyloformamidem i wymieszać.

4.7. Roztwór do oznaczania względnego współczynnika odpowiedzi

Do 10 ml kolbki miarowej dodać pipetą dokładnie 5 ml roztworu wzorca wewnętrznego (4.6.) i dodać około 300 mg (M_1 mg) 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. Mikrostrzykawka pojemności 5 do 10 μ l i kalibracji co 0,1 μ l

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 teflonem

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.) za pomocą wibratora.
- 6.1.3. Detektor płomieniowo-jonizacyjny: należy nastawić jego czułość tak, aby przy wprowadzeniu 3 μ l roztworu według 4.7. wysokość piku acetonitrylu wynosiła około trzech czwartych pełnego zakresu wysokości piku.
- 6.1.4. Gazy:
Nośnik azot, szybkość przepływu 65 ml/min
Pomocniczy: nastawić przepływ gazów do detektora 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 godzinę.
- 6.2. Przygotowanie próbek
Pobrać próbkę do analizy z nieotwieranej tubki. Usunąć jedną trzecią zawartości, założyć z powrotem nakrętkę na tubę, wymieszać starannie w tubie i następnie pobrać próbkę analityczną.
- 6.3. Oznaczenie
- 6.3.1. Do próbki z nakrętką (5.6.) odważyć 6 do 7 g (Mog) z dokładnością do 10 mg pasty do zębów, przygotowanej zgodnie z punktem 6.2., i dodać trzy małe szklane ziarenka.
- 6.3.2. Do próbki dodać pipetą dokładnie 5 ml roztworu wzorca wewnętrznego (4.6.), 4 ml dimetyloformamidu (4.4.) i 1 ml metanolu (4.5.), zamknąć próbkę i wymieszać.
- 6.3.3. Wytrząsnąć zamkniętą próbkę w mechanicznej wytrząsarce w ciągu pół godziny i odwirować ją w ciągu 15 minut z taką szybkością, aby otrzymać wyraźny rozdział faz.
Uwaga: czasami zdarza się, że faza ciekła jest mętna po wirowaniu. Pewną poprawę można uzyskać przez: dodanie 1 do 2 g chlorku sodowego do fazy ciekłej, pozostawienie do odstania i ponowne odwirowanie.
- 6.3.4. Wprowadzić do chromatografu 3 μ l tego roztworu (6.3.3.) w warunkach opisanych w punkcie 6.1. Powtórzyć tę operację w warunkach opisanych powyżej, można podać następujące czasy retencji 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 odpowiedzi. Wprowadzić 3 μ l roztworu (4.7.) dla oznaczenia tego współczynnika. Powtórzyć operację. Oznaczać względny współczynnik odpowiedzi codziennie.
7. Obliczenia
- 7.1. Obliczenie względnej odpowiedzi
- 7.1.1. Zmierzyć wysokość i szerokość w połowie wysokości pików acetonitrylu i chloroformu i obliczyć powierzchnie obu pików, zgodnie z wzorem: wysokość 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:

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

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_i),
 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 masowy,
 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 %.

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-chinolilowy) 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-chinolilowo) 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-metylochinolin-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-metylochinolin-8-olu

Rozpuścić 5 g 2-metylochinolin-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. Tygłe 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. żelem krzemionkowym lub równorzędnym

5.10. Piec do suszenia z temperaturą uregulowaną na 150 ± 2 °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, za 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-metylochinolin-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 za 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 suszarce o temperaturze nastawionej na 150 °C i suszyć w ciągu jednej godziny.

6.7. Wyjąć tygiel 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.,

M₀ – masa w gramach pustego i suchego tygla z filtrem (6.5.),

M₁ – 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 %.

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 masowy 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 z 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. Azotan (III) 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 azotanu (III) 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 sulfanilowego (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 azotanu (III) 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 µl
 - 5.6. Pipeta kalibrowana, 5 µl
 - 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 próbek
W opisaney poniżej metodzie identyfikacji i oznaczania kwasu hydroksybenzenosulfonowego w aerozolach używana jest pozostałość otrzymana przez usunięcie z pojemnika aerozolowego 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 ditazonu (4.15.). Pojawienie się purpurowoczerwonych plam na chromatogramie wskazuje na obecność jonów cynku.
 - 7.5. Przykryć spryskaną część płytki szklaną płytką i spryskać pozostałą część odczynnikami Pauly'ego (4.17.). Na obecność kwasu 4-hydroksybenzenosulfonowego wskazuje pojawienie się żółtobrazowych plam o wartości R_f około 0,26, podczas gdy żółta plama o wartości R_f 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 sącdek. Zależnie od oczekiwanej zawartości kwasu hydroksybenzenosulfonowego przenieść pipetą 1,0 lub 2 ml (V_2) przesączu 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 za 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 pkt 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.

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 utleniają jodki do wolnego jodu. W konsekwencji konieczne jest przed jodometrycznym oznaczaniem 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 chlorowodorowy

2.7. 4 N kwas chlorowodorowy.

3. Aparatura i wyposażenie

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

3.2. Mikropipeta, 1 µl

3.3. Kolby miarowe, 100 ml

3.4. Sączi karbowane

3.5. Aparatura do zstępującej chromatografii bibułowej.

4. Przygotowanie próbki

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 zawiesiny przez karbowany lejek (3.4.) i pobrać 1 μ l każdego przesączu do analizy metodą chromatografii bibułowej opisanej w punkcie 5.
- 4.3. Kremy
Zawiesić 5 g i 20 g każdego wyrobu w 100 ml wody i zastosować dyspersje 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. Nasycać 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 pkt 4. i 2.1. w każdym punkcie startowym paska bibuły chromatograficznej (Whatman nr 3 lub równoważnej) 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 pkt 5.2. i 5.3. z użyciem bibuły chromatograficznej (Whatman nr 4 lub równoważnej) (3.1.) i rozpuszczalnikiem rozwijającym B. Rozdziel chromatograficzny prowadzić 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 nadsiarcezanów pojawią się pierwsze na chromatogramie, a następnie wywołane zostają plamy nadtlenku 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.)
nadsiarcezan sodu	0,40	0,10
nadsiarcezan potasu	0,40	0,02 +/- 0,05
nadsiarcezan amonu	0,50	0,02 +/- 0,20
bromian sodu	0,40	0,20
bromian potasu	0,40	0,10 +/- 0,20
nadtlenek wodoru	0,80	0,80

B. Identyfikowanie nadtlenku baru

1. Zasada

Nadtlenek baru jest identyfikowany na podstawie powstawania nadtlenku 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 stapianiu pozostałości z roztworu (B.4.2.) w środowisku alkalicznym, po rozpuszczeniu w kwasie chlorowodorowym, 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 chlorowodorowy
- 2.3. 6 N kwas chlorowodorowy
- 2.4. 4 N kwas siarkowy
- 2.5. Sól sodowa kwasu rodyzonowego (3,4,5,6-tetraoksocykloheksen-1,2-diolu)
- 2.6. Chlorek baru ($\text{BaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$)
- 2.7. Bezwodny węglan sodu
- 2.8. 1 % (m/v) wodny roztwór chlorku baru
- 2.9. Rozpuszczalnik rozwijający zawierający metanol, stężony kwas chlorowodorowy (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 μl
- 3.2. Tygle 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 sączonek 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 chlorowodorowym (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 węglanu sodu (B.2.7.), wymieszać i stapiać 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 chlorowodorowym (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.

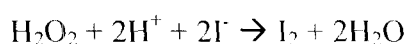
5. Metoda

- 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 nadtlenu wodoru

1. Zasada

Jodometryczne oznaczanie nadtlenu 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 nadtlenu wodoru.

2. Definicja

Zawartość nadtlenu 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 jednomiarowe, 10 ml
- 4.6. Kolby stożkowe, 250 ml

5. Metoda

- 5.1. Odważyć około 10 g (m gramów) wyrobu zawierającego około 0,6 g nadtlenu wodoru w zlewce 100 ml. Przenieść zawartość zlewki za 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 tiosiarczuanu sodu w analizie ślepej próby (V_0 ml).

6. Obliczenie

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

$$\% \text{ nadtlenek wodoru} = \frac{(V-V_0) \times 1,7008 \times 250 \times 100}{m \times 10 \times 1\,000} =$$

$$= \frac{(V-V_0) \times 4,252}{m}$$

w którym:

m – ilość analizowanego wyrobu (5.1.),

V_0 – zużycie 0,1 N roztworu tiosiarczuanu sodu do analizy ślepej próby w mililitrach (5.4.),

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

7. Powtarzalność

Dla wyrobu zawierającego około 6 % (m/m) nadtlenu wodoru różnica pomiędzy wynikami dwóch oznaczeń przeprowadzonych równolegle dla tej samej próbki nie powinna przekraczać wartości bezwzględnej 0,2 %.

Identyfikowanie i oznaczanie azotanów (III)

A. Identyfikowanie

1. Cel i zakres

Metoda jest odpowiednia do identyfikowania azotanów (III) w kosmetykach, szczególnie w kremach i pastach.

2. Zasada

Na obecność azotanu (III) wskazuje powstawanie barwnych pochodnych z fenylohydrazonem aldehydu 2-aminobenzoowego (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 chlorowodorowy: rozcieńczyć 1 ml stężonego kwasu chlorowodorowego ($d_4^{20} = 1,19$) w 11 ml wody destylowanej.

3.3. Metanol

3.4. Roztwór fenylohydrazonu aldehydu 2-aminobenzoowego (odczynnik Nitrin®) w metanolu. Odważyć 2,0 g Nitrinu® i przenieść ilościowo do 100 ml kolby miarowej. Dodać kroplami 4 ml rozcieńzonego kwasu chlorowodorowego (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 szklaną, 10 x 10 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 obejrzyć ją w świetle dziennym. Czerwonawopurpurowe zabarwienie wskazuje na obecność azotanu (III). Jeśli zawartość azotanu (III) jest niewielka, czerwonawopurpurowa barwa zmienia się w żółtą po 5 do 15 sekundach. Jeśli obecne są duże ilości azotanu (III), taka zmiana barwy zachodzi dopiero po 1 do 2 minut.
6. Uwaga
Intensywność czerwonawopurpurowej barwy i czas, który upływa przed jej zmianą na żółtą, może być wskazówką do oceny zawartości azotanu (III) w próbce.

B. Oznaczanie

1. Cel
Metoda opisuje znaczenie azotanów (III) w kosmetykach.
2. Definicja
Zawartość azotanów (III) w próbce, oznaczona zgodnie z tą metodą, jest wyrażona w % masowych azotanu (III) sodu.
3. Zasada
Po rozcieńczeniu próbki wodą i wyklarowaniu roztworu azotan (III) obecny w próbce jest poddany reakcji z sulfaniloamidem i N-1-naftyloetylenodiaminą. Następnie oznacza się absorbancję barwnego roztworu 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 azotanu (III) sodu:
Rozpuścić 0,500 g azotanu (III) 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 % chlorowodoru sulfaniloamidu: rozpuścić 2,0 g sulfaniloamidu w 800 ml wody podczas ogrzewania. Schłodzić i dodać mieszając 100 ml stężonego kwasu chlorowodorowego. Rozcieńczyć wodą do 1 000 ml.
- 4.5. 5 N kwas chlorowodorowy
- 4.6. Odczynnik N-1-naftyłowy
Roztwór ten musi być przygotowany w dniu zastosowania. Rozpuścić 0,1 g chlorowodoru N-1-naftyloetylenodiaminy 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 jednomiarowe
 - 5.4. Cylindry miarowe 100 ml
 - 5.5. Sączi filtracyjne karbowane o średnicy 15 cm, niezawierające azotanów (III)
 - 5.6. Łaźnia wodna
 - 5.7. Spektrofotometr z kuwetami 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 za 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 sącze 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 chlorowodoru sulfaniloamidu (4.4.) i następnie 6,0 ml 5N roztworu kwasu chlorowodorowego (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. Za pomocą spektrofotometru (5.7.) zmierzyć absorbancję przy 538 nm roztworu otrzymanego według punktu 6.6., używając ślepej próby (6.7.) jako odnośnika.
 - 6.9. Odczytać z wykresu wzorcowego (6.10.) zawartość azotanu (III) sodu w mikrogramach na 100 ml roztworu (m_1 mikrogramów), która odpowiada gęstości optycznej zmierzonej w punkcie 6.8.
 - 6.10. Przygotować wykres wzorcowy dla stężeń 0, 20, 40, 60, 80, 100 µg azotanu (III) sodu w 100 ml, stosując roztwór azotanu sodowego (III) o stężeniu 10 µg na ml (4.2.).
7. Obliczenia
Obliczyć zawartość azotanu (III) sodu w procentach masowych za pomocą następującego wzoru:

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

w którym:

- m – masa próbki pobranej do analizy w gramach,
- m_1 – zawartość azotanu (III) 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 azotanu (III) sodu różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekroczyć wartości absolutnej 0,005 %.

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 0,05 M 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. Nasycona elektroda kalomelowa

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. Zwykłe szklane wyposażenie laboratoryjne

5.1.2.2. Pehametr, korzystnie, jeśli wyposażony w rejestrator

5.1.2.3. Szklana elektroda membranowa

5.1.2.4. Nasycona elektroda kalomelowa

5.1.3. Procedura

Zważyć 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

Wyznaczyć 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 przypadku 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. Zwykłe szklane wyposażenie laboratoryjne

5.2.2.2. Pehametr, korzystnie, jeśli z rejestratorem

5.2.2.3. Szklana elektroda membranowa

5.2.2.4. Nasycona elektroda kalomelowa

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 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

- 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 przegięcia 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 równoległe na tej samej próbce nie powinna przekraczać wartości bezwzględnej 0,25 %.

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 wzorzec 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 chlorowodorowy 25 % (m/m)
 - 4.2. Metanol
 - 4.3. Etanol 96 % (v/v)
 - 4.4. Gotowe płytki do chromatografii cienkowarstwowej (TLC) (pokryte żelem krzemionkowym, tworzywowe lub aluminiowe) ze wskaźnikiem fluorescencyjnym. Należy dezaktywować płytki w następujący sposób: spryskać zwykle pokryte żelem 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 zdezaktywowane, 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 wzorca wewnętrznego: rozpuścić 400 mg 3,5-dihydroksytoluen (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)trifluoroacetamid (BSTFA)
 - 4.9.2. Heksametylodisilazan (HMDS)
 - 4.9.3. Trimetylochlorosilan (TMCS).

5. Aparatura

5.1. Zwykłe 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 chlorowodorowym (4.1.), dopóki mieszanina nie stanie się kwaśna (średnio potrzeba 2 do 4 ml), dodać 10 ml (40 mg DHT) roztworu wzorca 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 żelem 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. Nakropić 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 (niewysyczonej) 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 brzegowej 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. Siliłować 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 połowie 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: $S = \text{powierzchnia pików rezorcyny} / \text{powierzchnia pików DHT}$.

7. Obliczenia

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

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

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 (ISO 5725)

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

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 stężeń 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 nieaerozolowych.

5.2. Kolby miarowe, 100 ml

- 5.3. Pipety, 2 ml, 20 ml, od 0 do 1 ml
- 5.4. Mikrostrzykawkki 0 do 100 μ l i 0 do 5 μ l (tylko dla próbek aerozolowych), specjalne szczelne gazowe strzykawkki 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 nieaerozolowych 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 % Halleomid M 18 na Chromosorb 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 którym:

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

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

w którym:

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,
 Czulość 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. Krzywa wzorcowa

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

Stężenie względne (m/m %)	Metanol (ml)	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 μ l 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 krzywą wzorcową 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 wzorcowych. Mieszaniny przygotowuje się przez odmierzanie mikrostrzykawką i pipetą, jednak należy ustalić dokładną ilość składnika przez bezpośrednie zważenie pipety lub kolby po każdym dodaniu składnika.

Stężenie względne (m/m %)	Metanol (μ l)	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 μ l 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 krzywą wzorcową 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).

7.3. Krzywa wzorcowa musi być linią prostą.

8. Powtarzalność (ISO 5725)

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 %.

Oznaczanie dichlorometanu i 1,1,1-trichloroetanu

1. Cel i zakres stosowania
Przedstawiona metoda obejmuje oznaczanie dichlorometanu (chlorek metylenu) i 1,1,1-trichloroetanu (chloroform metylowy) we wszystkich produktach kosmetycznych 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 wzorcem wewnętrznym.
4. Odczynniki
Wszystkie odczynniki muszą być czystości analitycznej.
 - 4.1. Chloroform (CHCl_3).
 - 4.2. Tetrachlorek węgla (CCl_4).
 - 4.3. Dichlorometan (CH_2Cl_2).
 - 4.4. 1,1,1-trichloroetan (CH_3CCl_3).
 - 4.5. Aceton.
 - 4.6. Azot.
5. Aparatura
 - 5.1. Zwykły sprzęt laboratoryjny
 - 5.2. Chromatograf gazowy wyposażony w detektor przewodnictwa cieplnego
 - 5.3. Butelka do przenoszenia, 50-100 ml
 - 5.4. Ciśnieniowa strzykawka gazowa, 25 lub 50 μl .
6. Procedura
 - 6.1. Próbka pod normalnym ciśnieniem: odważyć dokładnie próbkę w kolbie stożkowej zamykanej korkiem. Wprowadzić dokładnie zważoną ilość chloroformu (4.1.) jako wzorec wewnętrzny równoważny przewidywanej ilości dichlorometanu i 1,1,1-trichloroetanu zawartych w próbce. Dokładnie wymieszać.
 - 6.2. Próbka 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 wzorec wewnętrzny, równoważny przewidywanej ilości dichlorometanu i/lub 1,1,1-trichloroetanu zawartych w próbce. Dokładnie wymieszać. Przemyc martwą objętość zaworu 0,5 ml tetrachlorku węgla (4.2.). Po wysuszeniu, oznaczyć różnicowo dokładnie dodaną masę wzorca wewnętrznego.
 - 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, powierzchnie zaworu i części przenoszącej 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:
Połączenie 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 Hallecomidu M 18 osadzonego na chromosorbie. Kolumna powinna mieć zdolność rozdzielczą „R” równą lub wyższą niż 1,5, gdzie:

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

w którym:

r_1 i r_2 – czasy retencji (w minutach),

W_1 i W_2 – szerokości piku w połowie wysokości (w milimetrach),

d' – szybkość przesuwu papieru (w milimetrach na minutę).

7.3.

Jako przykład poniższe kolumny dały oczekiwane wyniki:

<i>Kolumna</i>	<i>I</i>	<i>II</i>
Materiał	Rurka ze stali nierdzewnej	Rurka ze stali nierdzewnej
Długość	350 cm	400 cm
Średnica	3 mm	6 mm
Nośnik:		
chromosorb	WAW	WAW-DMCS-IIP
analiza sitowa	100–120 oczek	60–80 oczek
Faza stacjonarna	Hallecomid M18, 10 %	Hallecomid M18, 20 %

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

<i>Kolumna</i>	<i>I</i>	<i>II</i>
Temperatury:		
kolumna	65 °C	75 °C
dozownik	150 °C	125 °C
detektor	150 °C	200 °C
Gaz nośny:		
szybkość przepływu helu	45 ml/min	60 ml/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 reakcji substancji „p” w stosunku do substancji „a”
wybranej jako wzorzec wewnętrzny.
Podać najpierw dane o pierwszej substancji oznaczonej „p”, gdzie:
 k_p – jej współczynnik reakcji,
 m_p – jej masa w mieszaninie,
 A_p – powierzchnia jej pików.
Następnie podać dane o substancji „a”, przyjmując:
 k_a – jej współczynnik reakcji,
 M_a – jej masa w mieszaninie,
 A_a – powierzchnia jej pików.

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

zatem:

Przykładowo otrzymano następujące współczynniki reakcji (przyjmując dla chloroformu $k = 1$) dla:

Dichlorometanu: $k_1 = 0,78 \pm 0,03$

1,1,1-trichloroetanu: $k_2 = 1,00 \pm 0,03$

- 9.2. Obliczyć obecność w % (m/m) dichlorometanu i 1,1,1-trichloroetanu w analizowanej próbce,
przyjmując:
 m_a – masa (w gramach) wprowadzonego chloroformu,
 M_s – masa (w gramach) analizowanej próbki,
 A_a – powierzchnia pików chloroformu,
 A_1 – powierzchnia pików dichlorometanu,
 A_2 – powierzchnia pików 1,1,1-trichloroetanu.

wtedy:

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

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

10. Powtarzalność (ISO 5725)
Dla zawartości dichlorometanu i/lub 1,1,1-trichloroetanu 25 % (m/m) różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać wartości 2,5 % (m/m).

Identyfikowanie i oznaczanie chinolin-8-olu i siarczanu bis (8-hydroksychinoliny)

1. Cel i zakres stosowania
Metoda opisuje identyfikowanie i ilościowe oznaczanie chinolin-8-olu i siarczanu bis(8-hydroksychinoliny).
2. Definicja
Zawartość chinolin-8-olu i siarczanu bis(8-hydroksychinoliny) w próbce wyrobu oznaczana zgodnie z tą metodą jest wyrażona w procentach masowych chinolin-8-olu.
3. Zasada
- 3.1. Identyfikowanie
Identyfikowanie wykonuje się metodą chromatografii cienkowarstwowej.
- 3.2. Oznaczanie
Oznaczanie przeprowadza się metodą spektrometryczną przez pomiar gęstości optycznej przy 410 nm kompleksu otrzymanego w reakcji z roztworem Fehlinga.
4. Odczynniki
Wszystkie odczynniki powinny być czystości analitycznej.
- 4.1. Chinolin-8-ol.
- 4.2. Benzen. Ze względu na jego toksyczność należy przedsięwziąć środki ostrożności podczas pracy z benzenem.
- 4.3. Chloroform.
- 4.4. Wodny roztwór wodorotlenku sodu, 50 % (m/m).
- 4.5. Pentahydrat siarczanu miedzi.
- 4.6. Winian sodowo-potasowy.
- 4.7. M roztwór kwasu chlorowodorowego.
- 4.8. 0,5 M roztwór kwasu siarkowego.
- 4.9. M roztwór wodorotlenku sodu.
- 4.10. Etanol.
- 4.11. Butan-1-ol.
- 4.12. Kwas octowy lodowaty.
- 4.13. 0,1 M roztwór kwasu chlorowodorowego.
- 4.14. „Celit 545” lub równoważny.
- 4.15. Roztwory standardowe
- 4.15.1. Odważyć 100 mg chinolin-8-olu (4.1.) w 100 ml kolbie miarowej. Rozpuścić w małej ilości kwasu siarkowego (4.8.). Uzupelnąć do kreski roztworem kwasu siarkowego (4.8.).
- 4.15.2. Odważyć 100 mg chinolin-8-olu w 100 ml kolbie miarowej. Rozpuścić w etanolu (4.10.). Uzupelnąć do kreski etanolem (4.10.) i wymieszać.

- 4.16. Roztwór Fehlinga
Roztwór A
Odważyć 7 g pentahydratu siarczanu miedzi (4.5.) w 100 ml kolbie miarowej. Rozpuścić w małej ilości wody. Uzupełnić do kreski wodą i wymieszać.
Roztwór B
Odważyć 35 g winianu sodowo-potasowego (4.6.) w 100 ml kolbie miarowej. Rozpuścić w 50 ml wody. Dodać 20 ml wodorotlenku sodu (4.4.). Uzupełnić wodą do kreski i wymieszać. Bezpośrednio przed analizą przenieść po 10 ml roztworu A i roztworu B do 100 ml kolby miarowej. Uzupełnić do kreski i wymieszać.
- 4.17. Roztwory wymywające do chromatografii cienkowarstwowej
I: Butan-1-ol (4.11.)/kwas octowy (4.12.)/woda (80:20:20; v/v/v).
II: Chloroform (4.13.)/kwas octowy (4.12.) (95:5; v/v).
- 4.18. 2,6-dichloro-4-(chloroimino)cykloheksa-2,5-dienon, 1 % (m/v) roztwór w etanolu (4.10.).
- 4.19. Węglan sodu, 1 % (m/v) roztwór wodny.
- 4.20. Etanol (4.10.), 30 % (v/v) roztwór wodny.
- 4.21. Etylenodiaminotetraoctan disodu, 5 % (m/v) roztwór wodny.
- 4.22. Roztwór buforowy o pH = 7
Odważyć 27 g bezwodnego diwodoroortofosforanu potasu i 70 g trihydratu wodoroortofosforanu disodu w jednolitrowej kolbie miarowej. Uzupełnić wodą do kreski.
- 4.23. Gotowe płytki do chromatografii cienkowarstwowej
Gotowe płytki do chromatografii cienkowarstwowej o grubości 0,25 mm (na przykład Merck Kieselgel 60 lub równoważne). Przed użyciem spryskać 10 ml odczynnika (4.21.) i wysuszyć w 80 °C.
5. Aparatura
- 5.1. 100 ml kolba okrągłodenna ze szlifem.
- 5.2. Kolby miarowe.
- 5.3. Pipety kalibrowane, 10 i 5 ml.
- 5.4. Pipety ze zbiornikiem gruszkowym, 20, 15, 10 i 5 ml.
- 5.5. Rozdzielacze, 100, 50 i 25 ml.
- 5.6. Karbowana bibuła filtracyjna, średnica 90 mm.
- 5.7. Wyparka obrotowa.
- 5.8. Chłodnica zwrotna ze szlifem.
- 5.9. Spektrofotometr.
- 5.10. Kuwety o długości drogi optycznej 10 mm.
- 5.11. Mieszadło magnetyczne z ogrzewaniem.
- 5.12. Wymiary szklanej kolumny chromatograficznej: długość 160 mm, średnica 8 mm, przewężenie w dolnym końcu zawiera tampon z waty szklanej, a w górnym końcu łącznik do podłączenia dopływu zwiększonego ciśnienia.
6. Procedura
- 6.1. Identyfikowanie
- 6.1.1. Próbkę ciekłą
- 6.1.1.1. Odczyn części badanej próbki doprowadza się do pH = 7,5 i nanosi się 10 µl na linię bazową przygotowanej uprzednio płytki z żelą krzemionkowym (4.23.).
- 6.1.1.2. 10 i 30 µl roztworu standardowego (4.15.2.) nanosi się w dwóch dodatkowych punktach linii początkowej, po czym chromatogram na płytce jest rozwijany w jednym z dwóch roztworów wymywających (4.17.).
- 6.1.1.3. Kiedy czoło rozpuszczalnika osiągnie 150 mm, płytkę suszy się w 110 °C przez 15 minut. W świetle lampy UV (366 nm) plamy chinolin-8-olu dają żółtą fluorescencję.

- 6.1.1.4. Spryskać płytkę roztworem węglanu sodu (4.19.). Wysuszyć i spryskać roztworem 2,6-dichloro-4-(chloroimino)-cykloheksa-2,5-dienonu (4.18.). Chinolin-8-ol staje się widoczny w postaci niebieskiej plamy.
- 6.1.2. **Próbki stałe lub kremy**
- 6.1.2.1. Rozproszyć 1 g próbki w 5 ml roztworu buforowego (4.22.). Następnie przenieść z 10 ml chloroformu (4.3.) do rozdzielacza i wytrząsnąć. Po oddzieleniu warstwy chloroformowej, warstwę wodną ekstrahować jeszcze dwa razy po 10 ml chloroformu (4.3.). Odparować połączone i przesączone ekstrakty chloroformowe prawie do sucha w 100 ml kolbie okrągłodennej (5.1.) na wyparce obrotowej (5.7.). Rozpuścić pozostałość w 2 ml chloroformu (4.3.) i nanieść po 10 i 30 μ l otrzymanego roztworu na płytkę do chromatografii cienkowarstwowej z żelem krzemionkowym (4.23.) i postępować dalej zgodnie z metodą opisaną w ppkt 6.1.1.1.
- 6.1.2.2. Nanieść 10 i 30 μ l roztworu standardowego (4.15.2.) na płytkę i kontynuować postępowanie zgodnie z opisem w ppkt 6.1.1.2.–6.1.1.4.
- 6.2. **Oznaczanie**
- 6.2.1. **Próbki ciekłe**
- 6.2.1.1. Odważyć 5 g próbki w 100 ml kolbie okrągłodennej. Dodać 1 ml roztworu kwasu siarkowego (4.8.) i odparować mieszaninę prawie do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem w 50 °C.
- 6.2.1.2. Rozpuścić tę pozostałość w 20 ml ciepłej wody. Przenieść do 100 ml kolby miarowej. Przeemyć trzykrotnie 20 ml wody. Uzupełnić do 100 ml wodą i wymieszać.
- 6.2.1.3. Wprowadzić pipetą 5 ml tego roztworu do 50 ml rozdzielacza (5.5.). Dodać 10 ml roztworu Fehlinga (4.16.). Ekstrahować otrzymany kompleks chinolin-8-olu miedzi [w ISO: Cu-oksyna] trzykrotnie po 8 ml chloroformu (4.3.).
- 6.2.1.4. Przesączyć i zebrać warstwy chloroformowe w 25 ml kolbie miarowej (5.2.). Uzupełnić do kreski chloroformem (4.3.) i wytrząsnąć. Zmierzyć absorbcję żółtego roztworu w porównaniu z chloroformem przy 410 nm.
- 6.2.2. **Próbki stałe lub kremy**
- 6.2.2.1. Odważyć 0,500 g próbki w 100 ml kolbie okrągłodennej (5.1.). Dodać 30 ml benzenu (4.2.) i 20 ml kwasu chlorowodorowego (4.7.). Ogrzewać zawartość kolby do wrzenia pod chłodnicą zwrotną, z mieszaniem w ciągu 30 minut.
- 6.2.2.2. Przenieść zawartość kolby do 100 ml rozdzielacza (5.5.). Popłukać 5 ml 1 N kwasu chlorowodorowego (4.7.). Przenieść fazę wodną do kolby okrągłodennej (5.1.) i przeemyć warstwę benzenową 5 ml kwasu chlorowodorowego (4.7.).
- 6.2.2.3. W przypadku emulsji, które utrudniają dalsze działania, zmieszać 0,500 g próbki z 2 g Celitu 545 (4.14.) do utworzenia sypkiego proszku. Przenieść mieszaninę w małych porcjach na szklaną kolumnę chromatograficzną (5.12.). Po każdym dodaniu mieszaniny ubijać wypełnienie kolumny do dołu. Natychmiast po przeniesieniu całej mieszaniny do kolumny, należy wymywać ją kwasem chlorowodorowym (4.13.) w taki sposób, aby otrzymać 10 ml eluatu średnio w ciągu 10 minut (jeśli to konieczne, wymywanie można wykonać pod niewielkim ciśnieniem azotu). Podczas wymywania należy się upewnić, czy pewna warstwa kwasu chlorowodorowego zawsze znajduje się powyżej wypełnienia kolumny. Pierwsze 10 ml eluatu jest następnie poddane postępowaniu opisanemu w ppkt 6.2.2.4.
- 6.2.2.4. Odparować zebrane warstwy wodne (6.2.2.2.) lub eluaty (6.2.2.3.) prawie do sucha w wyparce obrotowej pod zmniejszonym ciśnieniem.

- 6.2.2.5. Rozpuścić pozostałość w 6 ml roztworu wodorotlenku sodu (4.9.). Dodać 20 ml roztworu Fehlinga (4.16.) i przenieść zawartość kolby do 50 ml rozdzielacza (5.5.). Popłukać kolbę 8 ml chloroformu (4.3.). Wyrząsnąć i przesączyć warstwę chloroformową do 50 ml kolby miarowej (5.2.).
- 6.2.2.6. Powtórzyć trzykrotnie ekstrakcję chloroformem (4.3.). Przesączyć warstwy chloroformowe i zebrać w 50 ml kolbie miarowej. Uzupelnąć do kreski chloroformem (4.3.) i wyrząsnąć. Zmierzyć absorbancję żółtego roztworu w porównaniu z chloroformem (4.3.) przy 410 nm.
7. Krzywa wzorcowa
Do czterech 100 ml kolb okrągłodennych (5.1.), każdej zawierającej 3 ml 30 % wodnego roztworu etanolu (4.20.), dodać pipetą porcje po 5, 10, 15 i 20 ml roztworu standardowego (4.15.1.) odpowiadające 5, 10, 15 i 20 mg chinolin-8-olu. Postępować zgodnie z opisem w ppkt 6.2.1.
8. Obliczenie
- 8.1. Próbkę ciekłą
- $$\text{Zawartość chinolin-8-olu (w \% m/m)} = \frac{a}{m} \times 100,$$
- gdzie:
a – ilość miligramów chinolin-8-olu odczytana z krzywej wzorcowej (7.),
m – ilość (w miligramach) próbki analitycznej (6.2.1.1.).
- 8.2. Próbkę stałą lub kremy
- $$\text{Zawartość chinolin-8-olu (w \% m/m)} = \frac{2a}{m} \times 100,$$
- gdzie:
a – ilość miligramów chinolin-8-olu odczytana z krzywej wzorcowej (7.),
m – ilość (w miligramach) próbki analitycznej (6.2.1.1.).
9. Powtarzalność (ISO 5725)
Dla zawartości około 0,3 % chinolin-8-olu różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekroczyć wartości absolutnej 0,02 %.

Oznaczanie amoniaku

1. Cel i zakres stosowania
Celem metody jest oznaczanie wolnego amoniaku w produktach kosmetycznych.
2. Definicja
Zawartość amoniaku w próbce wyrobu jest wyrażona w procentach masowych amoniaku.
3. Zasada
Roztwór chlorku baru dodaje się do próbki analitycznej produktu kosmetycznego rozeienczonej w środowisku wodno-metanolowym. Osad, który powstaje, zostaje odsączony lub odwirowany. Taki sposób postępowania pozwala uniknąć strat amoniaku podczas destylacji z parą wodną, z pewnych soli amonowych węglanu lub wodorowęglanu i soli kwasów tłuszczowych, z wyjątkiem octanu amonu.
Amoniak jest oddestylowany z przesączu lub z warstwy nad osadu z wirówki z parą wodną i oznaczany miareczkowaniem potencjometrycznym lub innym.

4. Odczynniki
Wszystkie odczynniki powinny być czystości analitycznej.
- 4.1. Metanol.
- 4.2. Dihydrat chlorku baru, roztwór 25 % (m/v).
- 4.3. Kwas ortoborowy, roztwór 4 % (m/v).
- 4.4. Kwas siarkowy, standardowy roztwór 0,25 M.
- 4.5. Ciecz przeciwdziałająca pienieniu.
- 4.6. Wodorotlenek sodu, standardowy roztwór 0,5 M.
- 4.7. Wskaźnik, jeśli potrzeba: zmieszać 5 ml 0,1 % (m/v) etanolowego roztworu czerwieni metylowej z 2 ml 0,1 % (m/v) wodnego roztworu błękitu metylenowego.
5. Aparatura
- 5.1. Zwykły sprzęt laboratoryjny.
- 5.2. Wirówka z zamykanymi 100 ml probówkami.
- 5.3. Aparatura do destylacji z parą wodną.
- 5.4. Potencjometr.
- 5.5. Pomiarowa elektroda szklana i nasycona elektroda kalomelowa.
6. Procedura
- 6.1. Odważyć do 100 ml kolby miarowej masę (m) próbki odpowiadającej najwyżej 150 mg amoniaku.
- 6.2. Dodać 10 ml wody, 10 ml metanolu (4.1.) i 10 ml roztworu chlorku baru (4.2.). Uzupełnić metanolem (4.1.) do 100 ml.
- 6.3. Wymieszać i pozostawić na noc w lodówce (5 °C).
- 6.4. Następnie przesączyć lub odwirować przez 10 minut roztwór w zamkniętych probówkach tak, aby otrzymać przezroczysty przesącz lub sklarowaną warstwę nad osadem.
- 6.5. Wprowadzić pipetą 40 ml tego przezroczystego roztworu do aparatury do destylacji z parą wodną (5.3.) i następnie dodać, jeśli potrzeba, 0,5 ml cieczy przeciwdziałającej pienieniu (4.5.).
- 6.6. Destylować i zebrać 200 ml destylatu w 250 ml zlewce zawierającej 10 ml standardowego kwasu siarkowego (4.4.) i 0,1 ml wskaźnika (4.7.).
- 6.7. Odmiareczkować nadmiar kwasu standardowym roztworem wodorotlenku sodu (4.6.).
- 6.8. *Uwaga:* W przypadku oznaczenia potencjometrycznego, zebrać 200 ml destylatu w 250 ml zlewce zawierającej 25 ml roztworu kwasu ortoborowego (4.3.) i miareczkować standardowym kwasem siarkowym (4.4.), zapisując krzywą zobojętniania.
7. Obliczenia
- 7.1. Obliczanie w przypadku odmiareczkowania nadmiaru
Przyjęto:
 V_1 – objętość (w mililitrach) użytego roztworu wodorotlenku sodu (4.6.),
 M_1 – jego rzeczywiste stężenie molowe (4.6.),
 M_2 – stężenie molowe roztworu kwasu siarkowego (4.4.),
 m – masa (w miligramach) pobranej próbki analitycznej (6.1.),
zatem:
zawartość amoniaku % (m/m) =
$$\frac{(20 M_2 - V_1 M_1) \times 17 \times 100}{0,4 m} = \frac{(20 M_2 - V_1 M_1) \times 4250}{m}$$
- 7.2. Obliczanie w przypadku bezpośredniego miareczkowania potencjometrycznego
Przyjęto:
 V_2 – objętość (w mililitrach) użytego roztworu kwasu siarkowego (4.4.),
 M_2 – jego rzeczywiste stężenie molowe (4.4.),
 m – masa (w miligramach) pobranej próbki analitycznej (6.1.),

zatem:

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

8. **Powtarzalność (ISO 5725)**
Dla zawartości amoniaku około 6 % różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać absolutnej wartości 0,6 %.

Identyfikowanie i oznaczanie nitrometanu

1. **Cel i zakres stosowania**
Metoda jest odpowiednia do identyfikowania i oznaczania nitrometanu do zawartości około 0,3 % w produktach kosmetycznych w opakowaniach aerozolowych.
2. **Definicja**
Zawartość nitrometanu w próbce wyrobu oznaczona zgodnie z tą metodą jest wyrażona w procentach masowych nitrometanu w stosunku do całkowitej zawartości opakowania aerozolowego.
3. **Zasada**
Nitrometan jest identyfikowany w reakcji barwnej. Nitrometan jest oznaczany metodą chromatografii gazowej po dodaniu wzorca wewnętrznego.
4. **Identyfikowanie**
 - 4.1. **Odczynniki**
Wszystkie odczynniki powinny być czystości analitycznej.
 - 4.1.1. Wodorotlenek sodu, 0,5 M roztwór.
 - 4.1.2. Odczynnik Folina
Rozpuścić 0,1 g 3,4-dioksyo-3,4-dihydronaftaleno-1-sulfonianu sodu w wodzie i rozcieńczyć do 100 ml.
 - 4.2. **Procedura**
Do 1 ml próbki dodać 10 ml z ppkt 4.1.1. i 1 ml z ppkt 4.1.2. Fioletowe zabarwienie wskazuje na obecność nitrometanu.
5. **Oznaczanie**
 - 5.1. **Odczynniki**
Wszystkie odczynniki powinny być czystości analitycznej.
 - 5.1.1. Chloroform (wzorec wewnętrzny 1).
 - 5.1.2. 2,4-dimetyloheptan (wzorec wewnętrzny 2).
 - 5.1.3. Etanol, 95 %.
 - 5.1.4. Nitrometan.
 - 5.1.5. Chloroformowy roztwór wzorcowy
Do wytarowanej 25 ml kolby miarowej wprowadzić 650 mg chloroformu (5.1.1.). Dokładnie zważyć ponownie kolbę i zawartość. Uzupelnąć do 25 ml 95 % etanolem (5.1.3.). Zważyć i obliczyć procent masowy chloroformu w tym roztworze.
 - 5.1.6. **Roztwór odniesienia 2,4-dimetyloheptanu**
Sporządzić w podobny sposób jak chloroformowy roztwór odniesienia, lecz zważyć 270 mg 2,4-dimetyloheptanu (5.1.2.) w kolbie miarowej pojemności 25 ml.
 - 5.2. **Aparatura**
 - 5.2.1. Chromatograf gazowy z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym.
 - 5.2.2. Aparatura do pobierania próbek aerozoli (butelka do przenoszenia, łączniki do mikrostrzykawek itp.).

- 5.2.3. Zwykły sprzęt laboratoryjny.
- 5.3. Procedura
- 5.3.1. Przygotowanie próbki
Do 100 ml wytarowanej butelki do przenoszenia, przepłukanej lub opróżnionej z gazów, zgodnie z opisem postępowania, wprowadzić około 5 ml jednego z roztworów standardowych (5.1.5. lub 5.1.6.). Stosować szklaną strzykawkę pojemności 10 lub 20 ml, bez igły, dostosowaną do części łączących. Zważyć ponownie dla oznaczenia wprowadzanej ilości. Stosując ten sam sposób, przenieść do tej butelki około 50 g zawartości próbki z opakowania aerozolowego. Ponownie zważyć dla określenia ilości przeniesionej próbki. Dobrze wymieszać. Wprowadzić około 10 µl próbki, stosując mikrostrzykawkę (5.2.2.) Wykonać pięć wstrzyknięć próbki.
- 5.3.2. Przygotowanie próby standardowej
W 50 ml kolbie miarowej zważyć dokładnie około 500 mg nitrometanu (5.1.4.) i 500 mg chloroformu (5.1.1.) lub 210 mg 2,4-dimetyloheptanu (5.1.2.). Uzpełnić objętość 95 % etanolem (5.1.3.). Dobrze wymieszać. Umieścić 5 ml tego roztworu w 20 ml kolbie miarowej. Uzpełnić objętość 95 % etanolem (5.1.3.). Wprowadzić około 10 µl próbki, stosując mikrostrzykawkę (5.2.2.). Wykonać pięć wstrzyknięć próbki.
- 5.3.3. Warunki chromatografii gazowej
- 5.3.3.1. Kolumna
Składa się z dwóch części, pierwszej zawierającej jako wypełnienie ftalan didecyłu osadzony na Gas Chrom Q, drugiej zawierającej jako wypełnienie Ucon 50 HB 280X na Gas Chrom Q. Przygotowana połączona kolumna powinna mieć zdolność rozdzielczą „R” równą lub lepszą niż 1,5, gdzie:

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

w którym:

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/minutę).

Jako przykład uzyskano wymaganą rozdzielczość na kolumnie zawierającej następujące dwie części:

Kolumna A:

Materiał: stal nierdzewna.

Długość: 1,5 m.

Średnica: 3 mm.

Wypełnienie: 20 % ftalan didecyłu na Gas Chrom Q (100–120 oczek).

Kolumna B:

Materiał: stal nierdzewna.

Długość: 1,5 m.

Średnica: 3 mm.

Wypełnienie: 20 % Ucon 50 HB 280X na nośniku Gas Chrom Q (100–120 oczek).

5.3.3.2. Detektor

Odpowiedni poziom czułości dla elektrometru detektora płomieniowo-jonizacyjnego wynosi 8×10^{-10} A.

- 5.3.3.3. Warunki temperaturowe.
Stwierdzono, że odpowiednie są następujące warunki:
Otwór wlotowy dozownika: 150 °C,
Detektor: 150 °C,
Kolumna: między 50 i 80 °C zależnie od pojedynczych kolumn i aparatu.
- 5.3.3.4. Odpowiednie zasilanie gazem
Gaz nośny: azot.
Ciśnienie: 2,1 bara.
Przepływ: 40 ml/min.
Zasilanie detektora: według wskazówek producenta detektora.
6. Obliczenia
- 6.1. Współczynnik reakcji nitrometanu, obliczony w stosunku do użytego wzorca wewnętrznego
Jeżeli „n” oznacza nitrometan,
przyjęto:
 k_n – jego współczynnik reakcji,
 m'_n – jego masa (w gramach) w mieszaninie,
 S'_n – powierzchnia jego piku.
Jeśli „c” oznacza wzorec wewnętrzny, chloroform lub 2,4-dimetyloheptan,
przyjęto:
 m'_c – jego masa (w gramach) w mieszaninie,
 S'_c – powierzchnia jego piku,

zatem:

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

(k_n zależy od rodzaju aparatury).

- 6.2. Stężenie nitrometanu w próbce
Jeżeli „n” oznacza nitrometan,
przyjęto:
 k_n – jego współczynnik reakcji,
 S_n – powierzchnia jego piku.
Jeśli „c” oznacza wewnętrzny wzorec, chloroform lub 2,4-dimetyloheptan,
przyjęto:
 m_c – jego masa (w gramach) w mieszaninie,
 S_c – powierzchnia jego piku,
 M – masa (w gramach) przeniesionej próbki aerozolu,

zatem zawartość nitrometanu w próbce wynosi:

$$\% \text{ m/m nitrometanu} = \frac{m_c}{M} \times \frac{k_n \times S_n}{S_c} \times 100$$

7. Powtarzalność (ISO 5725)
Dla zawartości nitrometanu około 0,3 % (m/m) różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekroczyć wartości absolutnej 0,03 % (m/m).

Identyfikowanie i oznaczanie kwasu merkaptooctowego w środkach do trwałej ondulacji, prostowania włosów i depilowania

1. **Cel i zakres stosowania**
Celem metody jest identyfikowanie i oznaczanie kwasu merkaptooctowego w środkach do trwałej ondulacji, prostowania włosów i depilowania, w których mogą się znajdować inne środki redukujące.
2. **Definicja**
Zawartość kwasu merkaptooctowego oznaczona zgodnie z tą metodą jest wyrażona w procentach masowych kwasu merkaptooctowego.
3. **Zasada**
Kwas merkaptooctowy identyfikuje się w testach kroplowych i metodą chromatografii cienkowsarstwowej i oznacza jodometrycznie lub metodą chromatografii gazowej.
4. **Identyfikowanie**
 - 4.1. **Identyfikowanie w testach kroplowych**
 - 4.1.1. **Odczynniki**
Wszystkie odczynniki powinny być czystości analitycznej.
 - 4.1.1.1. **Bibula z dioctanem ołowiu.**
 - 4.1.1.2. **Roztwór kwasu chlorowodorowego (jedna objętość stężonego kwasu chlorowodorowego i jedna objętość wody).**
 - 4.1.2. **Procedura**
 - 4.1.2.1. **Identyfikowanie kwasu merkaptooctowego przez barwną reakcję z dioctanem ołowiu (II)**
Umieścić kroplę analizowanej próbki na bibule z dioctanem ołowiu (II) (4.1.1.1.). Jeśli pojawi się intensywny żółty kolor, oznacza to, że kwas merkaptooctowy jest prawdopodobnie obecny.
Czułość: 0,5 %.
 - 4.1.2.2. **Wykrywanie siarczków nieorganicznych w reakcji wydzielania siarkowodoru podczas zakwaszania próbki**
Wprowadzić do próbki kilka miligramów badanej próbki. Dodać 2 ml wody destylowanej i 1 ml kwasu chlorowodorowego (4.1.1.2.). Wydziela się siarkowodor, rozpoznawalny po zapachu, oraz czarny osad siarczku ołowiu powstaje na bibule z dioctanem ołowiu (II) (4.1.1.1.).
Czułość: 50 ppm.
 - 4.1.2.3. **Wykrywanie siarczynów w reakcji powstawania ditlenku siarki po zakwaszeniu próbki**
Postępować według opisu w ppkt 4.1.2.2. Doprowadzić do wrzenia. Ditlenek siarki jest rozpoznawalny po zapachu oraz dzięki własnościom redukującym, na przykład wobec jonów nadmanganianowych.
 - 4.2. **Identyfikowanie przez chromatografię cienkowsarstwową**
 - 4.2.1. **Odczynniki**
Wszystkie odczynniki powinny być czystości analitycznej.
 - 4.2.1.1. **Kwas merkaptooctowy (kwas tioglikolowy), o czystości co najmniej 98 % oznaczonej jodometrycznie.**
 - 4.2.1.2. **Kwas 2,2'-ditiodi(octowy), o czystości co najmniej 99 % oznaczonej jodometrycznie.**

- 4.2.1.3. Kwas 2-merkaptopropionowy (kwas tiomlekowy), o czystości co najmniej 95 % oznaczonej jodometrycznie.
- 4.2.1.4. Kwas 3-merkaptopropionowy, o czystości co najmniej 98 % oznaczonej jodometrycznie.
- 4.2.1.5. 3-merkaptopropano-1,2-diol (1-tioglicerol), o czystości co najmniej 98 % oznaczonej jodometrycznie.
- 4.2.1.6. Płytki cienkowarstwowe, z żelazem krzemionkowym, przygotowane fabrycznie o grubości 0,25 mm.
- 4.2.1.7. Płytki cienkowarstwowe, z tlenkiem glinu, Merck F 254 E lub równoważne.
- 4.2.1.8. Stężony kwas chlorowodorowy, $d_4^{20} = 1,19$ g/ml.
- 4.2.1.9. Octan etylu.
- 4.2.1.10. Chloroform.
- 4.2.1.11. Eter diizopropylowy.
- 4.2.1.12. Tetrachlorek węgla.
- 4.2.1.13. Kwas octowy lodowaty.
- 4.2.1.14. Jodek potasu, 1 % (m/v) roztwór wodny.
- 4.2.1.15. Chlorek platyny (IV), 0,1 % (m/v), roztwór wodny.
- 4.2.1.16. Rozpuszczalniki wymywające
 - 4.2.1.16.1. Octan etylu (4.2.1.9.), chloroform (4.2.1.10.), eter diizopropylowy (4.2.1.11.), kwas octowy (4.2.1.13.) (20:20:10:10 objętościowo).
 - 4.2.1.16.2. Chloroform (4.2.1.10.), kwas octowy (4.2.1.13.) (90:20 objętościowo).
- 4.2.1.17. Odczynniki wywołujące
 - 4.2.1.17.1. Wymieszać bezpośrednio przed użyciem jednakowe objętości roztworu (4.2.1.14.) i roztworu (4.2.1.15.).
 - 4.2.1.17.2. Roztwór bromu: 5 % (m/v):
Rozpuścić 5 g bromu w 100 ml tetrachlorku węgla (4.2.1.12.).
 - 4.2.1.17.3. Roztwór fluoresceiny: 0,1 % (m/v):
Rozpuścić 100 mg fluoresceiny w 100 ml etanolu.
 - 4.2.1.17.4. Heptamolibdenian (VI) heksaamonu, 10 % (m/v) roztwór wodny.
- 4.2.1.18. Roztwory odniesienia
 - 4.2.1.18.1. Kwas merkaptooctowy (4.2.1.1.), 0,4 % (m/v) roztwór wodny.
 - 4.2.1.18.2. Kwas 2,2'-ditiiodi(octowy) (4.2.1.2.), 0,4 % (m/v) roztwór wodny.
 - 4.2.1.18.3. Kwas 2-merkaptopropionowy (4.2.1.3.), 0,4 % (m/v) roztwór wodny.
 - 4.2.1.18.4. Kwas 3-merkaptopropionowy (4.2.1.4.), 0,4 % (m/v) roztwór wodny.
 - 4.2.1.18.5. 3-merkaptopropano-1,2-diol (4.2.1.5.), 0,4 % (m/v) roztwór wodny.
- 4.2.2. Aparatura
Zwykła aparatura do chromatografii cienkowarstwowej.
- 4.2.3. Procedura
 - 4.2.3.1. Postępowanie z próbkami
Zakwasić do pH = 1 kilkoma kroplami kwasu chlorowodorowego (4.2.1.8.) i przesączyć, jeśli to konieczne.
W niektórych przypadkach może być pożądanym rozcieńczenie próbki. Jeśli tak, to przed rozcieńczeniem należy zakwasić ją kwasem chlorowodorowym.
 - 4.2.3.2. Rozwijanie chromatogramu (eluowanie)
Umieścić na płytce 1 μ l roztworu próbki (4.2.3.1.) i po 1 μ l każdego z pięciu roztworów odniesienia (4.2.1.18.). Wysuszyć starannie w łagodnym strumieniu azotu i eluować płytki rozpuszczalnikami (4.2.1.16.1. lub 4.2.1.16.2.). Wysuszyć płytkę możliwie najszybciej, aby uniknąć utleniania tioli.
 - 4.2.3.3. Wykrywanie
Spryskać płytkę jednym z trzech reagentów (4.2.1.17.1., 4.2.1.17.3. lub 4.2.1.17.4.).

Jeśli płytkę spryskano odczynnikiem (4.2.1.17.3.), należy następnie poddać ją działaniu pary bromu (na przykład w komorze zawierającej małą zlewkę odczynnika (4.2.1.17.2.) do chwili, w której plamy staną się widoczne. Wykrywanie przez spryskanie odczynnikiem (4.2.1.17.4.) będzie zadowalające tylko wtedy, jeśli czas suszenia cienkiej warstwy nie przekroczy 30 minut.

4.2.3.4. Interpretacja

Porównać wartości R_F i kolory roztworów odniesienia z odpowiednimi wartościami dla roztworów standardowych. Średnie wartości R_F podane poniżej jako ogólna wskazówka mają tylko wartość porównawczą. Zależą one od:

- stanu aktywowania cienkiej warstwy w czasie analizy chromatograficznej,
- temperatury komory chromatograficznej.

Przykładowe wartości R_F otrzymane na płytce z warstwą żelu krzemionkowego

	Roztwory rozwijające	
	4.2.1.16.1.	4.2.1.16.2.
Kwas merkaptooctowy	0,25	0,80
Kwas 2-merkaptopropionowy	0,40	0,95
Kwas 2,2'-ditiiodi(octowy)	0,00	0,35
Kwas 3-merkaptopropionowy	0,45	0,95
3-merkaptopropano-1,2-diol	0,45	0,35

5. Oznaczenie

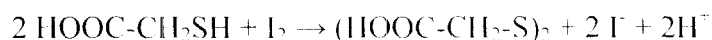
W celu zapobieżenia utlenianiu oznaczenie kwasu merkaptooctowego musi być wykonane z nieużywanego wyrobu ze świeżo otwartego opakowania.

Oznaczenie powinno się zawsze rozpocząć od metody jodometrycznej (jodometrii).

5.1. Jodometria

5.1.1. Zasada

Oznaczenie jest wykonywane przez utlenianie grupy „-SH” jodem w środowisku kwaśnym, zgodnie z równaniem:



5.1.2. Odczynniki

Jod, 0,05 M roztwór standardowy.

5.1.3. Aparatura

Zwykły sprzęt laboratoryjny.

5.1.4. Procedura

Odważyć dokładnie ilość próbki między 0,5 i 1 g w 150 ml kolbie stożkowej zamykanej korkiem zawierającej 50 ml wody destylowanej. Dodać 5 ml kwasu chlorowodorowego (4.1.1.2.) (pH roztworu około 0) i miareczkować roztworem jodu (5.1.2.) aż do pojawienia się żółtego koloru. W razie potrzeby zastosować wskaźnik (np. roztwór skrobi lub tetrachlorek węgla).

- 5.1.5. Obliczenie
Zawartość kwasu merkaptooctowego oblicza się zgodnie ze wzorem:

$$\% \text{ (m/m)} = \frac{92 \times n \times 100}{1\,000 \times 10 \times m} = \frac{0,92 \, n}{m}$$

gdzie:

m – masa (w gramach) próbki analitycznej,

n – objętość użytego roztworu jodu (5.1.2.).

- 5.1.6. Uwagi
Jeśli wynik obliczony jako zawartość kwasu merkaptooctowego wynosi 0,1 % lub znacznie poniżej dozwolonego maksymalnego stężenia, nie ma żadnego powodu dla przeprowadzania następnego oznaczania. Jeśli wynik jest równy lub wyższy od dozwolonego maksymalnego stężenia i identyfikowanie ujawniło obecność kilku środków redukujących, konieczne jest wykonanie oznaczenia metodą chromatografii gazowej.
- 5.2. Chromatografia gazowa
- 5.2.1. Zasada
Kwas merkaptooctowy zostaje wydzielony ze środowiska próbki przez wytrącanie roztworem dioctanu kadmu. Po metylowaniu diazometanem, przygotowanym *in situ* lub lepiej w roztworze eteru dietylowego, pochodna metylowa kwasu merkaptooctowego jest oznaczana chromatografią gazową/cieczową z użyciem kaprylanu metylu jako wzorca wewnętrznego.
- 5.2.2. Odczynniki
Wszystkie odczynniki muszą być czystości analitycznej.
- 5.2.2.1. Kwas merkaptooctowy, 98 %.
- 5.2.2.2. Kwas chlorowodorowy, $d_4^{20} = 1,19 \text{ g/ml}$.
- 5.2.2.3. Metanol.
- 5.2.2.4. Dihydrat dioctanu kadmu (II), 10 % (m/v) roztwór wodny.
- 5.2.2.5. Kaprylan metylu, 2 % (m/v) roztwór w metanolu.
- 5.2.2.6. Octanowy roztwór buforowy (pH = 5):
Trihydrat octanu sodu, 77 g,
Kwas octowy lodowaty, 27,5 g,
Woda demineralizowana do otrzymania końcowej objętości jednego litra.
- 5.2.2.7. Kwas chlorowodorowy, 3 M roztwór w metanolu (5.2.2.3.), świeżo przygotowany.
- 5.2.2.8. l-metylo-3-nitro-l-nitrozoguanidyna.
- 5.2.2.9. Wodorotlenek sodu, roztwór 5 M.
- 5.2.2.10. Jod, 0,05 M roztwór standardowy.
- 5.2.2.11. Eter dietylowy.
- 5.2.2.12. Roztwór diazometanu przygotowany z N-metylo-N-nitrozo-4-toluenosulfonoamidu (Fieser, Reagents for Organic Synthesis (Wiley), 1967)
Otrzymany roztwór zawiera około 1,5 g diazometanu w 100 ml eteru dietylowego. Ponieważ diazometan jest gazem toksycznym i bardzo nietrwałym, wszystkie doświadczenia muszą być prowadzone pod sprawnie działającym wyciągiem oraz należy unikać stosowania aparatury szklanej z połączeniami szlifowymi (istnieją specjalne zestawy przeznaczone do posługiwania się diazometanem).
- 5.2.3. Aparatura
- 5.2.3.1. Zwykły sprzęt laboratoryjny.
- 5.2.3.2. Aparatura do przygotowania diazometanu do metylowania *in situ* (patrz Fales H.M., Jaouni T.M., Babashak J.F., *Analyt. Chem.*, 1973, 45, 2302).
- 5.2.3.3. Aparatura do ulepszonego przygotowania diazometanu (Fieser).

- 5.2.4. Przygotowanie próbki
Zważyć dokładnie w 50 ml probówce wirówki wystarczającą ilość próbki, aby otrzymać przypuszczalną ilość 50–70 mg kwasu merkaptooctowego. Dodać kilka kropel kwasu chlorowodorowego (5.2.2.2.) do otrzymania pH około 3.
Dodać 5 ml demineralizowanej wody i 10 ml roztworu buforu octanowego (5.2.2.6.).
Sprawdzić papierkiem wskaźnikowym, czy pH wynosi około 5. Następnie dodać 5 ml roztworu dioctanu kadmu (5.2.2.4.).
Począkać 10 minut i następnie odwirować w ciągu co najmniej 15 minut przy 4 000 obrotach/min. Usunąć pływającą na wierzchu ciecz, która może zawierać nierozpuszczalny tłuszcz (w przypadku kremów). Tłuszcz ten nie powinien być zmieszany z tiolami, które zbierają się w zgęszczonej masie na dnie próbki.
Sprawdzić, czy nie wytrąca się żaden osad po dodaniu kilku kropel roztworu octanu kadmu (II) (5.2.2.4.) do warstwy powierzchniowej.
Jeśli wcześniej podczas identyfikowania nie stwierdzono żadnych czynników redukujących innych niż tiole, należy sprawdzić metodą jodometryczną, czy zawartość tiolu obecnego w warstwie powierzchniowej nie przekracza 6–8 % jego początkowej ilości.
Wprowadzić 10 ml metanolu (5.2.2.3.) do próbki wirówki zawierającej osad i starannie rozproszyć osad mieszając. Odwirować ponownie w ciągu co najmniej 15 minut przy 4 000 obrotach/min. Zlać ciecz pływającą na wierzchu i sprawdzić obecność/nieobecność tioli.
Przemywać osad po raz drugi, postępując w ten sam sposób.
Używając stale tę samą probówkę wirówki, dodać:
– 2 ml roztworu kaprylanu metylu (5.2.2.5.),
– 5 ml kwasu chlorowodorowego w metanolu (5.2.2.7.).
Całkowicie rozpuścić tiole (niewielka ilość nierozpuszczonej substancji może pozostać z domieszek). Jest to roztwór „S”.
Pobrać część tego roztworu, aby potwierdzić jodometrycznie, że zawartość tioli stanowi co najmniej 90 % zawartości otrzymanej w ppkt 5.1.
- 5.2.5. Metylowanie
Metylowanie prowadzone jest metodą *in situ* (5.2.5.1.) lub za pomocą wcześniej przygotowanego roztworu diazometanu (5.2.5.2.).
- 5.2.5.1. Metylowanie *in situ*
Do aparatu do metylowania (5.2.3.2.) zawierającego 1 ml eteru (5.2.2.11.) wprowadzić 50 µl roztworu „S” i metylować metodą (5.2.3.2.) z dodatkiem około 300 mg l-metylo-3-nitro-l-nitrozoguanidyny (5.2.2.8.). Po 15 minutach (roztwór eterowy powinien być żółty, co wskazuje na nadmiar diazometanu) przenieść próbkę roztworu do 2 ml butelki z hermetycznym korkiem. Umieścić w lodówce do następnego dnia. Metylować równocześnie dwie próbki.
- 5.2.5.2. Metylowanie przygotowanym wcześniej roztworem diazometanu
Do 5 ml kolby z korkiem wprowadzić 1 ml roztworu diazometanu (5.2.2.12.), następnie 50 µl roztworu „S”. Pozostawić w lodówce do następnego dnia.
- 5.2.6. Przygotowanie roztworu standardowego
Przygotować standardowy roztwór kwasu merkaptooctowego (5.2.2.1.) o znanym stężeniu zawierający około 60 mg czystego kwasu merkaptooctowego (5.2.2.1.) w 2 ml. Jest to roztwór „E”. Wytrącić osad, zanalizować i metylować tak, jak opisano w ppkt 5.2.4. i 5.2.5.

- 5.2.7. Warunki chromatografii gazowej
- 5.2.7.1. Kolumna:
Typ: stal nierdzewna.
Długość: 2 m.
Średnica: 3 mm.
- 5.2.7.2. Wypełnienie:
20 % ftalan didecylu/chromosorb WAW 80–100 oczek.
- 5.2.7.3. Detektor
Detektor płomieniowo-jonizacyjny. Odpowiednia czułość ustalona dla elektrometru detektora płomieniowo-jonizacyjnego wynosi 8×10^{-10} A.
- 5.2.7.4. Zasilanie gazami:
Gaz nośny: azot:
ciśnienie: 2,2 bara,
przepływ: 35 ml/min.
Gaz pomocniczy: wodór:
ciśnienie: 1,8 bara,
przepływ: 15 ml/min.
Zasilanie detektora: podane przez producenta aparatu.
- 5.2.7.5. Warunki temperaturowe
Dozownik: 200 °C
Detektor 200 °C
Kolumna: 90 °C.
- 5.2.7.6. Szybkość przesuwu papieru rejestratora
5 mm/min.
- 5.2.7.7. Wprowadzana ilość próbki
3 µl, wykonać 5 powtórzeń wprowadzania próbki.
- 5.2.7.8. Warunki chromatografii gazowej są podane orientacyjnie. Pozwalają one na uzyskanie rozdzielczości „R” równej lub wyższej od 1,5, gdzie:

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

w którym:

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).

Poleca się stosowanie programu wzrostu temperatury przez jej regulację w zakresie od 90–150 °C z szybkością 10 °C na minutę tak, aby wyeliminować substancje, które mogą przeszkadzać w kolejnych pomiarach.

5.2.8. Obliczenia

5.2.8.1. Współczynnik korekcyjny kwasu merkaptooctowego

Jest on obliczany w stosunku do kaprylanu metylu na podstawie mieszaniny standardowej.

Jeśli „t” oznacza kwas merkaptooctowy,
przyjęto:

k_t – jego współczynnik reakcji,

m'_t – jego masa (w miligramach) w mieszaninie,

S'_t – powierzchnia jego pików.

Jeśli „c” oznacza kaprylan metylu,

przyjęto:

m'_c – jego masa (w miligramach) w mieszaninie,

S'_c – powierzchnia jego pików,

zatem:

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

Współczynnik ten zmienia się zależnie od stosowanej aparatury.

5.2.8.2 Zawartość kwasu merkaptooctowego obecnego w próbce

Jeśli „t” oznacza kwas merkaptooctowy,

przyjęto:

k_t – jego współczynnik reakcji,

S_t – jego powierzchnia pików.

Jeśli „c” oznacza kaprylan metylu,

przyjęto:

m_c – masa kaprylanu metylu (w miligramach) w mieszaninie,

S_c – powierzchnia jego pików,

M – masa (w miligramach) początkowej próbki analitycznej,

zatem zawartość kwasu merkaptooctowego obecnego w próbce wynosi:

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

6. Powtarzalność (ISO 5725)

Dla zawartości kwasu merkaptooctowego 8 % (m/m) różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać absolutnej wartości 0,8 % (m/m).

Identyfikowanie i oznaczanie heksachlorofenu

A. Identyfikowanie

1. Cel i zakres stosowania
Metoda właściwa do badań wszystkich produktów kosmetycznych.
2. Zasada
Heksachlorofen w próbce wyrobu jest ekstrahowany octanem etylu i identyfikowany metodą chromatografii cienkowarstwowej.
3. Odczynniki
Wszystkie odczynniki powinny być czystości analitycznej.
 - 3.1. Kwas siarkowy, roztwór 4 M.
 - 3.2. Celit AW.
 - 3.3. Octan etylu.
 - 3.4. Rozpuszczalnik rozwijający: benzen zawierający 1 % (v/v) kwasu octowego lodowatego.
 - 3.5. Środek wywołujący I:
Roztwór rodamininy B: rozpuścić 100 mg rodamininy B w mieszaninie 150 ml eteru dietylowego, 70 ml absolutnego etanolu i 16 ml wody.
 - 3.6. Środek wywołujący II:
Roztwór 2,6-dibromo-4-(chloroimino)cykloheksa-2,5-dienonu: rozpuścić 400 mg 2,6-dibromo-4-(chloroimino)cykloheksa-2,5-dienonu w 100 ml metanolu (przygotować codziennie świeży roztwór).
Roztwór węgla sodu: rozpuścić 10 g węgla sodu w 100 ml demineralizowanej wody.

- 3.7. Roztwór odniesienia:
Heksachlorofen, 0,05 % (m/v), roztwór w octanie etylu.
4. Aparatura
- 4.1. Płytki z żelem krzemionkowym Kiesel gel 254 TLC, 200 x 200 mm (lub równoważne).
- 4.2. Zwyczajny sprzęt do chromatografii cienkowarstwowej.
- 4.3. Łaźnia termostатовana w 26 °C do utrzymywania komory chromatograficznej w stałej temperaturze.
5. Przygotowanie próbki do badań
- 5.1. Starannie wymieszać 1 g homogenizowanej próbki z 1 g Celit AW (3.2.) i 1 ml kwasu siarkowego (3.1.).
- 5.2. Suszyć w 100 °C przez dwie godziny.
- 5.3. Schłodzić i dokładnie sproszkować wysuszoną pozostałość.
- 5.4. Ekstrahować dwukrotnie 10 ml octanu etylu (3.3.) odwirowując po każdej ekstrakcji i połączyć warstwy octanu etylu.
- 5.5. Odparować w 60 °C.
- 5.6. Rozpuścić pozostałość w 2 ml octanu etylu (3.3.).
6. Procedura
- 6.1. Nanieść 2 µl roztworu próbki analitycznej (5.6.) i 2 µl roztworu odniesienia (3.7.) na płytkę do chromatografii cienkowarstwowej (4.1.).
- 6.2. Nasyścić komorę (4.3.) rozpuszczalnikiem rozwijającym (3.4.).
- 6.3. Umieścić płytkę chromatograficzną w komorze i rozwijać do wysokości 150 mm.
- 6.4. Wyjąć płytkę chromatograficzną i wysuszyć w wentylowanej suszarce w temperaturze około 105 °C.
- 6.5. Wywoływanie
Plamy heksachlorofenu na płycie cienkowarstwowej wywołuje się według opisu w ppkt 6.5.1. lub 6.5.2.
- 6.5.1. Spryskać płytkę równomiernie środkiem wywołującym I (3.5.). Po 30 minutach oceniać płytkę w świetle UV przy 254 nm.
- 6.5.2. Spryskać płytkę środkiem wywołującym II roztworem 2,6-dibromo-4-(chloroimino)cykloheksa-2,5-dienonu (3.6.). Następnie spryskać płytkę roztworem węgla sodu (3.6.). Oceniać płytkę w świetle dziennym po 10 minutach suszenia w temperaturze pokojowej.
7. Interpretacja
- 7.1. Środek wywołujący I (3.5.):
Heksachlorofen pojawia się jako niebieskawa plama na żółtopomarańczowym tle i ma współczynnik R_F w przybliżeniu 0,5.
- 7.2. Środek wywołujący II (3.6.):
Heksachlorofen pojawia się jako plama szafirowoturkusowa na białym tle i ma współczynnik R_F w przybliżeniu 0,5.

B. Oznaczenie

1. Cel i zakres stosowania
Metoda może być stosowana do badania wszystkich produktów kosmetycznych.
2. Definicja
Zawartość heksachlorofenu w próbce wyrobu oznaczona zgodnie z tą metodą jest wyrażona w procentach masowych heksachlorofenu.

3. **Zasada**
Heksachlorofen jest oznaczany po przeprowadzeniu w pochodną metylową metodą chromatografii gazowej z detektorem wychwytu elektronów.
4. **Odczynniki**
Wszystkie odczynniki powinny być czystości analitycznej.
 - 4.1. Octan etylu.
 - 4.2. N-metylo-N-nitrozo-4-toluenosulfonoamid (diazald).
 - 4.3. Eter dietylowy.
 - 4.4. Metanol.
 - 4.5. 2-(2-etoksyetoksy)etanol (karbitol).
 - 4.6. Kwas mrówkowy.
 - 4.7. Wodorotlenek potasu, 50 % (m/m) roztwór wodny (przygotowany świeżo każdego dnia).
 - 4.8. Heksan do spektroskopii.
 - 4.9. Bromochlorofen (substancja standardowa nr 1).
 - 4.10. 4,4',6,6'-tetrachloro-2,2'-tiodifenol (substancja standardowa nr 2).
 - 4.11. Eter 2,4,4'-trichloro-2-hydroksydifenyłowy (substancja standardowa nr 3).
 - 4.12. Aceton.
 - 4.13. 4 M kwas siarkowy.
 - 4.14. Celit AW.
 - 4.15. Roztwór kwasu mrówkowego/octanu etylu, 10 % (v/v).
 - 4.16. Heksachlorofen.
5. **Aparatura**
 - 5.1. Zwykły sprzęt laboratoryjny.
 - 5.2. Miniaparat do otrzymywania diazometanu (Analyt. Chem., 1973, 45, 2302-2).
 - 5.3. Chromatograf gazowy wyposażony w detektor wychwytu elektronów ze źródłem ^{63}Ni .
6. **Procedura**
 - 6.1. Przygotowanie roztworu standardowego
Wybiera się taką substancję standardową, która nie koliduje z żadnym składnikiem zawartym w analizowanym produkcie. Zwykle substancja standardowa nr 1 jest najodpowiedniejsza (4.9.).
 - 6.1.1. Odważyć dokładnie około 50 mg substancji standardowej nr 1, 2 lub 3 (4.9., 4.10. lub 4.11.) i 50 mg heksachlorofenu (4.16.) do 100 ml kolby miarowej. Uzupełnić objętość do kreski octanem etylu (4.1.) (roztwór A). Rozcieńczyć 10 ml roztworu A do 100 ml octanem etylu (4.1.) (roztwór B).
 - 6.1.2. Odważyć dokładnie około 50 mg substancji standardowej nr 1, 2 lub 3 (4.9., 4.10. lub 4.11.) do 100 ml kolby miarowej. Uzupełnić objętość do kreski octanem etylu (4.1.) (roztwór C).
 - 6.2. Przygotowanie próbki
Uwaga: Ze względu na szeroką gamę produktów kosmetycznych, w których może znajdować się heksachlorofen, ważną rzeczą jest sprawdzenie odzyskiwania heksachlorofenu z próbki według powyższej procedury przed zarejestrowaniem wyników. Jeśli odzyskiwane są niewielkie ilości, to modyfikacje takie jak zmiana rozpuszczalnika (benzen zamiast octanu etylu) itp. mogłyby być wprowadzone za zgodą zainteresowanych stron.
Odważyć dokładnie 1 g ujednocionej próbki i wymieszać starannie z 1 ml kwasu siarkowego (4.13.), 15 ml acetonu (4.12.) i 8 g Celitu AW (4.14.). Suszyć mieszaninę na powietrzu w ciągu 30 minut na łaźni parowej, następnie suszyć w ciągu półtorej godziny w suszarce z przepływem powietrza. Schłodzić, rozetrzeć

- pozostałość na proszek i nanieść na szklaną kolumnę. Eluować octanem etylu (4.1.) i zebrać 100 ml. Dodać 2 ml roztworu wewnętrznego standardu (roztwór C) (6.1.2.).
- 6.3. Metylowanie próbki
Schłodzić wszystkie odczynniki oraz aparaturę do temperatury między 0 a 4 °C na dwie godziny. W zewnętrznej komorze aparatury do diazometanu umieścić 1,2 ml roztworu otrzymanego w ppkt 6.2. i 0,1 ml metanolu (4.4.). W centralnym zbiorniku umieścić około 200 mg diazaldu (4.2.), dodać 1 ml karbitolu (4.5.) i 1 ml eteru dietylowego (4.3.) i rozpuścić. Złożyć aparaturę, w połowie zanurzyć aparaturę w łaźni o temperaturze 0 °C i wprowadzić strzykawką około 1 ml schłodzonego roztworu wodorotlenku potasu (4.7.) do centralnego zbiornika. Upewnić się, że żółty kolor powstały przy tworzeniu się diazometanu jest trwały. Jeśli żółty kolor nie jest trwały, należy powtórzyć metylowanie, dodając następną porcję 200 mg diazaldu (4.2.).
Uwaga: Trwałość żółtego koloru wskazuje na nadmiar diazometanu, który jest niezbędny do zapewnienia całkowitego zmetylowania próbki.
Aparaturę usuwa się z łaźni po 15 minutach i następnie pozostawia zamkniętą w temperaturze otoczenia przez 12 godzin. Otworzyć aparaturę, związać nadmiar diazometanu dodając kilka kropli 10 % (v/v) roztworu kwasu mrówkowego w octanie etylu (4.15.) i przenieść roztwór organiczny do 25 ml kolby miarowej. Uzpełnić objętość heksanem (4.8.) do kreski.
Wprowadzić strzykawką 1,5 µl tego roztworu do chromatografu.
- 6.4. Metylowanie próbki standardowej
Schłodzić wszystkie odczynniki oraz aparaturę do temperatury między 0 i 4 °C na dwie godziny. W zewnętrznej komorze aparatury do diazometanu umieścić:
0,2 ml roztworu B (6.1.1.),
1 ml octanu etylu (4.1.),
0,1 ml metanolu (4.4.).
Prowadzić metylowanie tak, jak opisano w ppkt 6.3. Wprowadzić strzykawką 1,5 µl otrzymanego roztworu do chromatografu.
7. Chromatografia gazowa
Kolumna musi zapewnić zdolność rozdzielczą „R” równą lub lepszą niż 1,5, gdzie:

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

w którym:

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).

Następujące warunki chromatografii gazowej uznano za odpowiednie:

Kolumna: stal nierdzewna.

Długość: 1,7 m.

Średnica: 3 mm.

Nośnik:

chromosorb: WAW

analiza sitowa: 80–120 oczek.

Faza stacjonarna: 10 % OV 17.

Temperatury:

kolumna: 280 °C,
dozownik: 280 °C,
detektor: 280 °C.

Gaz nośny: azot wolny od tlenu.

Ciśnienie: 2,3 bara.

Przepływ: 30 ml/min.

8. Obliczenie

8.1. Współczynnik reakcji heksachlorofenu

Jest on obliczany w odniesieniu do wybranej substancji standardowej w stosunku do standardowej mieszaniny.

Przyjęto:

h – heksachlorofen,
 k_h – jego współczynnik reakcji,
 m'_h – jego masa (w gramach) w mieszaninie,
 A'_h – powierzchnia jego piku,
 s – wybrana substancja standardowa,
 m'_s – jej masa (w gramach) w mieszaninie,
 A'_s – powierzchnia jej piku,
zatem:

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

8.2. Ilość heksachlorofenu w próbce

Przyjęto:

h – heksachlorofen,
 k_h – jego współczynnik reakcji,
 A_h – powierzchnia jego piku,
 s – wybrana substancja standardowa,
 m_s – jego masa (w gramach) w mieszaninie,
 A_s – powierzchnia jego piku,
 M – masa (w gramach) pobranej próbki,
zatem % (m/m) heksachlorofenu w próbce wynosi:

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

9. Powtarzalność (ISO 5725)

Dla zawartości heksachlorofenu 0,1 % (m/m) różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać absolutnej wartości 0,005 % (m/m).

Ilościowe oznaczanie soli sodowej N-chloro-4-toluenosulfonoamidu

1. **Cel i zakres stosowania**
Celem metody jest ilościowe oznaczanie za pomocą chromatografii cienkowarstwowej soli sodowej N-chloro-4-toluenosulfonoamidu (chloramina-T) w produktach kosmetycznych.
2. **Definicja**
Zawartość chloraminy-T w próbce wyrobu oznaczona zgodnie z tą metodą jest wyrażona w procentach masowych (m/m).
3. **Zasada**
Chloramina-T ulega całkowitej hydrolizie do 4-toluenosulfonoamidu przez ogrzewanie do wrzenia z kwasem chlorowodorowym.
Ilość powstałego 4-toluenosulfonoamidu jest oznaczana fotodensytometrycznie przez chromatografię cienkowarstwową.
4. **Odczynniki**
Wszystkie odczynniki powinny być czystości analitycznej.
 - 4.1. Sól sodowa N-chloro-4-toluenosulfonoamid (chloramina-T).
 - 4.2. Standardowy roztwór 4-toluenosulfonoamidu: 50 mg 4-toluenosulfonoamidu w 100 ml etanolu (4.5.).
 - 4.3. Kwas chlorowodorowy, 37 % (m/m), $d_4^{20} = 1,18$ g/ml.
 - 4.4. Eter dietylowy.
 - 4.5. Etanol, 96 % (v/v).
 - 4.6. Roztwór rozwijający
 - 4.6.1. 1-Butanol/etanol (4.5.)/woda (40:4:9, v/v/v) lub
 - 4.6.2. Chloroform/aceton (6:4, v/v).
 - 4.7. Przygotowane fabrycznie płytki do chromatografii cienkowarstwowej, żel krzemionkowy 60, bez wskaźnika fluorescencyjnego.
 - 4.8. Manganian (VII) potasu.
 - 4.9. Kwas chlorowodorowy, 15 % (m/m).
 - 4.10. Odczynnik wywołujący: 2-toluidyna, 1 % (m/v) roztwór etanolu (4.5.).
5. **Aparatura**
 - 5.1. Zwykła aparatura laboratoryjna.
 - 5.2. Zwykły sprzęt do chromatografii cienkowarstwowej.
 - 5.3. Fotodensytometr.
6. **Procedura**
 - 6.1. **Hydroliza**
Odważyć dokładnie w 50 ml okrągłodennej kolbie około 1 g próbki (m). Dodać 5 ml wody i 5 ml kwasu chlorowodorowego (4.3.) i ogrzewać do wrzenia przez jedną godzinę, stosując chłodnicę zwrotną. Bezzwłocznie przenieść gorącą suspensję z wodą do 50 ml kolby miarowej. Pozostawić do schłodzenia i uzupełnić do kreski wodą. Odwirowywać przy co najmniej 3 000 obrotów/min przez pięć minut i przefiltrować warstwę ciekłą.
 - 6.2. **Ekstrakcja**
 - 6.2.1. Pobrać 30 ml przesącza i ekstrahować trzykrotnie po 15 ml eteru dietylowego (4.4.). Jeśli to konieczne, wysuszyć warstwy eterowe i połączyć je w 50 ml kolbie miarowej. Uzupełnić eterem dietylowym (4.4.).
 - 6.2.2. Pobrać 25 ml wysuszonego ekstraktu eterowego i odparować do sucha w strumieniu azotu. Ponownie rozpuścić pozostałość w 1 ml etanolu (4.5.).

- 6.3. Chromatografia cienkowarstwowa
- 6.3.1. Nanieść 20 μl pozostałości etanolowej (6.2.) na płytkę do chromatografii cienkowarstwowej (4.7.).
W tym samym czasie i w ten sam sposób nanieść po 8, 12, 16 i 20 μl standardowego roztworu 4-toluenosulfonoamidu (4.2.).
- 6.3.2. Następnie rozwijać w przybliżeniu na wysokość 150 mm w roztworze rozwijającym (4.6.1. lub 4.6.2.).
- 6.3.3. Po całkowitym odparowaniu rozpuszczalnika rozwijającego, umieścić płytkę na dwie lub trzy minuty w atmosferze pary chloru, utworzonych przez nalanie około 100 ml kwasu chlorowodorowego (4.9.) na około 2 g manganianu (VII) potasu (4.8.) w zamkniętym naczyniu. Usunąć nadmiar chloru przez ogrzewanie płytki do 100° C w ciągu pięciu minut. Następnie spryskać płytkę odczynnikami wywołującym (4.10.).
- 6.4. Pomiar
Po około jednej godzinie zmierzyć fioletowe plamy za pomocą fotodensytometru przy 525 nm.
- 6.5. Wykreślanie krzywych wzorcowych
Wykreślić maksymalne wartości wysokości pików ustalone dla czterech plam 4-toluenosulfonoamidu w porównaniu z odpowiednimi ilościami 4-toluenosulfonoamidu (to jest 4, 6, 8, 10 μg 4-toluenosulfonoamidu na plamę).
7. Uwaga
Metodę można sprawdzić, stosując roztwór 0,1 do 0,2 % (m/v) chloraminy-T poddany takiemu samemu postępowaniu jak próbka (6.).
8. Obliczenie
Zawartość chloraminy-T w próbce wyrażona w procentach masowych jest obliczona następująco:
- $$\% \text{ (m/m) soli sodowej N-chloro-4-toluenosulfonoamidu} = \frac{1,33 \times a}{60 \times m}$$
- gdzie:
- 1,33 – współczynnik konwersji (przemiany) 4-toluenosulfonoamidu (chloraminy-T),
a – ilość (w μg) 4-toluenosulfonoamidu w próbce odczytana z krzywej wzorcowej,
m – masa (w gramach) pobranej próbki.
9. Powtarzalność (ISO 5725)
Dla zawartości chloraminy-T około 0,2 % (m/m) różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać absolutnej wartości 0,03 % (m/m).

Oznaczanie całkowitego fluoru w pastach do zębów

1. Cel i zakres stosowania
Metoda jest przeznaczona do oznaczania całkowitej zawartości fluoru w pastach do zębów. Jest ona odpowiednia dla stężeń nieprzekraczających 0,25 %.
2. Definicja
Zawartość fluoru w próbce pasty oznaczona zgodnie z tą metodą jest wyrażona w procentach masowych.
3. Zasada
Oznaczenie jest wykonywane metodą chromatografii gazowej. Fluor ze związków zawierających fluor zostaje przekształcony w trietylofluorosilan (TEFS) w bezpośredniej reakcji z chlorotrietylosilanem (TECS) w kwaśnym roztworze i równocześnie ekstrahowany ksylenem zawierającym cykloheksan jako wzorzec wewnętrzny.

4. Odczynniki
Wszystkie odczynniki powinny być czystości analitycznej.
- 4.1. Fluorek sodu wysuszony w temperaturze 120 °C do stałej masy.
- 4.2. Woda redestylowana lub równoważnej jakości.
- 4.3. Kwas chlorowodorowy, $d_4^{20} = 1,19$ g/ml.
- 4.4. Cykloheksan.
- 4.5. Ksylen, który nie daje żadnych pików przed pikiem tego rozpuszczalnika wówczas, kiedy jest analizowany chromatograficznie w tych samych warunkach co próbka (6.1.). Jeśli niezbędne, jest oczyszczany przez destylację (5.8.).
- 4.6. Chlorotrietylosilan (TECS Merck lub równoważny).
- 4.7. Roztwory standardowe fluoru
- 4.7.1. Roztwór bazowy, 0,250 mg F/ml. Odważyć dokładnie 138,1 mg fluorku sodu (4.1.) i rozpuścić w wodzie (4.2.). Przenieść ilościowo roztwór do 250 ml kolby miarowej (5.5.). Rozcieńczyć do kreski wodą (4.2.) i wymieszać.
- 4.7.2. Rozcieńczony roztwór bazowy 0,050 mg F/ml. Przenieść pipetą 20 ml roztworu bazowego (4.7.1.) do 100 ml kolby miarowej (5.5.). Rozcieńczyć do kreski wodą i wymieszać.
- 4.8. Roztwór wzorca wewnętrznego
Zmieszać 1 ml cykloheksanu (4.4.) i 5 ml ksylenu (4.5.).
- 4.9. Chlorotrietylosilan/roztwór wzorca wewnętrznego
Przenieść pipetą (5.7.) 0,6 ml chlorotrietylosilanu (4.6.) i 0,12 ml roztworu wzorca wewnętrznego (4.8.) do 10 ml kolby miarowej. Rozcieńczyć ksylenem (4.5.) do kreski i wymieszać. Przygotować świeżo tego samego dnia.
- 4.10. Kwas nadchlorowy, 70 % (m/v).
- 4.11. Kwas nadchlorowy, 20 % (m/v) w wodzie (4.2.).
5. Aparatura
- 5.1. Zwykły sprzęt laboratoryjny.
- 5.2. Chromatograf gazowy wyposażony w detektor płomieniowo-jonizacyjny.
- 5.3. Obrotowy mikser Vortex lub równoważny.
- 5.4. Wyrząsarka Buhler, typ SMB 1 lub równoważna.
- 5.5. Kolby miarowe, 100 i 250 ml, wykonane z polipropylenu.
- 5.6. Probówki wirówkowe (szklane); 20 ml z korkiem gwintowanym pokrytym teflonem, Sovirel typ 611-56 lub równoważne. Probówki i korki gwintowane czyścić przez ługowanie w ciągu kilkunastu godzin w kwasie nadchlorowym (4.11.) i następnie pięciokrotne kolejne płukanie wodą (4.2.) i końcowe suszenie w 100 °C.
- 5.7. Pipety, odpowiednie do odmierzenia objętości 50–200 µl z jednorazowymi plastikowymi zakończeniami.
- 5.8. Aparatura do destylacji, wyposażona w kolumnę Schneidera z trzema kulami lub równoważną kolumnę Vigreux.
6. Procedura
- 6.1. Analiza próbki
- 6.1.1. Wybrać tubę pasty do zębów uprzednio nieotwieraną, obciąć dolną część tuby i przenieść całą zawartość do plastikowego pojemnika, wymieszać starannie i przechowywać w warunkach zapobiegających pogorszeniu jakości.
- 6.1.2. Odważyć dokładnie 150 mg (m) próbki do probówki wirówkowej (5.6.), dodać 5 ml wody (4.2.) i homogenizować (5.3.).
- 6.1.3. Dodać 1 ml ksylenu (4.5.).

- 6.1.4. Dodawać kroplami 5 ml kwasu chlorowodorowego (4.3.) i homogenizować (5.3.).
- 6.1.5. Dodać pipetą 0,5 ml roztworu chlorotrietylosilan/wzorzec wewnętrzny (4.9.) do probówki wirówkowej (5.6.).
- 6.1.6. Zamknąć probówkę gwintowanym korkiem (5.6.) i mieszać dokładnie w ciągu 45 minut na wytrząsarce (5.4.) ustawionej na 150 wstrząsów na minutę.
- 6.1.7. Wirować 10 minut z taką szybkością, aby otrzymać wyraźny rozdział warstw, otworzyć probówkę, odciągnąć warstwę organiczną i wprowadzić strzykawką 3 μ l warstwy organicznej na kolumnę chromatografu gazowego (5.2.).
- Uwaga:*
Eluowanie wszystkich składników zabiera około 20 minut.
- 6.1.8. Powtórzyć analizę, obliczyć stosunki średnich powierzchni pików (Atefs/Ach) i odczytać odpowiednie ilości fluoru (w miligramach m_1) z krzywej wzorcowej (6.3.).
- 6.1.9. Obliczyć całkowitą zawartość fluoru w próbce (w procentach masowych fluoru), jak wskazano w ust. 7.
- 6.2. Warunki analizy chromatograficznej
- 6.2.1. Kolumna: stal nierdzewna.
Długość: 1,8 m.
Średnica: 3 mm.
Nośnik: Gaschrom Q 80–100 oczek.
Faza stacjonarna: olej silikonowy DC 200 lub równoważny, 20 %, kondycjonowanie kolumny przez noc w 100 °C (gaz nośny azot, przepływ 25 ml na minutę) i powtarzane każdej nocy. Po każdym czterech lub pięciu wstrzyknięciach ponownie kondycjonować kolumnę przez ogrzewanie w temperaturze 100 °C w ciągu 30 minut.
Temperatury:
kolumna: 70 °C,
dozownik: 150 °C,
detektor: 250 °C.
Przepływ gazu nośnego: 35 ml azotu na minutę.
- 6.3. Krzywa wzorcowa
- 6.3.1. Umieścić pipetą w serii sześciu probówek wirówki (5.6.) po 0, 1, 2, 3, 4 i 5 ml rozcieńczonego standardowego roztworu fluoru (4.7.2.). Uzupelnąć objętość w każdej probówce wodą do 5 ml (4.2.).
- 6.3.2. Postępować tak, jak opisano w ppkt 6.1.3.–6.1.6. włącznie.
- 6.3.3. Wprowadzić strzykawką 3 μ l warstwy organicznej na kolumnę chromatografu gazowego (5.2.).
- 6.3.4. Powtórzyć wstrzyknięcie i obliczyć średni stosunek pików (Atefs/Ach).
- 6.3.5. Narysować krzywą wzorcową współzależności masy fluoru (w miligramach) w roztworach standardowych (6.3.1.) i stosunku powierzchni pików (Atefs/Ach) mierzonych według ppkt 6.3.4. Połączyć punkty wykresu najbardziej odpowiednią linią prostą obliczoną równaniem regresji.
7. Obliczenie
Stężenie całkowitej zawartości fluoru w próbce (w procentach masowych fluoru) (% m/m F) jest określone równaniem:

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

gdzie:

m – próbka analityczna (w miligramach) (6.1.2.),

m_1 – ilość F (w miligramach) odczytana z krzywej wzorcowej (6.1.8.).

8. Powtarzalność (ISO 5725)
Dla zawartości fluoru około 0,15 % (m/m) różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać 0,012 % (m/m).

Identyfikowanie i oznaczanie organicznych związków rtęci

Cel i zakres stosowania

Metoda może być stosowana do identyfikowania i oznaczania organicznych pochodnych rtęci stosowanych jako środki konserwujące w produktach kosmetycznych używanych w okolicach oczu. Mogą być stosowane do tiomersalu (INN) i fenylortęci i jej soli.

A. Identyfikowanie

1. **Zasada**
Organiczne związki rtęci są kompleksowane 1,5-difenylo-3-tiokarbazonem (ditizonem). Po ekstrakcji ditizonu tetrachlorkiem węgla, wykonywana jest chromatografia cienkowarstwowa na żelu krzemionkowym. Plamy ditizonu pojawiają się w pomarańczowym kolorze.
2. **Odczynniki**
Wszystkie odczynniki powinny być czystości analitycznej.
 - 2.1. Kwas siarkowy, 25 % (v/v).
 - 2.2. 1,5-difenylo-3-tiokarbazon (ditizon): 0,8 mg w 100 ml tetrachlorku węgla (2.4.).
 - 2.3. Azot.
 - 2.4. Tetrachlorek węgla.
 - 2.5. Rozpuszczalnik rozwijający: heksan/aceton, 90: 10 (v/v).
 - 2.6. Roztwór standardowy, 0,001 % w wodzie:
2-(etylortęciotio)benzoesan sodu,
chlorek etylortęci lub chlorek metylortęci,
azotan fenylortęci lub octan fenylortęci,
chlorek rtęci (II) lub octan rtęci (II).
 - 2.7. Przygotowane fabrycznie płytki z żelem krzemionkowym (np. Merck 5721 lub równoważne).
 - 2.8. Chlorek sodu.
3. **Aparatura**
 - 3.1. Zwykły sprzęt laboratoryjny.
 - 3.2. Zwykła aparatura do chromatografii cienkowarstwowej.
 - 3.3. Filtr rozdzielający fazy.
4. **Procedura**
 - 4.1. **Ekstrakcja**
 - 4.1.1. Rozcieńczyć 1 g próbki w probówce wirówki przez dodawanie 20 ml wody destylowanej. Otrzymać jak największe rozproszenie i ogrzewać do 60 °C w łaźni wodnej. Dodać 4 g chlorku sodu (2.8.). Wytrząsnąć. Pozostawić do schłodzenia.
 - 4.1.2. Wirować w ciągu co najmniej 20 minut przy 4 500 obrotach/min w celu oddzielenia większej części substancji stałej z cieczy. Przesączyć do rozdzielacza i dodać 0,25 ml roztworu kwasu siarkowego (2.1.).
 - 4.1.3. Ekstrahować kilkakrotnie po 2 lub 3 ml roztworu ditizonu (2.2.) do zaniku zielonego koloru ostatniej warstwy organicznej.

- 4.1.4. Przesączyć każdą warstwę organiczną przez filtr rozdzielający fazy (3.3.).
- 4.1.5. Odparować do sucha w strumieniu azotu (2.3.).
- 4.1.6. Rozpuścić w 0,5 ml tetrachlorku węgla (2.4.). Używać roztworu natychmiast do analizy, jak wskazano w ppkt 4.2.1.
- 4.2. Rozdzielanie i identyfikowanie
- 4.2.1. Nanieść niezwłocznie 50 µl roztworu w tetrachlorku węgla otrzymanego jak w ppkt 4.1.6. na płytkę z żelazem krzemionkowym (2.7.). Równolegle poddać 10 ml roztworu standardowego (2.6.) takiemu postępowaniu, jak opisano w ppkt 4.1., i nanieść 50 µl otrzymanego w ppkt 4.1.6. roztworu na tę samą płytkę.
- 4.2.2. Umieścić płytkę w rozpuszczalniku (2.5.) do momentu, gdy czoło rozpuszczalnika osiągnie wysokość 150 mm. Związki organiczne rtęci pojawiają się jako kolorowe plamy, których kolor jest trwały; zabezpieczyć płytkę chromatograficzną szklaną płytką bezpośrednio po odparowaniu rozpuszczalnika.
Przykładowo otrzymano następujące wartości R_F :

	R_F	Kolor
Tiomersal	0,33	pomarańczowy
Chlorek etylortęci	0,29	pomarańczowy
Chlorek metylortęci	0,29	pomarańczowy
Sole fenylortęci	0,21	pomarańczowy
Sole rtęci	0,10	pomarańczowy
Octan rtęci	0,10	pomarańczowy
1,5-difenylo-3-tiokarbazon	0,09	różowy

B. Oznaczenie

1. Definicja
Zawartość organicznych związków rtęci oznaczona według tej metody jest wyrażona jako procent masowy (m/m) rtęci w próbce.
2. Zasada
Metoda polega na zmierzeniu ilości całej obecnej w próbce rtęci. Konieczne jest więc upewnienie się, że w próbce nie ma rtęci w postaci nieorganicznej, i identyfikowanie organicznych pochodnych rtęci zawartych w próbce wyrobu. Po mineralizacji uwolniona rtęć jest oznaczana przez bezpłomieniową absorpcję atomową.
3. Odczynniki
Wszystkie odczynniki powinny być czystości analitycznej.
 - 3.1. Stężony kwas azotowy, $d_4^{20} = 1,41$ g/ml.
 - 3.2. Stężony kwas siarkowy, $d_4^{20} = 1,84$ g/ml.
 - 3.3. Woda redestylowana.
 - 3.4. Manganian (VII) potasu, 7 % (m/v) roztwór.
 - 3.5. Chlorowodorek hydroksyloamoniowy, 1,5 % (m/v) roztwór.
 - 3.6. Nadsiarczan potasu, 5 % (m/v) roztwór.

- 3.7. Chlorek cyny (II) (chlorek cynawy), 10 % (m/v) roztwór.
- 3.8. Stężony kwas chlorowodorowy, $d_4^{20} = 1,18$ g/ml.
- 3.9. Wata szklana impregnowana chlorkiem palladu (II) (chlorkiem palladowym), 1 % (m/m).
4. Aparatura
- 4.1. Zwykły sprzęt laboratoryjny.
- 4.2. Aparatura do oznaczania rtęci metodą bezpłomieniowej absorpcji atomowej (technika zimnej pary), włącznie z niezbędnym sprzętem szklanym. Droga optyczna kuwety powinna wynosić co najmniej 100 mm.
5. Procedura
- Przedsięwziąć zwykłe środki ostrożności przy śladowej analizie rtęci.
- 5.1. Rozkład próbki
- 5.1.1. Odważyć dokładnie 150 mg próbki (m). Dodać 10 ml kwasu azotowego (3.1.) i pozostawić próbkę jego działaniu na trzy godziny w kolbie hermetycznej w łaźni wodnej o temperaturze 55° C, wstrząsając w regularnych odstępach czasu. W tym samym czasie wykonać ślełą próbę z samymi odczynnikami.
- 5.1.2. Po schłodzeniu dodać 10 ml kwasu siarkowego (3.2.) i ponownie umieścić w łaźni wodnej w 55 °C na okres 30 minut.
- 5.1.3. Umieścić kolbę w łaźni lodowej i dodać ostrożnie 20 ml wody (3.3.).
- 5.1.4. Dodawać porcjami po 2 ml 7 % roztwór manganianu (VII) potasu aż do odbarwienia roztworu. Ponownie umieścić w łaźni wodnej w 55 °C na następne 15 minut.
- 5.1.5. Dodać 4 ml roztworu nadsiarezanu (VI) potasu (3.6.). Kontynuować ogrzewanie w łaźni wodnej o temperaturze 55 °C przez 30 minut.
- 5.1.6. Pozostawić do schłodzenia i przenieść zawartość kolby do 100 ml kolby miarowej. Przemyć kolbę 5 ml chlorowodoru hydroksyloamoniowego (3.5.) i następnie przemywać czterokrotnie porcjami po 10 ml wody (3.3.). Roztwór powinien być zupełnie bezbarwny. Uzupełnić wodą (3.3.) do kreski.
- 5.2. Oznaczanie
- 5.2.1. Umieścić 10 ml badanego roztworu (5.1.6.) w szklanym naczyniu aparatury do oznaczania rtęci techniką zimnej pary (4.2.). Rozpuścić w 100 ml wody (3.3.), a następnie dodać 5 ml kwasu siarkowego (VT) (3.2.) i 5 ml roztworu chlorku cyny (II) (3.7.). Wymieszać po każdym dodaniu. Poczekać 30 sekund do zredukowania w całości jonów rtęci do stanu metalicznego i odczytać wartość (n).
- 5.2.2. Umieścić watę szklaną impregnowaną chlorkiem palladu (II) między naczyniem do redukcji rtęci i naczynkiem przepływowym aparatury (4.2.). Powtórzyć postępowanie według ppkt 5.2.1. i zarejestrować odczyt. Jeśli różni się on od zera, oznacza to, że mineralizacja nie zaszła całkowicie i analizę należy powtórzyć.
6. Obliczenie
- Przyjęto:
- m – masa (w miligramach) próbki analitycznej,
- n – ilość rtęci (w µg) odczytana na skali instrumentu.
- Ilość rtęci wyrażona jako procent masowy rtęci jest obliczana zgodnie z wzorem:
- $$\% \text{ m/m rtęci} = \frac{n}{m}$$
7. Uwagi
- 7.1. Dla poprawienia mineralizacji może być konieczne rozpoczęcie postępowania od rozcieńczenia roztworu.

- 7.2. Jeśli spodziewana jest absorpcja rtęci przez substrat, ilościowe oznaczenie powinno być wykonane metodą dodawania standardu.
8. Powtarzalność (ISO 5725)
W przypadku stężenia rtęci 0,007 % różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekroczyć wartości absolutnej 0,00035 %.

Oznaczanie siarczków metali alkalicznych i ziem alkalicznych

1. Cel i zakres stosowania
Metoda opisuje oznaczanie siarczków obecnych w produktach kosmetycznych. Obecność tioli lub innych środków redukujących (łącznie z siarczynami) (IV) nie przeszkadza w oznaczeniu.
2. Definicja
Stężenie siarczków oznaczone tą metodą jest wyrażone jako procent masowy siarki.
3. Zasada
Po zakwaszeniu środowiska, siarkowodor jest unoszony przez strumień azotu i wiązany w postaci siarczku kadmowego. Ten ostatni jest odsączony i przemyty, a następnie oznaczony jodometrycznie.
4. Odczynniki
Wszystkie odczynniki powinny być czystości analitycznej.
 - 4.1. Stężony kwas chlorowodorowy, $d_4^{20} = 1,19$ g/ml.
 - 4.2. Tiosiarczan sodu, 0,1 M roztwór standardowy.
 - 4.3. Jod, 0,05 M roztwór standardowy.
 - 4.4. Siarczek sodu.
 - 4.5. Octan kadmu (II).
 - 4.6. Stężony amoniak, $d_4^{20} = 0,90$ g/ml.
 - 4.7. Amoniakalny roztwór octanu kadmu (II): rozpuścić 10 g octanu kadmu (II) (4.5.) w około 50 ml wody. Dodać amoniak (4.6.) aż do ponownego rozpuszczenia osadu (średnio około 20 ml). Uzupełnić wodą do kreski 100 ml.
 - 4.8. Azot.
 - 4.9. Roztwór amoniaku M.
5. Aparatura
 - 5.1. Zwykły sprzęt laboratoryjny.
 - 5.2. 100 ml kolba okrągłodenka z trzema szyjami ze szlifem.
 - 5.3. Dwie 150 ml kolby stożkowe ze szlifem, wyposażone w urządzenia obejmujące rurkę zanurzeniową i boczną rurkę wylotową do wypuszczenia powstającego gazu.
 - 5.4. Lejek ilościowy.
6. Procedura
 - 6.1. Wprowadzenie siarczków
 - 6.1.1. Pobrać opakowanie, którego poprzednio nie otwierano. Odważyć dokładnie w kolbie okrągłodennej (5.2.) masę (m) (wyrażoną w gramach) wyrobu odpowiadającą nie więcej niż 30 mg jonów siarczkowych. Dodać 60 ml wody i dwie krople cieczy przeciwdziałającej pienieniu.

- 6.1.2. Przenieść po 50 ml roztworu (4.7.) do każdej z dwóch kolb stożkowych (5.3.).
- 6.1.3. Umieścić wkraplacz, rurkę zanurzeniową i rurkę wylotową w kolbie okrągłodennej (5.2.). Przyłączyć rurkę wylotową do serii kolb stożkowych (5.3.) przewodami z PCV.
Uwaga: Aparatura wprowadzająca powinna przejść następujący test szczelności. Symulując warunki testu, zastąpić próbkę wyrobu przeznaczoną do wykonania oznaczenia przez 10 ml roztworu siarczku (przygotowanego jak z 4.4.) zawierającego „X mg” siarczku (oznaczonego jodometrycznie). Przyjęto „Y” jako liczbę miligramów siarczku stwierdzoną w końcu tej operacji. Różnica między ilością „X” i ilością „Y” nie powinna przekroczyć 3 %.
- 6.1.4. Przepuszczać azot (4.8.) przez 15 minut, z szybkością dwóch pęcherzyków gazowych na sekundę, w celu usunięcia powietrza zawartego w kolbie okrągłodennej (5.2.).
- 6.1.5. Ogrzewać kolbę okrągłodenną do 85 ± 5 °C.
- 6.1.6. Zatrzymać strumień azotu (4.8.) i dodać 40 ml kwasu chlorowodorowego (4.1.), kropla po kropli.
- 6.1.7. Kiedy prawie cały kwas został wkroplony, wprowadzić ponownie strumień azotu (4.8.); aby zapobiec wyciekowi siarkowodoru, należy pozostawić minimalną warstwę ciekłą (uszczelnienie).
- 6.1.8. Przerwać ogrzewanie po 30 minutach. Pozostawić kolbę (5.2.) do schłodzenia i kontynuować przepływ azotu (4.8.) przez co najmniej półtorej godziny.
- 6.2. Miareczkowanie
- 6.2.1. Przesączyć siareczek kadmu przez lejek z długą nóżką (5.4.).
- 6.2.2. Popłukać kolby stożkowe (5.3.) najpierw roztworem amoniaku (4.9.) i przelać go przez lejek. Następnie popłukać wodą destylowaną i użyć wodę do przemycia osadu zatrzymanego przez filtr.
- 6.2.3. Przemyć osad 100 ml wody.
- 6.2.4. Umieścić bibułę filtracyjną z lejka zawierającą osad w pierwszej kolbie stożkowej. Dodać 25 ml (n_1) roztworu jodu (4.3.), około 20 ml kwasu chlorowodorowego (4.1.) i 50 ml wody destylowanej.
- 6.2.5. Oznaczyć nadmiar jodu roztworem tiosiarcznanu sodu (n_2) (4.2.).
7. Obliczenie
Zawartość siarczku w próbce, wyrażona jako procent masowy siarki, jest obliczana według następującego wzoru:

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

gdzie:

- n_1 – ilość (w mililitrach) zużytego standardowego roztworu jodu (4.3.),
 x_1 – stężenie molowe tego roztworu,
 n_2 – ilość (w mililitrach) standardowego roztworu tiosiarcznanu (VI) sodu (4.2.),
 x_2 – stężenie molowe tego roztworu,
 m – masa (w gramach) próbki analitycznej.

8. Powtarzalność (ISO 5725)

Dla zawartości siarczku około 2 % (m/m) różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekroczyć wartości absolutnej 0,2 % (m/m).

Identyfikowanie i oznaczanie 1-(4-aminobenzoesanu) glicerolu

A. Identyfikowanie

1. Przedmiot i zakres zastosowania
Metodę stosuje się do wykrywania 1-(4-aminobenzoesanu) glicerolu (INCI: GLYCERYLPABA). Można tą metodą wykrywać również 4-aminobenzoesan etylu (INN: BENZOCAINE), który może występować jako zanieczyszczenie.
2. Zasada
Identyfikowanie przeprowadza się metodą chromatografii cienkowarstwowej na żelu krzemionkowym ze wskaźnikiem fluorescencyjnym i wykrywanie wolnej pierwszorzędowej grupy aminowej poprzez pojawienie się plamy barwnika dwufazowego na płytce.
3. Odczynniki
Wszystkie odczynniki powinny być czystości analitycznej.
 - 3.1. Mieszanina rozpuszczalników: cykloheksan/propan-2-ol/stabilizowany dichlorometan (48:64:9 obj.).
 - 3.2. Rozpuszczalnik rozwijający: eter naftowy (40-60)/benzen/aceton/roztwór wodorotlenku amonu (co najmniej 25 % NH₃,) (35:35:35: 1 obj.).
 - 3.3. Roztwór wywołujący: a) azotan (III) sodu: 1g w 100 ml i 1 M kwasu chlorowodorowego (przygotowany bezpośrednio przed użyciem),
b) 2-naftol: 0,2 g w 100 ml 1 M wodorotlenku potasu.
 - 3.4. Roztwory standardowe:
1-(4-aminobenzoesan)glicerolu: 0,05 g w 100 ml mieszaniny rozpuszczalników (3.1.),
4-aminobenzoesan etylu: 0,05 g w 100 ml mieszaniny rozpuszczalników (3.1.).
 - 3.5. Płytki z żelem krzemionkowym 60 F254, grubość 0,25 mm, 200 × 200 mm.
4. Aparatura
 - 4.1. Zwykła aparatura do chromatografii cienkowarstwowej.
 - 4.2. Wstrząsarka ultradźwiękowa.
 - 4.3. Filtr z wkładem mikroporowatym FH 0,5 μm lub równoważny.
5. Procedura
 - 5.1. Przygotowanie próbek
W 10 ml kolbie miarowej z korkiem zważyć 1,5 g analizowanego wyrobu. Uzupełnić rozpuszczalnikiem (3.1.) do kreski. Zamknąć i pozostawić na okres jednej godziny w temperaturze pokojowej we wstrząsarce ultradźwiękowej (4.2.). Przesączyć przez filtr Milipore (4.3.) i używać filtratu do analizy chromatograficznej.
 - 5.2. Chromatografia cienkowarstwowa
Nanieść po 10 μl roztworu próbki (5.1.) i wszystkich roztworów standardowych (3.4.) na płytkę (3.5.).

Rozwijać chromatogram do wysokości 150 mm w komorze uprzednio wysycanej rozpuszczalnikiem (3.2.). Pozostawić płytkę do wysuszenia w temperaturze otoczenia.

5.3. Rozwijanie

5.3.1. Obserwować płytkę w świetle UV przy długości fali 254 nm.

5.3.2. Spryskać całkowicie wysuszoną płytkę roztworem 3.3 a).

Pozostawić do wysuszenia w temperaturze otoczenia w ciągu 1 minuty i niezwłocznie spryskać roztworem 3.3 b).

Wysuszyć płytkę w suszarce w temperaturze 60 °C. Plamy aminobenzoesanów pojawiają się w kolorze pomarańczowym. Wartości R_F : 1-(4-aminobenzoesan) glicerolu $R_F = 0,07$; 4-aminobenzoesan etylu $R_F = 0,55$.

B. Oznaczenie

1. Przedmiot i zakres

W tej metodzie oznacza się 1-(4-aminobenzoesan) glicerolu. Może ona również być stosowana do oznaczania 4-aminobenzoesanu etylu. Nie można oznaczyć większego stężenia niż 5 % masowych 1-(4-aminobenzoesanu) glicerolu i 1 % masowy 4-aminobenzoesanu etylu.

2. Definicja

Zawartości 1-(4-aminobenzoesan) glicerolu i 4-aminobenzoesanu etylu oznaczane tą metodą są wyrażane w procentach masowych (% m/m) wyrobu.

3. Zasada

Analizowany wyrób jest rozpraszany w metanolu i po odpowiedniej obróbce próbki oznaczenie prowadzone jest metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).

4. Odczynniki

Wszystkie odczynniki powinny być czystości analitycznej, a tam gdzie to konieczne odpowiadać HPLC.

4.1. Metanol.

4.2. Diwodoroortofosforan (V) potasu (KH_2PO_4).

4.3. Dihydrat octanu cynku (II) ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$).

4.4. Kwas octowy ($d_4^{20} = 1,05$).

4.5. Trihydrat heksacyjanożelazianu (II) (żelazoocyjanku) tetrapotasu ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$).

4.6. 4-hydroksybenzoesan etylu.

4.7. 1-(4-aminobenzoesan)glicerolu.

4.8. 4-aminobenzoesan etylu.

4.9. Roztwór buforu fosforanowego (0,02 M): rozpuścić 2,72 g diwodoroortofosforanu (V) potasu (4.2.) w jednym litrze wody.

- 4.10. Roztwór wymywający: roztwór buforu fosforanowego (4.9.)/metanol (4.1.) (61:39 obj.).

Skład fazy ruchomej można zmieniać w celu uzyskania współczynnika rozdziału $R > 1,5$ o wzorze:

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

w którym:

R_1 i R_2 czasy retencji pików, w minutach,

W_1 i W_2 szerokość pików w połowie wysokości, w milimetrach,

d' szybkość przesuwu papieru, w milimetrach na minutę.

- 4.11. Bazowy roztwór 1-(4-aminobenzoesanu) glicerolu: zważyć dokładnie około 40 mg 1-(4-aminobenzoesanu) glicerolu i umieścić w 100 ml kolbie miarowej. Rozpuścić w 40 ml metanolu (4.1.). Uzupełnić do kreski roztworem buforowym (4.9.) i wymieszać.
- 4.12. Bazowy roztwór 4-aminobenzoesanu etylu: zważyć dokładnie około 40 mg 4-aminobenzoesanu etylu i umieścić w 100 ml kolbie miarowej, rozpuścić w 40 ml metanolu (4.1.), uzupełnić do kreski roztworem buforowym i wymieszać.
- 4.13. Roztwór wzorca wewnętrznego: zważyć dokładnie około 50 mg 4-hydroksybenzoesanu etylu (4.6.), przenieść do 100 ml kolby miarowej, rozpuścić w 40 ml metanolu (4.1.), uzupełnić do kreski roztworem buforowym (4.9.) i wymieszać.
- 4.14. Roztwory standardowe: przygotować cztery roztwory standardowe przez rozpuszczenie w 100 ml eluentu (4.10.) odpowiednich związków zgodnie z następującą tabelą:

Roztwór standardowy	1-(4-amino-benzoesan) glicerolu		4-aminobenzoesan etylu		4-hydroksy-benzoesan etylu	
	($\mu\text{g/ml}$) [*]	ml (4.11.)	($\mu\text{g/ml}$) [*]	ml (4.12.)	($\mu\text{g/ml}$) [*]	ml (4.13.)
I	8	2	8	2	50	10
II	16	4	12	3	50	10
III	24	6	16	4	50	10

* Powyższe wartości wskazano jako orientacyjne, a odpowiadają one dokładnie masom podanym w pkt 4.11., 4.12. i 4.13.

Uwaga: Roztwory te mogą być przygotowywane różnymi sposobami.

- 4.15. I roztwór Carreza: rozpuścić 26,5 g heksacyjanożelazianu (II) tetrapotasu (4.5.) w wodzie i uzupełnić do 250 ml.
- 4.16. II roztwór Carreza: rozpuścić 54,9 octanu cynku (II) (4.3.) i 7,5 ml kwasu octowego (4.4.) w wodzie i uzupełnić do 250 ml.
- 4.17. Wypełnienie Merck Lichrosorb RP-18 lub równoważne o średnim rozmiarze cząstek 5 μm .

5. Aparatura
 - 5.1. Zwykłe wyposażenie laboratoryjne.
 - 5.2. Wyposażenie do wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem UV ze zmienną długością fali i zestaw komór termostatowany w 45 °C.
 - 5.3. Kolumna ze stali nierdzewnej, długość: 250 mm, średnica wewnętrzna: 4,6 mm; wypełnienie: Lichrosorb RP-18 (4.17.).
 - 5.4. Łaźnia ultradźwiękowa.
6. Procedura
 - 6.1. Przygotowanie próbki
 - 6.1.1. W 100 ml zlewce zważyć dokładnie około 1 g próbki i dodać 10 ml metanolu (4.1.).
 - 6.1.2. Umieścić zlewkę w łaźni ultradźwiękowej (5.4.) na 20 minut w celu otrzymania suspensji. Przenieść ilościowo otrzymaną suspensję do 100 ml kolby miarowej, w której znajduje się nie więcej niż 75 ml roztworu wymywającego (4.10.).

Dodać kolejno po 1 ml roztworu Carreza (4.15. i 4.16.) i wymieszać po każdym dodaniu. Uzupelnąć do kreski eluentem (4.10.), ponownie wymieszać i przesączyć przez karbowany sączek bibułowy.
 - 6.1.3. Przenieść pipetą 3,0 ml przesączu otrzymanego w pkt 6.1.2. i 5,0 ml roztworu wzorca wewnętrznego (4.13.) do 50 ml kolby miarowej. Uzupelnąć do kreski roztworem wymywającym (4.10.) i wymieszać. Stosować tak otrzymany roztwór do wykonania analizy chromatograficznej opisanej w pkt 6.2.
 - 6.2. Chromatografia
 - 6.2.1. Ustawić przepływ fazy ruchomej (4.10.) na 1,2 ml/min, temperaturę kolumny na 45 °C.
 - 6.2.2. Ustawić detektor (5.2.) na długość fali 274 nm. Wprowadzić mikrostrzykawką co najmniej dwukrotnie po 20 µl roztworu (6.1.3.) do chromatografu i zmierzyć powierzchnię pików.
 - 6.3. Krzywa wzorcowa
 - 6.3.1. Wprowadzić kolejno po 20 µl wszystkich roztworów standardowych (4.14.) i zmierzyć powierzchnię pików.
 - 6.3.2. Dla każdego stężenia obliczyć stosunek między powierzchniami pików 1-(4-aminobenzoesu) glicerolu i powierzchniami pików wzorca wewnętrznego. Nanieść ten stosunek na osi odciętych, a na osi rzędnych stosunek odpowiednich mas.
 - 6.3.3. W ten sam sposób postępować dla 4-hydroksybenzoesu etylu.
7. Obliczenia
 - 7.1. Z krzywej wzorcowej otrzymanej w pkt 6.3. odczytać stosunki mas (RP1, RP2) odpowiadające stosunkom między powierzchniami pików obliczonymi w pkt 6.23., gdzie:
RP1 stosunek: masa 1-(4-aminobenzoesu)glicerolu/masa 4-hydroksybenzoesu etylu,
RP2 stosunek: masa 4-aminobenzoesu etylu/masa 4-hydroksybenzoesu etylu.

- 7.2. Ze stosunków mas otrzymanych w ten sposób obliczyć zawartość 1-(4-aminobenzoesanu) glicerolu i 4-aminobenzoesanu etylu, jako procenty masowe (% m/m) ze wzorów:

$$R_p\%(\text{m/m}) \text{ 1-(4-aminobenzoesan) glicerolu} = RP1 \times \frac{q}{6p}$$

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

w których:

q ilość 4-hydroksybenzoesanu etylu (wzorca wewnętrznego), w miligramach (4.12.),

p ilość próbki, w gramach 6.1.1.

8. Powtarzalność (ISO 5725)

8.1. Dla zawartości 5 % (m/m) 1-(4-aminobenzoesanu) glicerolu różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie może przekroczyć 0,25 %.

8.2. Dla zawartości 1 % (m/m) 4-aminobenzoesanu etylu różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie może przekroczyć 0,10 %.

9. Uwagi

9.1. Przed wykonaniem analizy należy sprawdzić, czy próbka nie zawiera substancji, których piki mogłyby się pokrywać częściowo z pikami wzorca wewnętrznego (4-hydroksybenzoesanu etylu) na chromatogramie.

9.2. W celu sprawdzenia braku zakłóceń należy powtórzyć oznaczenie, zmieniając proporcje metanolu w fazie ruchomej odpowiednio o 10 %.

Oznaczenie chlorobutanolu

1. Przedmiot i zakres zastosowania

Metoda jest odpowiednia do oznaczania chlorobutanolu (INN: CHLOROBUTANOL) w stężeniu maksymalnym do 0,5 % (m/m) we wszystkich kosmetykach, z wyjątkiem aerozoli.

2. Definicja

Zawartość chlorobutanolu zmierzona tą metodą jest wyrażona w procentach masowych (% m/m) wyrobu.

3. Zasada

Po odpowiednim przygotowaniu analizowanego wyrobu oznaczenie wykonuje się metodą chromatografii gazowej, stosując 2,2,2-trichloroetanol jako wzorzec wewnętrzny.

4. Odczynniki

Wszystkie odczynniki powinny być czystości analitycznej.

4.1. Chlorobutanol (1,1,1-trichloro-2-metylopropan-2-ol).

4.2. 2,2,2-trichloroetanol.

4.3. Etanol absolutny.

4.4. Roztwór standardowy chlorobutanolu: 0,025 g w 100 ml etanolu (4.3.) (m/v).

4.5. Roztwór standardowy 2,2,2-trichloroetanolu: 4 mg w 100 ml etanolu (4.3.)(m/v).

5. Aparatura

5.1. Zwykle wyposażenie laboratoryjne.

5.2. Chromatograf gazowy z detektorem elektronowym, Ni 63.

6. Procedura

6.1. Przygotowanie próbki

Zważyć dokładnie między 0,1 i 0,3 g próbki. Umieścić odważkę w 100 ml kolbie miarowej. Rozpuścić w etanolu (4.3.), dodać 1 ml roztworu wzorca wewnętrznego (4.5.) i uzupełnić do kreski etanolem (4.3.).

6.2. Warunki chromatografii gazowej

6.2.1. Warunki działania muszą zapewnić współczynnik rozdziału $R > 1,5$ zgodnie ze wzorem:

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

w którym:

 R_1 i R_2 czasy retencji pików, w minutach, W_1 i W_2 szerokość pików w połowie wysokości, w milimetrach, d' szybkość przesuwu papieru, w milimetrach na minutę.

6.2.2. Jako przykład podano następujące warunki działania zapewniające wymagany rozdział:

Kolumna	I	II
Materiał	szkło	stal nierdzewna
Długość	1,80 m	3 m
Średnica	3 mm	3 mm
Faza stacjonarna	10 % Carbowax 20 M TPA na Gaschrom Q 80-100 mesh	5 % OV-17 na Chromosorb WAW DMCS 80-100 mesh
Kondycjonowanie	2 do 3 dni w 190 °C	

Temperatura:		
- dozownik	200 °C	150 °C
- kolumna	150 °C	100 °C
- detektor	200 °C	150 °C
Gaz nośny	azot	argon/metan (95/5 v/v).
Przepływ	35 ml/min	35 ml/min

6.3. Krzywa wzorcowa

W pięciu 100 ml kolbach miarowych umieścić kolejno po 1 ml roztworu standardowego (4.5.) i po 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 i 0,6 ml roztworu otrzymanego w pkt 4.4., uzupełnić do kreski etanolem (4.3.) i wymieszać. Wprowadzić strzykawką po 1 µl każdego z tych roztworów do chromatografu zgodnie z warunkami działania podanymi w pkt 6.2.2. i narysować krzywą wzorcową, nanosząc na osi odciętych stosunek masy chlorobutanolu do masy 2,2,2-trichloroetanolu, a na osi rzędnych stosunek odpowiednich powierzchni pików.

6.4. Wprowadzić strzykawką 1 µl roztworu otrzymanego w pkt 6.1. i postępować zgodnie z warunkami opisanymi w pkt 6.2.2.

7. Obliczenia

7.1. Z krzywej wzorcowej (6.3.) obliczyć ilość „a” wyrażoną jako µg chlorobutanolu w roztworze 6.1.

7.2. Zawartość chlorobutanolu w próbce oblicza się zgodnie z wzorem:

$$\% \text{ m/m chlorobutanolu} = \frac{a \times 10^2}{p \times 10^n} = \frac{a}{p \times 10^4}$$

8. Powtarzalność (ISO 5725)

Dla zawartości chlorobutanolu 0,5 % (m/m) różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać 0,01 %.

Uwaga:

Jeśli wynik jest równy maksymalnemu dopuszczalnemu stężeniu lub jeśli je przekracza, należy sprawdzić, czy nie występują zakłócenia ze strony innych składników.

Identyfikowanie i oznaczanie chininy

A. Identyfikowanie

1. Przedmiot i zakres zastosowania

Metoda jest przeznaczona do wykrywania obecności chininy (INCI: QUININE) w szamponach i płynach do włosów.

2. Zasada

Identyfikację przeprowadza się metodą chromatografii cienkowarstwowej na żelu krzemionkowym. Wykrywanie chininy polega na stwierdzeniu fluorescencji w kwaśnym środowisku przy 360 nm.

Dla dalszego potwierdzenia, fluorescencję można eliminować oparami bromu, a opary amoniaku spowodują pojawienie się żółtawej fluorescencji.

3. Odczynniki

Wszystkie odczynniki powinny być czystości analitycznej.

3.1. Płytki z żelem krzemionkowym, bez wskaźników fluorescencji, o grubości 0,25 mm, 200 mm × 200 mm.

3.2. Rozpuszczalnik rozwijający: toluen/eter dietylowy/dichlorometan/dietyloamina (20:20:20:8 obj.).

3.3. Metanol.

3.4. Kwas siarkowy (VI), 96 %, $d_4^{20} = 1,84$.

3.5. Eter dietylowy.

3.6. Środek rozwijający: w chłodzonym pojemniku dodać ostrożnie 5 ml kwasu siarkowego (VI) (3.4.) do 95 ml eteru dietylowego (3.5.).

3.7. Brom.

3.8. Roztwór wodorotlenku amonu, 28 %, $d_4^{20} = 0,90$.

3.9. Chinina bezwodna.

3.10. Roztwór standardowy: zważyć dokładnie około 100,0 mg bezwodnej chininy (3.9.) w kolbie miarowej i rozpuścić w 100 ml metanolu (3.3.).

4. Aparatura

4.1. Zwykle wyposażenie do chromatografii cienkowarstwowej.

4.2. Łaźnia ultradźwiękowa.

4.3. Sączek miliporowy FH 0,5 μm lub równoważny z odpowiednim wyposażeniem do sączenia.

5. Procedura

5.1. Przygotowanie próbki

Zważyć dokładnie ilość próbki, która może zawierać w przybliżeniu 100 mg chininy w 100 ml kolbie miarowej, rozpuścić i uzupełnić do kreski metanolem (3.3.).

Zamknąć kolbę i zostawić na jedną godzinę w temperaturze otoczenia w łaźni ultradźwiękowej (4.2.). Przesączyć (4.3.) i stosować przesącz do analizy chromatograficznej.

5.2. Chromatografia cienkowarstwowa

Nanieść po 1,0 μl roztworu standardowego (3.10.) i 1,0 μl roztworu próbki (5.1.) na płytkę z żelem krzemionkowym (3.1.). Rozwojcie chromatogram na wysokość 150 mm z użyciem rozpuszczalnika 3.2. w komorze wysycanej uprzednio rozpuszczalnikiem (3.2.).

- 5.3. Rozwijanie
- 5.3.1. Suszyć płytkę w temperaturze otoczenia.
- 5.3.2. Spryskać płytkę odczynnikiem (3.6.).
- 5.3.3. Pozostawić płytkę do wysuszenia w ciągu jednej godziny w temperaturze otoczenia.
- 5.3.4. Obserwować płytkę w świetle lampy UV nastawionej na długość fali 360 nm. Chinina pojawia się jako plama o intensywnej błękitnej fluorescencji.

Przykładowo w tabelicy poniżej podano wartości współczynników retencji R_F głównych alkaloidów zbliżonych do chininy, przy rozwijaniu chromatogramu rozpuszczalnikiem 3.2.

Alkaloid	R_F
chinina	0,20
chinidyna	0,29
cynchonina	0,33
cynchonidyna	0,27
hydrochinidyna	0,17

- 5.3.5. Dla dalszego potwierdzenia obecności chininy, płytkę poddać przez okres około jednej godziny działaniu par bromu (3.7.). Fluorescencja znika. Kiedy ta sama płytka jest poddana działaniu par amoniaku (3.8.), pojawiają się ponownie plamy koloru brązowego, a kiedy ponownie bada się płytkę w świetle UV przy 360 nm, można zaobserwować żółtawą fluorescencję.

Czułość (granica) identyfikacji: 0,1 μg chininy.

B. Oznaczanie

1. Przedmiot i zakres zastosowania

Metoda opisuje oznaczanie chininy. Może być zastosowana do oznaczania maksymalnego dopuszczonego stężenia 0,5 % (m/m) w szamponach i 0,2 % (m/m) w płynach do włosów.

2. Definicja

Zawartość chininy jest wyrażona w procentach masowych (% m/m) wyrobu.

3. Zasada

Po odpowiednim przygotowaniu analizowanego produktu oznaczanie wykonuje się metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).

4. Odczynniki

Wszystkie odczynniki powinny być czystości analitycznej i odpowiednie do stosowania w HPLC.

4.1. Acetonitryl.

4.2. Diwodoroortofosforan (V) potasu (KH_2PO_4).

- 4.3. Kwas ortofosforowy (V), 85 %, $d_4^{20} = 1,7$.
- 4.4. Bromek tetrametyloamoniowy.
- 4.5. Chinina bezwodna.
- 4.6. Metanol.
- 4.7. Roztwór kwasu ortofosforowego (V) (0,1 M); zważyć 11,53 g kwasu ortofosforowego (V) (4.2.) i rozpuścić w wodzie w 1 000 ml kolbie miarowej.
- 4.8. Roztwór diwodoroortofosforanu (V) potasu (0,1 M); zważyć 13,6 g diwodoroortofosforanu (V) potasu (4.2.) i rozpuścić w wodzie w 1 000 ml kolbie miarowej.
- 4.9. Roztwór bromku tetrametyloamoniowego: rozpuścić 15,40 g bromku tetrametyloamoniowego (4.4.) w wodzie w 1 000 ml kolbie miarowej.
- 4.10. Roztwór wymywający: kwas ortofosforowy (V) (4.7.)/diwodoroortofosforan (V) potasu (4.8.)/bromek tetrametyloamoniowego (4.9.)/woda/acetonitryl (4.1.) (10:50:100:340:90 obj.). Skład fazy ruchomej można zmienić dla uzyskania współczynnika rozdziału $R > 1,5$ o wzorze:

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

gdzie:

R_1 i R_2 czasy retencji pików, w minutach,

W_1 i W_2 szerokość pików w połowie wysokości, w milimetrach,

d' szybkość przesuwu papieru, w milimetrach na minutę.

- 4.11. Krzemionka poddana działaniu oktadecylosilanu, 10 μm .
 - 4.12. Roztwory standardowe: zważyć dokładnie kolejno po około 5,0; 10,0; 15,0 i 20,0 mg bezwodnej chininy (4.5.) w serii 100 ml kolb miarowych. Uzupelnic do kreski metanolem (4.6.) i wytrząsać zawartość kolb do całkowitego rozpuszczenia chininy. Przesączyć każdą próbkę przez sączeek 0,5 μm .
5. Aparatura
 - 5.1. Zwykłe wyposażenie laboratoryjne.
 - 5.2. Łażnia ultradźwiękowa.
 - 5.3. Wyposażenie do wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem o zmiennych długościach fali UV.
 - 5.4. Kolumna: długość: 250 mm, średnica wewnętrzna: 4,6 mm, wypełnienie: krzemionka (4.11.).
 - 5.5. Sączeek miliporowy FH 0,5 μm lub równoważny z odpowiednim zestawem do sączenia.

6. Procedura
- 6.1. Przygotowanie próbki

Zważyć dokładnie w 100 ml kolbie miarowej taką ilość wyrobu, aby zawierała 10,0 mg bezwodnej chininy, dodać 20 ml metanolu (4.6.) i umieścić kolbę w łaźni ultradźwiękowej (5.2.) na 20 minut. Uzupelnąć do kreski metanolem (4.6.). Wymieszać roztwór i następnie przesączyć porcją (5.5.).
- 6.2. Chromatografia

Szybkość przepływu: 1,0 ml/min.
Długość fali w detektorze (5.3.): 332 nm.
Objętość wprowadzanej próbki: 10 µl przesączonego roztworu (6.1.).
Pomiar: powierzchnia pików.
- 6.3. Krzywa wzorcowa

Wprowadzić strzykawką co najmniej trzy razy po 10,0 µl każdego roztworu odniesienia (4.12.), zmierzyć powierzchnię pików i obliczyć średnią powierzchnię dla każdego stężenia.
Przygotować krzywą wzorcową i sprawdzić, czy jest prostoliniowa.
7. Obliczenia
- 7.1. Z krzywej wzorcowej (6.3.) wyznaczyć ilość bezwodnej chininy w µg obecnej w wprowadzonej objętości (6.2.).
- 7.2. Stężenie bezwodnej chininy w próbce wyrażone jako procent masowy (% m/m) otrzymuje się z następującego wzoru:

$$\% \text{ (m/m) bezwodnej chininy} = \frac{B}{A}$$

w którym:

B jest ilością w mikrogramach bezwodnej chininy oznaczonej w 10 mikrolitrach przesączonego roztworu (6.1.),

A jest masą próbki w gramach (6.1.).

8. Powtarzalność (ISO 5725)

Dla zawartości bezwodnej chininy 0,5 % (m/m) różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie może przekraczać 0,02 %.

Dla zawartości bezwodnej chininy 0,2 % (m/m) różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie może przekraczać 0,01 %.

Identyfikowanie i oznaczanie nieorganicznych siarczynów i wodorosiarczynów

Przedmiot i zakres zastosowania

Metoda opisuje identyfikowanie i oznaczanie nieorganicznych siarczynów i wodorosiarczynów w kosmetykach. Jest odpowiednia tylko dla tych wyrobów, które zawierają fazę wodną lub alkoholową i dla stężeń dwutlenku siarki nieprzekraczających 0,2 %.

A. Identyfikowanie

1. Zasada

Próbkę ogrzewa się w kwasie chlorowodorowym, a uwolniony ditlenek siarki identyfikuje się zarówno na podstawie jego zapachu, jak i barwy papierka wskaźnikowego.

2. Odczynniki

Wszystkie odczynniki powinny być czystości analitycznej.

2.1. Kwas chlorowodorowy (4 M).

2.2. Papierek wskaźnikowy z jodkiem potasu i skrobią lub inny odpowiedni.

3. Aparatura

3.1. Zwykły sprzęt laboratoryjny.

3.2. Kolba (25 ml) z krótką chłodnicą zwrotną.

4. Procedura

4.1. W kolbie (3.2.) umieścić około 2,5 g próbki i 10 ml kwasu chlorowodorowego (2.1.).

4.2. Wymieszać i ogrzewać do wrzenia.

4.3. Sprawdzić wydzielanie ditlenku siarki zarówno przez ocenę zapachową, jak i papierem wskaźnikowym (2.2.).

B. Oznaczanie

1. Definicja

Zawartość siarczynu lub wodorosiarczynu oznaczona tą metodą jest wyrażona jako procent masowy ditlenku siarki.

2. Zasada

Po zakwaszeniu próbki uwolniony ditlenek siarki destyluje się do roztworu nadtlenu wodoru. Powstały kwas siarkowy (VI) jest miareczkowany mianowanym roztworem wodorotlenku sodu.

3. Odczynniki

Wszystkie odczynniki powinny być czystości analitycznej.

3.1. Nadtlenek wodoru 0,2 % (m/v). Przygotowany tego samego dnia.

3.2. Kwas ortofosforowy (V), $d \frac{25}{4} = 1,75$.

3.3. Metanol.

3.4. Wodorotlenek sodu (0,01 M) roztwór mianowany.

3.5. Azot.

3.6. Wskaźnik: mieszanina 1:1 (obj.) czerwieni metylowej (0,03 % m/v w etanolu) i błękitu metylenowego 0,05 % (m/v w etanolu). Przesączyć otrzymaną mieszaninę.

4. Aparatura
 - 4.1. Zwykły sprzęt laboratoryjny.
 - 4.2. Aparatura do destylacji (patrz rysunek).
5. Procedura
 - 5.1. Zważyć dokładnie około 2,5 g próbki do kolby destylacyjnej A (patrz rysunek).
 - 5.2. Dodać 60 ml wody i 50 ml metanolu (3.3.), wymieszać.
 - 5.3. W odbieralniku destylatu D (patrz rysunek) umieścić 10 ml nadtlenu wodoru (3.1.), 60 ml wody i kilka kropli wskaźnika (3.6.). Dodać kilka kropli wodorotlenku sodu (3.4.) do zmiany zabarwienia wskaźnika na kolor zielony.
 - 5.4. Powtórzyć czynności 5.3. dla płuczki do przemywania E (patrz rysunek).
 - 5.5. Zmontować aparaturę i nastawić przepływ azotu (3.5.) na około 60 pęcherzyków na minutę.
 - 5.6. Wprowadzić 15 ml kwasu ortofosforowego (V) (3.2.) z wkraplacza do kolby destylacyjnej A.
 - 5.7. Ogrzewać szybko do wrzenia i następnie utrzymywać w stanie łagodnego wrzenia w ciągu 30 minut.
 - 5.8. Odłączyć odbiornik destylacji D. Popłukać rurkę łączącą i następnie miareczkować destylat roztworem wodorotlenku sodu (3.4.) do zmiany zabarwienia wskaźnika na kolor zielony (3.6.).

6. Obliczenia

Obliczenia zawartości siarczynu lub wodorosiarczynu w procentach masowych w próbce:

$$\% \text{ m/m dwutlenku siarki} = \frac{3,2MV}{m}$$

gdzie:

M – molowe stężenie roztworu wodorotlenku sodu (3.4.),

V – objętość roztworu wodorotlenku sodu (3.4.) zużyta do miareczkowania (5.8.), w mililitrach,

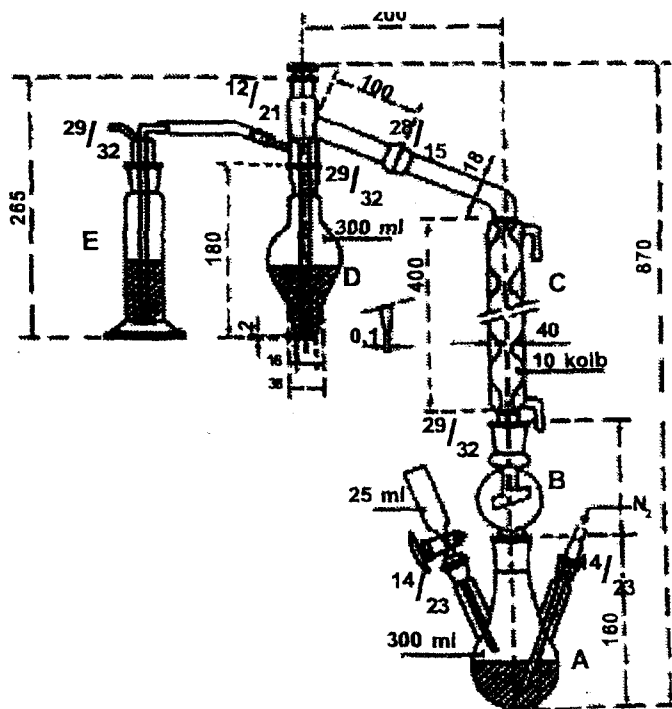
m – masa próbki (5.1.), w gramach.

7. Powtarzalność (ISO 5725)

Dla zawartości dwutlenku siarki 0,2 % różnica między dwoma równoległymi oznaczeniami wykonanymi dla tej samej próbki nie powinna być większa niż 0,006 %.

Aparatura do destylacji dwutlenku siarki według Tannera

Wszystkie wymiary w mm

**Identyfikowanie i oznaczanie chloranów metali alkalicznych**

Przedmiot i zakres zastosowania

Metoda opisuje identyfikowanie i oznaczanie chloranów w pastach do zębów i innych kosmetykach.

A. Identyfikowanie

1. Zasada
Chlorany oddziela się od innych związków chlorowcowych przez chromatografię cienkowsarstwową i identyfikuje przez utlenianie jodku potasu do jodu.
2. Odczynniki
Wszystkie odczynniki powinny być czystości analitycznej.
 - 2.1. Roztwory odniesienia: wodne roztwory chloranu, bromianu i jodan potasu (0,2 % m/v), świeżo przygotowane.
 - 2.2. Rozpuszczalnik rozwijający: roztwór amoniaku (28 % m/v)/aceton/butanol (60:130:30 obj.).
 - 2.3. Jodek potasu, roztwór wodny (5 % m/v).
 - 2.4. Roztwór skrobi (1 do 5 % m/v).

- 2.5. Kwas chlorowodorowy (1M).
- 2.6. Przygotowane fabrycznie celulozowe płytki do chromatografii cienkowarstwowej (0,25 mm).
3. Aparatura
Zwykły sprzęt do chromatografii cienkowarstwowej.
4. Procedura
 - 4.1. Ekstrahować około 1 g próbki wodą, przesączyć i rozcieńczyć do około 25 ml.
 - 4.2. Nanieść na płytkę (2.6.) 2 μ l roztworu (4.1.) razem z 2 μ l porcjami wszystkich trzech roztworów odniesienia (2.1.).
 - 4.3. Umieścić płytkę w komorze i rozwijać rozpuszczalnikiem (2.2.) metodą wstępującej chromatografii do około trzech czwartych długości płytki (2.6.).
 - 4.4. Wyjąć płytkę z komory i odparować rozpuszczalnik (uwaga: odparowanie może trwać do dwóch godzin).
 - 4.5. Spryskać płytkę roztworem jodku potasu (2.3.) i pozostawić ją do wyschnięcia na około pięć minut.
 - 4.6. Spryskać płytkę roztworem skrobi (2.4.) i pozostawić ją do wyschnięcia na około pięć minut.
 - 4.7. Spryskać płytkę kwasem chlorowodorowym (2.5.).
5. Ocena

Jeśli chloran jest obecny w próbce, to po upływie pół godziny pojawi się na płycie błękitna plama (może być także plama brązowa) o wartości R_f w przybliżeniu 0,7 do 0,8.

Związek chlorowcowy	R_f
jodan	0-0,2
bromian (V)	0,5-0,6
chloran (V)	0,7-0,8

Należy zauważyć, że bromiany i jodany ulegają reakcji natychmiast. Należy być ostrożnym, aby nie pomylić bromianów i chloranów.

B. Oznaczanie

1. Definicja
Zawartość chloranu w próbce oznaczona tą metodą jest wyrażona w procentach masowych chloranu.
2. Zasada
Chloran ulega redukcji pyłem cynkowym w środowisku kwaśnym. Powstały chlorek mierzy się miareczkowaniem potencjometrycznym z użyciem roztworu azotanu (V) srebra. Podobne oznaczenie przed redukcją pozwala określić możliwą obecność halogenków.

3. Odczynniki

Wszystkie odczynniki powinny być czystością analityczną.

3.1. Kwas octowy, 80 % (m/m).

3.2. Pył cynkowy.

3.3. Mianowany roztwór azotanu (V) srebra (0,1 M)

4. Aparatura

4.1. Zwyczajny sprzęt laboratoryjny.

4.2. Potencjometr wyposażony w elektrodę czulą na jony srebra.

5. Procedura

5.1. Przygotowanie próbek

Zważyć dokładnie w probówce wrotki ilość (m) około 2 g próbki. Dodać około 15 ml kwasu octowego (3.1.) i zamieszać starannie. Poczekać 30 minut i wirować w ciągu 15 minut przy 2 000 obr/min. Zlać roztwór z nad osadu do 50 ml kolby miarowej. Powtórzyć wirowanie dwukrotnie, dodając 15 ml kwasu octowego (3.1.) do pozostałości. Zebrać roztwory zawierające chloran w tej samej kolbie miarowej. Uzupelnąć do kreski kwasem octowym (3.1.).

5.2. Redukcja chloranu

Pobrać 20 ml roztworu 5.1. i dodać 0,6 g pyłu cynkowego (3.2.). Doprowadzić do wrzenia w kolbie wyposażonej w chłodnicę zwrotną. Po 30 minutach wrzenia schłodzić i przesączyć. Popłukać kolbę wodą. Przesączyć i połączyć z poprzednim przesączem.

5.3. Oznaczenie chlorku

Miareczkować 20 ml przesącza (5.2.) azotanem (V) srebra (3.3.) z zastosowaniem potencjometru (4.2.). W ten sam sposób miareczkować 20 ml roztworu 5.1. azotanem (V) srebra (3.3.).

Uwaga: Jeśli produkt zawiera pochodne bromu lub jodu, które mogą uwalniać bromki lub jodki po redukcji, krzywa miareczkowania będzie miała kilka punktów przegięcia. W tym przypadku objętość użytego do miareczkowania roztworu (3.3.) odpowiadająca chlorkom jest różnica między ostatnim i przedostatnim punktem przegięcia.

6. Obliczenia

Zawartość chloranu w próbce (% m/m) oblicza się z wzoru:

$$\text{chloran (ClO}_2\text{)}^{\circ}\% \text{ m/m} = \frac{20,9(V - V')M}{m}$$

gdzie:

V – objętość w mililitrach roztworu azotanu (V) srebra (3.3.) zużyta do miareczkowania roztworu 5.2.

V' – objętość w mililitrach roztworu azotanu (V) srebra (3.3.) zużyta do miareczkowania 20 mililitrów roztworu 5.1.

M – stężenie molowe mianowanego roztworu azotanu (V) srebra (3.3.).

m – masa próbki, w gramach

7. Powtarzalność (ISO 5725)

Dla zawartości chloranu 3,5 % m/m różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać 0,07 % m/m.

Identyfikowanie i oznaczanie jodanu sodu

Przedmiot i zakres zastosowania

Metoda opisuje procedurę identyfikowania i oznaczania jodanu sodu (INCI: SODIUM IODATE) w zawierających go kosmetykach sflukiwanych.

A. Identyfikowanie

1. Zasada

Jodan sodu oddziela się od innych związków chlorowcowych przez chromatografię cienkowarstwową i identyfikuje przez utlenianie jodku do jodu.

2. Odczynniki

Wszystkie odczynniki powinny być czystości analitycznej.

2.1. Roztwory odniesienia. Wodne roztwory chloranu, bromianu i jodanu potasu (0,01 % m/v) świeżo przygotowane.

2.2. Roztwór rozwijający. Roztwór amoniaku (28 % m/v)/aceton/butanol (60:130:30 obj.).

2.3. Jodek potasu, wodny roztwór (5 % m/v).

2.4. Roztwór skrobi (I do 5 % m/v).

2.5. Kwas chlorowodorowy (1 M).

3. Aparatura

3.1. Przygotowane fabrycznie celulozowe płytki do chromatografii cienkowarstwowej (0,25 mm).

3.2. Zwykły sprzęt do chromatografii cienkowarstwowej.

4. Procedura

4.1. Ekstrahować około 1 g próbki wodą, przesączyć i rozcieńczyć do około 10 ml.

4.2. Nanieść 2 µl otrzymanego roztworu na linię bazową płytki (3.1.) razem z 2 µl porcjami wszystkich trzech roztworów odniesienia (2.1.).

4.3. Umieścić płytkę w komorze i rozwijać rozpuszczalnikiem (2.2.) metodą wstępującej chromatografii do około trzech czwartych długości płytki.

4.4. Wyjąć płytkę z komory i pozostawić do odparowania w temperaturze otoczenia (uwaga: odparowywanie może trwać do dwóch godzin).

4.5. Spryskać płytkę roztworem jodku potasu (2.3.) i pozostawić do wyschnięcia na około pięć minut.

4.6. Spryskać płytkę roztworem skrobi (2.4) i pozostawić do wyschnięcia na około pięć minut.

4.7. Na koniec spryskać płytkę kwasem chlorowodorowym (2.5.).

5. Ocena

Jeśli w próbce obecny jest jodan, natychmiast pojawia się błękitna plama (zabarwienie może być brązowe lub stawać się brązowe z upływem czasu) o wartości R_f od 0,0 do 0,2.

Należy zauważyć, że bromiany dają natychmiast taką barwną reakcję o wartościach R_f od 0,5 do 0,6, a chlorany po około 30 minutach o wartościach R_f od 0,7 do 0,8.

B. Oznaczanie

1. Definicja

Zawartość jodanu sodu oznaczona tą metodą jest wyrażona jako procent masowy jodanu sodu.

2. Zasada

Jodan sodu rozpuszcza się w wodzie i oznacza metodą wysokosprawnej chromatografii ciekowej, używając kolejno kolumny C 18 z fazami odwróconymi i kolumny z wymiennicem anionowym.

3. Odczynniki

Wszystkie odczynniki powinny być czystości analitycznej i szczególnie odpowiednie do wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC).

3.1. Kwas chlorowodorowy (4M).

3.2. Siarczyn sodu, wodny roztwór 5 % m/v.

3.3. Jodan sodu, roztwór bazowy. Przygotować roztwór bazowy zawierający 50 mg jodanu sodu w 100 ml wody.

3.4. Diwodoroortofosforan (V) potasu.

3.5. Dihydrat wodoroortofosforanu (V) disodu ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$).

3.6. Faza ruchoma HPLC: rozpuścić 3,88 g diwodoroortofosforanu (V) potasu (3.4.) i 1,19 g dihydratu wodoroortofosforanu (V) disodu (3.5.) w 1 litrze wody. pH otrzymanego roztworu ma wynosić 6,2.

3.7. Uniwersalny papierek wskaźnikowy pH 1-11.

4. Aparatura

4.1. Zwyczajny sprzęt laboratoryjny.

4.2. Bibuła filtracyjna, krążki o średnicy 110 mm, Schleicher and Schuili nr 575 lub równoważna.

4.3. Chromatograf do wysokosprawnej chromatografii ciekowej z detektorem o zmiennej długości fali.

4.4. Kolumny: długość 120 mm, średnica wewnętrzna: 4,6 mm; dwie kolumny połączone kolejno: pierwsza kolumna – Nucleosil[®] 5 C18 lub równoważna; druga kolumna – Vydac[™]-301-SB lub równoważna.

5. Procedura

5.1. Przygotowanie próbki

5.1.1. Próbki ciekłe (szampony)

W 10 ml szklanej probówce wyskalowanej i zamykanej korkiem lub kolbie miarowej zważyć dokładnie próbkę około 1,0 g próbki.

Uzupełnić wodą do kreski i wymieszać.

Przesączyć roztwór, jeśli potrzeba.

Oznaczyć jodan w roztworze metodą HPLC zgodnie z opisem w pkt 5.2.

5.1.2. Próbki stałe (mydła)

Rozdrobnić starannie część próbki i zważyć odważką analityczną około 1,0 g w 100 ml szklanym cylindrze miarowym z korkiem. Uzupełnić wodą do 50 ml i wytrząsać energicznie w ciągu jednej minuty. Odwinąć i przesączyć przez bibułę filtracyjną (4. 2.) i pozostawić mieszaninę do odstania przez co najmniej jedną noc.

Wytrząsnąć podobny do żelu roztwór i przesączyć go przez bibułę filtracyjną (4. 2.).

Oznaczyć jodan w przesączu metodą HPLC zgodnie z opisem w pkt 5.2.

5.2. Chromatografia

Przepływ: 1 ml/min.

Długość fali detektora (4.3.): 210 nm.

Wstrzykiwana objętość próbki: 10 μ l.

Sposób pomiaru: obliczenie wielkości powierzchni piku.

5.3. Krzywa wzorcowa

Do 50 ml kolb miarowych wprowadzić pipetą kolejno po 1,0; 2,0; 5,0; 10,0 i 20,0 ml roztworu jodanu sodu (3.3.).

Uzupełnić do kreski i wymieszać. Otrzymane w ten sposób roztwory zawierają odpowiednio 0,01; 0,02; 0,05; 0,10 i 0,20 mg jodanu sodu na ml.

Wprowadzić strzykawką kolejno 10 μ l porcji wszystkich standardowych roztworów jodanu do chromatografu (4.3.) i otrzymać ich chromatogramy. Oznaczyć powierzchnie pików dla jodanu i wykreślić krzywą przedstawiającą stosunek powierzchni piku do stężenia jodanu sodu.

6. Obliczanie

Obliczyć zawartość jodanu sodu w procentach masowych (% m/m), używając wzoru:

$$\% \text{ (m/m) jodanu sodu} = \frac{V_e}{10 \cdot m} \cdot c$$

gdzie:

m – masa w gramach odważki analitycznej (5.1.),

V – całkowita objętość roztworu próbki, w mililitrach, otrzymanego jak opisano w pkt 5.1.,

c – stężenie, w miligramach na mililitr jodanu sodu, otrzymane z krzywej wzorcowej (5.3.).

7. Powtarzalność (ISO 5725)

Dla zawartości jodanu sodu 0,1 % (m/m) różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonywanych dla tej samej próbki nie może przekraczać 0,002 %.
8. Potwierdzenie
 - 8.1. Zasada

W kwaśnym roztworze produktu kosmetycznego, jodan sodu (IO_3^-) jest redukowany do jodku (I^-) przez siarczyn. Powstały roztwór jest badany metodą HPLC. Jeśli pik, przy czasie retencji korespondującym z czasem retencji jodanu, zanika po zastosowaniu siarczynu, pierwotny pik można uznać za efekt działania jodanu.
 - 8.2. Procedura

Wprowadzić pipetą do kolby stożkowej 5 ml porcję roztworu próbki otrzymanego według opisu w pkt 5.1.

Za pomocą kwasu chlorowodorowego doprowadzić pH roztworu do wartości 5 lub niższej (3.1.); sprawdzić wartość pH uniwersalnym papierkiem wskaźnikowym (3.7.).

Dodać trzy krople roztworu siarczynu sodu (3.2.) i wymieszać.

Wprowadzić strzykawką 10 μl porcję roztworu do chromatogramu cieczowego (4.3.).

Porównywać ostatni chromatogram z chromatogramem tej samej próbki otrzymanym według opisu w ust. 5.

Identyfikowanie i oznaczanie azotanu (V) srebra w produktach kosmetycznych

A. Identyfikowanie

1. Cel i zakres stosowania

Celem metody jest identyfikowanie azotanu (V) srebra (AgCl , SILVER NITRATE) jako srebra w produktach kosmetycznych zawierających wodę.
2. Zasada

Srebro identyfikuje się dzięki tworzeniu białego, charakterystycznego osadu z jonami chloru.
3. Odczynniki

Wszystkie odczynniki muszą być czystości analitycznej.
- 3.1. Kwas chlorowodorowy, roztwór 2 M.
- 3.2. Roztwór amoniaku, rozcieńczony stężony roztwór wodorotlenku amonu ($d_{20} = 0,88 \text{ g/ml}$) równą ilością wody i wymieszać.
- 3.3. Kwas azotowy (V), roztwór 2 M.
4. Aparatura
 - 4.1. Zwykły sprzęt laboratoryjny.
 - 4.2. Wirówka.

5. Procedura
- 5.1. Do około 1 g próbki w probówce wirówki dodawać kroplami 2 M roztwór kwasu chlorowodorowego (3.1.) aż do całkowitego wytrącenia osadu; wymieszać i odwirować.
- 5.2. Odrzucić ciecz znajdującą się na powierzchni i przemyć jednokrotnie osad pięcioma kroplami zimnej wody. Roztwory z przemycia odrzucić.
- 5.3. Dodać wodę w ilości równej masie osadu w probówce wirówki. Ogrzewać do wrzenia i wymieszać.
- 5.4. Odwirować gorącą próbkę, odrzucić ciecz znajdującą się na wierzchu.
- 5.5. Do osadu dodać kilka kropli roztworu amoniaku (3.2.); wymieszać i odwirować.
- 5.6. Do jednej kropli cieczy znajdującej się na szklanej płytce dodać kilka kropli 2 M roztworu kwasu azotowego (V) (3.3.).
- 5.7. Biały osad wskazuje na obecność srebra.

B. Oznaczenie

1. Cel i zakres
Metoda jest odpowiednia dla oznaczania azotanu (V) srebra jako srebra w produktach kosmetycznych przeznaczonych do barwienia brwi i rzęs.
2. Zasada
Srebro oznacza się w produkcji metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej.
3. Odczynniki
Wszystkie odczynniki muszą być czystości analitycznej.
 - 3.1. Kwas azotowy (V), roztwór 0,02 M.
 - 3.2. Roztwory mianowane srebra.
 - 3.2.1. Bazowy roztwór mianowany srebra zawierający 1000 µg/ml w 0,5 M roztworze kwasu azotowego (V) („SpectrosoL” lub równorzędny).
 - 3.2.2. Roztwór mianowany srebra zawierający 100 µg/ml: przenieść pipetą 10 ml bazowego roztworu mianowanego srebra (3.2.1.) do 100 ml kolby miarowej. Uzupelnąć objętość 0,02 M roztworem kwasu azotowego (V) (3.1.) i wymieszać. Mianowany roztwór powinien być świeży i przechowywany w butelce z ciemnego szkła.
4. Aparatura
 - 4.1. Zwyczajny sprzęt laboratoryjny.
 - 4.2. Spektrofotometr absorpcji atomowej wyposażony w lampę z katodą węgłową do oznaczania srebra.
5. Procedura
 - 5.1. Przygotowanie próbki.
Odważyć dokładnie około 0,1 g (m gramów) jednolitej (homogenicznej) próbki produktu. Przenieść ilościowo odważkę do jednolitrowej kolby miarowej. Uzupelnąć objętość 0,02 M roztworem kwasu azotowego (V) (3.1.) i wymieszać.
 - 5.2. Warunki analizy metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej:
płomień: powietrze - acetylen
długość fali: 338,3 nm
korekta tła: stosuje się
własności płomienia: ubogi, dla uzyskania maksymalnej absorbancji konieczna będzie optymalizacja wysokości palnika i warunków spalania.

- 5.3. Krzywa wzorcowa
- 5.3.1. Przenieść pipetą po 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 i 5,0 ml roztworu mianowanego srebra (3.2.2.) do serii 100 ml kolb miarowych, uzupełnić objętość w każdej kolbie do kreski 0,02 M roztworem kwasu azotowego (V) (3.1.) i wymieszać. Roztwory te zawierają odpowiednio 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 i 5,0 µg srebra w milimetrze.
- 5.3.2. Zmierzyć absorbancję 0,02 M roztworu kwasu azotowego (V) (3.1.) i stosować uzyskaną wartość jako odpowiadającą zerowemu stężeniu srebra dla krzywej wzorcowej. Zmierzyć absorbancję każdego roztworu mianowanego srebra (5.3.1.). Wykreślić krzywą wzorcową odpowiadającą stosunkom wartości absorbancji do stężenia srebra.
- 5.4. Oznaczanie
Zmierzyć absorbancję roztworu próbki (5.1.). Z krzywej wzorcowej odczytać stężenie srebra odpowiadające absorbancji otrzymanej dla roztworu próbki.
6. Obliczenie
Obliczenie zawartości azotanu (V) srebra w próbce, w procentach masowych (% mm), z zastosowaniem wzoru:

$$\% \text{ (m/m) azotanu (V) srebra} = \frac{1,5748 \times c}{10 \times m}$$

w którym:

m – masa w gramach próbki pobranej do analizy (5.1.),

c – stężenie srebra w roztworze próbki (5.1.), w mikrogramach na mililitr, otrzymane z krzywej wzorcowej.

7. Powtarzalność (ISO 5725)
Dla zawartości azotanu (V) srebra wynoszącej 4 % (m/m) różnica między wynikami dwóch oznaczeń wykonanych równoległe dla tej samej próbki nie powinna przekraczać 0,05 % (m/m).

Identyfikowanie i oznaczanie disiarczku selenu w szamponach przeciwłupieżowych

A. Identyfikowanie

1. Cel i zakres stosowania
Celem metody jest identyfikowanie disiarczku selenu jako selenu w szamponach przeciwłupieżowych.
2. Zasada
Selen identyfikuje się poprzez charakterystyczny kolor od żółtego do pomarańczowego powstający w reakcji z mocznikiem i jodkiem potasu.
3. Odczynniki
Wszystkie odczynniki muszą być czystości analitycznej.
 - 3.1. Kwas azotowy (V) stężony, $d_{20} = 1,42$ g/ml.
 - 3.2. Mocznik.
 - 3.3. Jodek potasu, roztwór 10 % (m/v); rozpuścić 10 g jodku potasu w 100 ml wody.
4. Aparatura
 - 4.1. Zwykły sprzęt laboratoryjny.
 - 4.2. Probówka do wytrawiania, 100 ml objętości.
 - 4.3. Ogrzewany blok do wytrawiania.
 - 4.4. Bibuła filtracyjna (Whatman nr 42 lub równoważna) lub filtr membranowy o średnicy porów 0,45 µm.

5. Procedura
- 5.1. Do około 1 g szamponu umieszczonego w probówce do wytrawiania (4.2.) dodać 2,5 ml stężonego kwasu azotowego (V) (3.1.) i umieścić w temperaturze 150 °C na 30 minut w ogrzewanym bloku do wytrawienia (4.3.).
- 5.2. Rozcieńczyć wytrawioną próbkę wodą do 25 ml i przesączyć przez bibułę filtracyjną lub filtr membranowy o średnicy porów 0,45 µm (4.4.).
- 5.3. Do 2,5 ml przesączu dodać 5 ml wody 2,5 g mocznika (3.2.) i ogrzewać do wrzenia. Schłodzić i dodać 1 ml roztworu jodku potasu (3.3.).
- 5.4. Zabarwienie od żółtego do pomarańczowego, ciemniejące gwałtownie podczas przechowywania, wskazuje na obecność selenu.

B. Oznaczenie

1. Cel i zakres
Celem metody jest oznaczenie disiarczku selenu jako selenu w szamponach przeciwłupieżowych zawierających do 4,5 % (m/m) disiarczku selenu.
2. Zasada
Próbka jest wytrawiana kwasem azotowym (V), selen jest oznaczony w powstałym roztworze za pomocą absorpcyjnej spektrometrii atomowej.
3. Odczynniki
Wszystkie odczynniki muszą być czystości analitycznej.
 - 3.1. Kwas azotowy (V) stężony, $d_{20} = 1,42$ g/ml.
 - 3.2. Kwas azotowy (V), roztwór 5 % (obj.): stale mieszając dodać 50 ml stężonego kwasu azotowego (V) (3.1.) do 500 ml wody w zlewce. Przenieść ten roztwór do jednolitrowej kolby miarowej i uzupełnić objętość wodą do kreski.
 - 3.3. Bazowy mianowany roztwór selenu zawierający 1000 µg/ml w 0,5 M kwasie azotowym (V) („SpectrosoL” lub równoważny).
4. Aparatura
 - 4.1. Zwykły sprzęt laboratoryjny.
 - 4.2. Probówka do wytrawiania, 100 ml objętości.
 - 4.3. Ogrzewany blok do wytrawiania.
 - 4.4. Bibuła filtracyjna (Whatman nr 42 lub równoważna) lub filtr membranowy o średnicy porów 0,45 µm.
 - 4.5. Spektrofotometr absorpcji atomowej wyposażony w lampę z katodą wnątkową do oznaczania selenu.
5. Procedura
 - 5.1. Przygotowanie próbki.
 - 5.1.1. Zważyć w probówce do wytrawiania (4.2.) dokładnie około 0,2 g (m gramów) jednolitej (homogenicznej) próbki szamponu.
 - 5.1.2. Dodać 5 ml stężonego kwasu azotowego (V) (3.1.) i wytrawiać w 150 °C w ciągu jednej godziny w ogrzewanym bloku do wytrawiania (4.3.).
 - 5.1.3. Pozostawić roztwór do schłodzenia i rozcieńczyć wodą do 100 ml. Przesączyć przez bibułę filtracyjną lub filtr membranowy o średnicy porów 0,45 µm (4.4.) i zachować przesącz do wykonania oznaczenia.
 - 5.2. Warunki analizy metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej:
płomień: powietrze-acetylen
długość fali: 196,0 nm
korekcja tła: stosuje się
własności płomienia: ubogi, dla uzyskania maksymalnej absorbancji konieczna będzie optymalizacja wysokości palnika i warunków spalania.

- 5.3. Krzywa wzorcowa
- 5.3.1. Przenieść pipetą po 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 i 5,0 ml bazowego roztworu mianowanego selenu (3.3.) do serii 100 ml kolb miarowych. Uzupełnić objętość we wszystkich kolbach do kreski 5 % (obj.) roztworem kwasu azotowego (V) (3.2.) i wymieszać. Roztwory te zawierają odpowiednio po 10, 20, 30, 40 i 50 µg selenu w mililitrze.
- 5.3.2. Zmierzyć absorbancję 5 % (obj.) roztworu kwasu azotowego (V) (3.2.) i stosować uzyskaną wartość jako odpowiadającą zerowemu stężeniu selenu dla krzywej wzorcowej. Zmierzyć absorbancję wszystkich mianowanych roztworów selenu (5.3.1.) Wykreślić krzywą wzorcową odpowiadającą stosunkom wartości absorbancji do stężenia selenu.
- 5.4. Oznaczenie
Zmierzyć absorbancję roztworu próbki (5.1.3.). Z krzywej wzorcowej odczytać stężenie selenu odpowiadające wartości absorbancji otrzymanej dla roztworu próbki.
6. Obliczenie
Obliczyć zawartość disiarczku selenu w próbce, w procentach masowych (% m/m), z zastosowaniem wzoru:

$$\% \text{ (m/m) disiarczku selenu} = \frac{1,812 \times c}{100 \times m}$$

w którym:

m – masa w gramach próbki pobranej do analizy (5.1.),

c – stężenie selenu w roztworze próbki (5.1.3.), w mikrogramach na mililitr, otrzymane z krzywej wzorcowej.

7. Powtarzalność (ISO 5725)
Dla zawartości selenu wynoszącej 1 % (m/m) różnica między wynikami dwóch oznaczeń wykonanych równoległe dla tej samej próbki nie powinna przekraczać 0,05 % (m/m).

Oznaczenie rozpuszczalnych postaci baru i strontu w pigmentach w formie soli i laków

A. Oznaczenie rozpuszczalnego baru

1. Cel i zakres stosowania
Metoda podaje procedurę ekstrakcji i oznaczania rozpuszczalnego baru z pigmentów w formie soli i laków.
2. Zasada
Pigment ekstrahuje się 0,07 M roztworem kwasu chlorowodorowego w określonych warunkach, a następnie ilość baru w ekstrakcie oznacza się metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej.
3. Odczynniki
Wszystkie odczynniki muszą być czystości analitycznej.
 - 3.1. Alkohol etylowy absolutny.
 - 3.2. Kwas chlorowodorowy, roztwór 0,07 M.
 - 3.3. Kwas chlorowodorowy, roztwór 0,5 M.
 - 3.4. Chlorek potasu, roztwór 8 % (m/m); rozpuścić 16 g chlorku potasu w 200 ml 0,07 M roztworu kwasu chlorowodorowego (3.2.).

- 3.5. Mianowany roztwór baru.
- 3.5.1. Bazowy mianowany roztwór baru zawierający 1000 $\mu\text{g/ml}$ w 0,5 M roztworze kwasu azotowego (V) („SpectrosoL” lub równoważny).
- 3.5.2. Mianowany roztwór baru zawierający 200 $\mu\text{g/ml}$: przenieść pipetą 20,0 ml bazowego roztworu mianowanego baru (3.5.1.) do 100 ml kolby miarowej. Uzupelnić objętość do kreski 0,07 M roztworem kwasu chlorowodorowego (3.2.) i wymieszać.
4. Aparatura
 - 4.1. Zwykły sprzęt laboratoryjny.
 - 4.2. Pehametr o dokładności $\pm 0,02$ jednostek.
 - 4.3. Przegubowa wytrząsarka do kolb.
 - 4.4. Filtr membranowy o średnicy porów 0,45 μm .
 - 4.5. Spektrofotometr absorpcji atomowej wyposażony w lampę z katodą wnątkową do oznaczania baru.
5. Procedura
 - 5.1. Przygotowanie próbki.
 - 5.1.1. Odważyć dokładnie około 0,5 g (m gramów) pigmentu w kolbie stożkowej. Aby zapewnić wystarczającą objętość do energicznego mieszania, nie należy używać kolb o objętości mniejszej niż 150 ml.
 - 5.1.2. Dodać pipetą 1,0 ml alkoholu etylowego (3.1.) i obracać kolbę, aby zapewnić dokładne zwilżenie pigmentu. Dodać z biurety oznaczoną ilość 0,07 M roztworu kwasu chlorowodorowego (3.2.) wymaganą dla otrzymania stosunku „objętości kwasu” do „masy pigmentu” wynoszącej dokładnie 50 mililitrów na gram. Oznaczyć całkowitą objętość ekstraktu łącznie z alkoholem etylowym jako „V” w ml. Dla zapewnienia dokładnego wymieszania, wymieszać zawartość kolby ruchem wirowym w ciągu pięciu sekund.
 - 5.1.3. Za pomocą pehametru (4.2.) zmierzyć pH otrzymanej suspensji i jeśli wynosi ono powyżej 1,5, dodać kroplami 0,5 M roztwór kwasu chlorowodorowego (3.3.) aż do uzyskania pH 1,4–1,5.
 - 5.1.4. Zamknąć kolbę korkiem i natychmiast wytrząsnąć w ciągu 60 minut w wytrząsarce przegubowej do kolb (4.3.). Wytrząsarka musi działać z wystarczająco dużą szybkością, aby wytworzyła się piana. Przesączyć przez filtr membranowy o średnicy porów 0,45 μm (4.4.) i zebrać przesącz. Nie należy wirować ekstraktu przed przesączeniem. Przenieść pipetą 5,0 ml przesączu do 50 ml kolby miarowej; uzupełnić objętość do kreski 0,07 M kwasem chlorowodorowym (3.2.) i wymieszać. Roztworu tego używa się również do oznaczania strontu (dział B).
 - 5.1.5. Do 100 ml kolby miarowej przenieść pipetą 5,0 ml roztworu chlorku potasu (3.4.) i pewną objętość (W_{Ba} ml) rozcieńczonego przesączu (5.1.4.) dla otrzymania spodziewanego stężenia pomiędzy 3 i 10 μg baru w mililitrze. (Objętość 10 ml powinna być zadowalającym punktem wyjściowym.) Uzupelnić objętość w kolbie do kreski 0,07 M roztworem kwasu chlorowodorowego (3.2.) i wymieszać.
 - 5.1.6. Tego samego dnia oznaczyć stężenie baru w roztworze (5.1.5.) metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej.
 - 5.2. Warunki analizy metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej:
 - płomień: podtlenek azotu/acetylen
 - długość fali: 553,5 nm
 - korekcja tła: nie stosuje się
 - własności płomienia: ubogi, dla uzyskania maksymalnej absorbancji konieczna będzie optymalizacja wysokości palnika i warunków spalania.

- 5.3. Krzywa wzorcowa
- 5.3.1. Przenieść pipetą do 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 i 5,0 ml roztworu mianowanego baru (3.5.2.) do serii 100 ml kolb miarowych. Do każdej kolby dodać pipetą 5,0 ml roztworu chlorku potasu (3.4.); uzupełnić objętość do kreski 0,07 M roztworem kwasu chlorowodorowego (3.2.) i wymieszać. Roztwory te zawierają odpowiednio 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 i 10 µg baru na mililitr. Ślepą próbę przygotować podobnie, bez dodawania roztworu mianowanego baru.
- 5.3.2. Zmierzyć absorbancję ślepej próby (5.3.1.) i stosować uzyskaną wartość jako odpowiadającą zerowemu stężeniu baru dla krzywej odwzorowania. Zmierzyć absorbancję wszystkich mianowanych roztworów baru (5.3.1.) Wykreślić krzywą wzorcową odpowiadającą stosunkom wartości absorbancji do stężenia baru.
- 5.4. Oznaczenie
Zmierzyć absorbancję roztworu próbki (5.1.5.), z krzywej wzorcowej odczytać stężenie baru odpowiadające wartości absorbancji otrzymanej dla roztworu próbki.
6. Obliczenie
Zawartość rozpuszczalnego baru (% m/m) w pigmentcie jest wyrażona wzorem:

$$\% \text{ (m/m) rozpuszczalnego baru} = \frac{c \times V}{10W_{\text{Ba}} \times m}$$

w którym:

m – masa w gramach próbki pobranej do analizy (5.1.1.),

c – stężenie baru w roztworze próbki (5.1.5.), w mikrogramach na mililitr, otrzymane z krzywej wzorcowej,

V – całkowita objętość ekstraktu w mililitrach (5.1.2.),

W_{Ba} – objętość ekstraktu w mililitrach, według pkt 5.1.5.

7. Powtarzalność

Najlepsza dostępna ocena powtarzalności (ISO 5725) dla tej metody wynosi 0,3 % dla zawartości rozpuszczalnego baru wynoszącej 2% (m/m).

8. Uwagi

- 8.1. W pewnych warunkach absorbancja baru może wzrosnąć w obecności wapnia. Temu wzrostowi można przeciwdziałać, dodając jon magnezu w stężeniu 5 g na litr (Magnez jako modyfikator do oznaczania baru płomieniową emisyjną spektrometrią atomową. Jerrow M i inni, Analytical Proceedings, 1991 r., 28 z 40.)
- 8.2. Dozwolone jest zastosowanie metody plazmy sprzężonej indukcyjnie – emisyjnej spektrometrii atomowej, jako metody alternatywnej w stosunku do płomieniowej absorpcyjnej spektrometrii atomowej.

B. Oznaczenie rozpuszczalnego strontu

1. Cel i zakres stosowania
Metoda podaje procedurę ekstrakcji i oznaczania rozpuszczalnego strontu z pigmentów w formie soli lub laków.
2. Zasada
Pigment ekstrahuje się 0,07 M roztworem kwasu chlorowodorowego w określonych warunkach, a ilość strontu w ekstrakcie oznacza się metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej.
3. Odczynniki
Wszystkie odczynniki muszą być czystości analitycznej.
- 3.1. Alkohol etylowy absolutny.
- 3.2. Kwas chlorowodorowy, 0,07 M roztwór.

- 3.3. Chlorek potasu, roztwór 8 % (m/v); rozpuścić 16 g chlorku potasu w 200 ml 0,07 M roztworu kwasu chlorowodorowego (3.2.).
- 3.4. Roztwory wzorcowe strontu.
 - 3.4.1. Bazowy roztwór wzorcowy strontu zawierający 1000 µg/ml w 0,5 M roztworze kwasu azotowego (V) („SpectrosoL” lub równoważny).
 - 3.4.2. Roztwór wzorcowy strontu zawierający 100 µg/ml: przenieść pipetą 10,0 ml bazowego roztworu wzorcowego strontu (3.4.1.) do 100 ml kolby miarowej. Uzupełnić objętość do kreski 0,07 M roztworem kwasu chlorowodorowego (3.2.) i wymieszać.
4. Aparatura
 - 4.1. Zwykły sprzęt laboratoryjny.
 - 4.2. Filtr membranowy o średnicy porów 0,45 µm.
 - 4.3. Spektrofotometr absorpcyjny wyposażony w lampę z katodą węgłową do oznaczania strontu.
5. Procedura
 - 5.1. Przygotowanie próbki.

Do oznaczania zawartości rozpuszczalnego strontu używa się roztworu przygotowanego w dziale A.5.1.4.

 - 5.1.1. Do 100 ml kolby miarowej przenieść pipetą 5,0 ml roztworu chlorku potasu (3.3.) i pewną objętość (W_s , ml) rozcieńczonego przesącza (A.5.1.4.) do otrzymania oczekiwanego stężenia między 2 i 5 µg strontu na mililitr (zadawalającym punktem wyjściowym powinna być objętość 25 ml). Uzupełnić objętość do kreski 0,07 M roztworem kwasu chlorowodorowego (3.2.) i wymieszać.
 - 5.1.2. Oznaczyć stężenie strontu w roztworze (5.1.1.) metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej tego samego dnia.
 - 5.2. Warunki analizy metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej:

plomień: podtlenek azotu/acetylen
długość fali: 460,7 nm
korekcja tła: nie stosuje się
własności płomienia: ubogi; dla uzyskania maksymalnej absorbancji konieczna będzie optymalizacja wysokości palnika i warunków spalania.
 - 5.3. Krzywa wzorcowa
 - 5.3.1. Przenieść pipetą po 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 i 5,0 ml roztworu mianowanego strontu (3.4.2.) do serii 100 ml kolb miarowych. Do wszystkich kolb dodać pipetą po 5,0 ml roztworu chlorku potasu (3.3.); uzupełnić objętość do kreski 0,07 M roztworem kwasu chlorowodorowego (3.2.) i wymieszać. Roztwory te zawierają odpowiednio 1,0, 2,0, 4,0 i 5,0 µg strontu w mililitrze. Podobnie przygotować ślepa próbę bez dodawania roztworu mianowanego strontu.
 - 5.3.2. Zmierzyć absorbancję roztworu ślepej próby (5.3.1.) i stosować uzyskaną wartość jako odpowiadającą zerowemu stężeniu strontu dla krzywej wzorcowej odpowiadającej stosunkom wartości piku absorbancji do stężenia strontu.
 - 5.4. Oznaczanie

Zmierzyć absorbancję roztworu próbki (5.1.1.). Z krzywej wzorcowej odczytać stężenie strontu odpowiadające wartości absorbancji otrzymanej dla roztworu próbki.

6. **Obliczenie**
Zawartość rozpuszczalnego strontu (% m/m) w pigmentcie jest wyrażona wzorem:

$$\% \text{ (m/m) rozpuszczalnego strontu} = \frac{c \times V}{10W_{Sr} \times m}$$

w którym:

- m – masa próbki pobranej do analizy (A.5.1.1.) w gramach,
 c – stężenie strontu w roztworze próbki (A.5.1.1.), otrzymane z krzywej wzorcowej, w mikrogramach na mililitr,
 V – objętość ekstraktu w mililitrach (A.5.1.2.),
 W_{Sr} – objętość ekstraktu w mililitrach, jak w ppkt 5.1.1.
7. **Powtarzalność**
Najlepsza dostępna ocena powtarzalności (ISO 5725) dla tej metody wynosi 0,09 % dla zawartości rozpuszczalnego strontu wynoszącej 0,6 % (m/m).
8. **Uwaga**
Dozwolone jest zastosowanie metody plazmy sprzężonej indukcyjnie – emisyjnej spektrometrii atomowej, jako metody alternatywnej w stosunku do płomieniowej absorpcyjnej spektrometrii atomowej.

Identyfikowanie i oznaczanie alkoholu benzyłowego w produktach kosmetycznych

A. Identyfikowanie

1. **Cel i zakres stosowania**
Celem metody jest identyfikowanie alkoholu benzyłowego w produktach kosmetycznych.
2. **Zasada**
Alkohol benzyłowy identyfikuje się metodą chromatografii cienkowsarstwowej na płytkach z żelazem krzemionkowym.
3. **Odczynniki**
Wszystkie odczynniki muszą być czystości analitycznej.
 - 3.1. Alkohol benzyłowy.
 - 3.2. Chloroform.
 - 3.3. Alkohol etylowy absolutny.
 - 3.4. n-Pentan.
 - 3.5. Rozpuszczalnik rozwijający: eter dietyłowy.
- 3.6. **Mianowany roztwór alkoholu benzyłowego:** odważyć 0,1 g alkoholu benzyłowego (3.1.) w 100 ml kolbie miarowej, uzupełnić objętość do kreski alkoholem etylowym (3.3.) i wymieszać.
- 3.7. **Płytki do chromatografii cienkowsarstwowej,** szklane, 100 x 200 mm lub 200 x 200 mm, pokryte warstwą żelazem krzemionkowym o grubości 0,25 mm (60 F₂₅₄).
- 3.8. **Środek wywołujący:** kwas dodekamolibdenianofosforowy 10 % (m/v) roztwór w alkoholu etylowym (3.3.).
4. **Aparatura**
 - 4.1. Zwykła aparatura do chromatografii cienkowsarstwowej.
 - 4.2. Komora chromatograficzna z dwoma zagłębieniami, o ogólnych przybliżonych wymiarach 80 mm x 230 mm x 240 mm.
 - 4.3. Bibuła chromatograficzna: Whatman lub równoważna.
 - 4.4. Lampa o promieniowaniu w zakresie nadfioletu, długość fali 254 nm.

5. Procedura
- 5.1. Przygotowanie próbki.
W 10 ml kolbie miarowej zważyć 1,0 g analizowanego produktu. Dodać 3 ml chloroformu (3.2.) i wytrząsać energicznie aż do zdyspergowania produktu. Uzupełnić objętość do kreski alkoholem etylowym (3.3.) i wytrząsnąć energicznie do powstania klarownego lub prawie klarownego roztworu.
- 5.2. Chromatografia cienkowarstwowa.
- 5.2.1. Wysycać komorę chromatograficzną (4.2.) n-pentanem następująco: wyłożyć ścianki komory chromatograficznej przylegające do ściany tylnego zagłębienia bibułą chromatograficzną (4.3.), upewniając się, że dolny brzeg bibuły znajduje się w zagłębieniu. Przenieść 25 ml n-pentanu (3.4.) do tylnego zagłębienia, nalewając ten rozpuszczalnik ponad widoczną powierzchnię bibuły chromatograficznej wykładającej ściany. Natychmiast zamknąć pokrywę i pozostawić komorę na 15 minut.
- 5.2.2. Nanieść 10 ml roztworu próbki (5.1.) i 10 ml roztworu mianowanego alkoholu benzyloвого (3.6.) w odpowiednich punktach linii startowej płytki do chromatografii cienkowarstwowej (3.7.). Pozostawić do wyschnięcia.
- 5.2.3. Do przedniego zagłębienia komory wprowadzić pipetą 10 ml eteru dietylowego (3.5.) i następnie natychmiast umieścić płytkę (5.2.2.) w tym samym zagłębieniu. Szybko zamknąć pokrywę komory i rozwijać chromatogram na płytce na odległość 150 mm. Usunąć płytkę z komory chromatograficznej i pozostawić do wyschnięcia w temperaturze pokojowej.
- 5.2.4. Obserwować płytkę (5.2.3.) w świetle nadfioletowym i zaznaczyć położenie fioletowych plam. Spryskać płytkę środkiem wywołującym (3.8.) i następnie ogrzewać płytkę w temperaturze 120 °C w ciągu około 15 minut. Alkohol benzylovery występuje jako ciemnoniebieska plama.
- 5.2.5. Obliczyć wartość R_F otrzymaną dla roztworu mianowanego alkoholu benzyloвого. Ciemnoniebieska plama o tym samym R_F , otrzymana z roztworu próbki, wskazuje na obecność alkoholu benzyloвого. Granica wykrywalności: 0,1 µg alkoholu benzyloвого.

B. Oznaczanie

1. Cel i zakres stosowania
Celem metody jest oznaczanie alkoholu benzyloвого w produktach kosmetycznych.
2. Definicja
Ilość alkoholu benzyloвого oznaczana tą metodą jest wyrażona w procentach masowych (% m/m).
3. Zasada
Próbkę ekstrahuje się metanolem i ilość alkoholu benzyloвого w ekstrakcie oznacza się metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).
4. Odczynniki
Wszystkie odczynniki muszą być czystości analitycznej, a tam gdzie to konieczne – odpowiadać HPLC.
- 4.1. Metanol.
- 4.2. 4-etoksyfenol.
- 4.3. Alkohol benzylovery.
- 4.4. Faza ruchoma: metanol (4.1.):woda (45:55 obj.).
- 4.5. Bazowy roztwór alkoholu benzyloвого: w 100 ml kolbie miarowej dokładnie odważyć około 0,1 g alkoholu benzyloвого (4.3.). Uzupełnić objętość metanolem (4.1.) do kreski i wymieszać.

- 4.6. Bazowy roztwór wzorca wewnętrznego: w 100 ml kolbie miarowej zważyć dokładnie około 0,1 g 4-etoksyfenolu (4.2.). Uzupełnić objętość metanolem (4.1.) do kreski i wymieszać.
- 4.7. Roztwory mianowane: do serii 25 ml kolb miarowych wprowadzić pipetą podane w poniższej tabeli ilości bazowego roztworu alkoholu benzyłowego (4.5.) i bazowego wewnętrznego roztworu mianowanego (4.6.). Uzupełnić objętość do kreski metanolem (4.1.) i wymieszać.

Roztwór mianowany	Stężenie alkoholu benzyłowego		Stężenie 4-etoksyfenolu	
	dodana ilość, w ml (4.5.)	µg/ml*	dodana ilość, w ml (4.6.)	µg/ml*
I	0,5	20	2	80
N	1,0	40	2	80
M	2,0	80	2	80
IV	3,0	120	2	80
V	5,0	200	2	80

* Wartości te podano jako wskazówkę i odpowiadają one stężeniom roztworów mianowanych przygotowanych z użyciem roztworów alkoholu benzyłowego (4.5.) i 4-etoksyfenolu (4.6.), które zawierają odpowiednio ściśle 0,1 % (m/v) alkoholu benzyłowego i ściśle 0,1 % (m/v) 4-etoksyfenolu.

5. Aparatura

- 5.1. Zwykły sprzęt laboratoryjny.
- 5.2. Zestaw do wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem w zakresie długości fal ultrafioletowych o zmiennej długości fali i objętością pętli przy wstrzykiwaniu 10 µl próbki.
- 5.3. Chromatograficzna kolumna analityczna: 250 mm x 4,6 mm ze stali kwasoodpornej wypełniona 5 µm Sphedisorb ODS lub równoważnym wypełnieniem.
- 5.4. Łaźnia wodna.
- 5.5. Łaźnia ultradźwiękowa.
- 5.6. Wirówka.
- 5.7. Probówki do wirówki o objętości 15 ml.

6. Procedura

6.1. Przygotowanie próbki

- 6.1.1. W probówce wirówki (5.7.) odważyć dokładnie około 0,1 g (m gramów) próbki i dodać 5 ml metanolu (4.1.).
- 6.1.2. Ogrzewać w łaźni wodnej utrzymywanej w temperaturze 50 °C w ciągu 10 minut, następnie umieścić probówkę w łaźni ultradźwiękowej (5.5.), aż do czasu kiedy próbka będzie dokładnie zdyspergowana.
- 6.1.3. Schłodzić, następnie wirować próbkę przy 3500 obrotów/minutę w ciągu pięciu minut.
- 6.1.4. Przenieść ciecz znajdującą się na wierzchu do 25 ml kolby miarowej.
- 6.1.5. Ponownie ekstrahować próbkę dalszymi 5 ml metanolu (4.1.). Połączyć ekstrakty w 25 ml kolbie miarowej.
- 6.1.6. Przenieść pipetą do 25 ml kolby miarowej 2,0 ml bazowego wewnętrznego roztworu mianowanego (4.6.). Uzupełnić objętość metanolem (4.1.) do kreski i wymieszać. Ten roztwór jest używany w etapie oznaczania analizy opisanym w ppkt 6.4.

- 6.2. Chromatografia
- 6.2.1. Przygotować zestaw do wysokosprawnej chromatografii cieczowej (5.2.) w zwykły sposób. Nastawić szybkość przepływu fazy ruchomej (4.4.) na 2,0 ml na minutę.
- 6.2.2. Nastawić długość fali w detektorze w zakresie fal ultrafioletowych (5.2.) na 210 nm.
- 6.3. Krzywa wzorcowa
- 6.3.1. Wprowadzić strzykawką kolejno po 10 µl wszystkich mianowanych roztworów alkoholu benzyłowego (4.7.) i zmierzyć powierzchnie pików alkoholu benzyłowego i 4-etoksyfenolu.
- 6.3.2. Dla każdego roztworu mianowanego alkoholu benzyłowego (4.7.) obliczyć stosunek powierzchni pików alkoholu benzyłowego do powierzchni pików 4-etoksyfenolu. Wykreślić krzywą wzorcową, oznaczając te stosunki na osi rzędnych i odpowiadające im stężenia alkoholu w mg na mililitr na osi odciętych.
- 6.4. Oznaczanie
- 6.4.1. Wprowadzić strzykawką 10 µl roztworu próbki (6.1.6.) i zmierzyć powierzchnie pików alkoholu benzyłowego i 4-etoksyfenolu. Obliczyć stosunek powierzchni pików alkoholu benzyłowego do powierzchni pików 4-etoksyfenolu. Powtórzyć ten proces z dalszymi porcjami po 10 µl roztworów próbki aż do otrzymania zgodnych wyników.
- 6.4.2. Z krzywej wzorcowej (6.3.2.) odczytać stężenie alkoholu benzyłowego odpowiadające stosunkowi powierzchni pików alkoholu benzyłowego do powierzchni pików 4-etoksyfenolu.
7. Obliczanie
- Obliczyć zawartość alkoholu benzyłowego w próbce w procentach masowych, stosując wzór:

$$\% \text{ (m/m) alkoholu benzyłowego} = \frac{c}{400 \times m}$$

w którym:

m – masa w gramach próbki pobranej do analizy (6.1.1.),

c – stężenie alkoholu benzyłowego w roztworze próbki (6.1.6.), w mikrogramach na mililitr, otrzymane z krzywej wzorcowej.

8. Powtarzalność (ISO 5725)
- Dla zawartości alkoholu benzyłowego 1 % (m/m) różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekroczyć 0,10 %.

Identyfikowanie cyrkonu i oznaczanie cyrkonu, glinu i chloru w nieaerozolowych produktach kosmetycznych przeciwpotowych

Przedstawiono pięć procedur analitycznych:

- A. Identyfikowanie cyrkonu.
- B. Oznaczanie cyrkonu.
- C. Oznaczanie glinu.
- D. Oznaczanie chloru.
- E. Obliczenie stosunku atomów glinu do atomów cyrkonu oraz sumy atomów glinu i cyrkonu do atomów chloru.

A. Identyfikowanie cyrkonu

1. Cel i zakres stosowania
Celem metody jest identyfikowanie cyrkonu w nieaerozolowych produktach kosmetycznych przeciwpotowych. Nie usiłowano opisać metod odpowiednich do identyfikowania kompleksu glinowo-cyrkonowo-chlorowo-wodorotlenowego $[Al_xZr(OH)_yCl \cdot nH_2O]$.

2. Z a s a d a
Cyrkon identyfikuje się dzięki tworzeniu z czerwienią alizarynową S charakterystycznego czerwono-fioletowego osadu w środowisku silnie kwaśnym.
3. O d c z y n n i k i
Wszystkie odczynniki muszą być czystości analitycznej.
 - 3.1. Kwas chlorowodorowy stężony, $d_{20} = 1,18$ g/ml.
 - 3.2. Czerwień alizarynowa S (CI 58005); 2 % (m/v) wodny roztwór soli sodowej kwasu alizarynosulfonowego.
4. A p a r a t u r a
 - 4.1. Zwykły sprzęt laboratoryjny.
5. P r o c e d u r a
 - 5.1. Do około 1 g próbki w probówce dodać 2 ml wody. Zamknąć probówkę i wytrząsnąć.
 - 5.2. Dodać trzy krople czerwieni alizarynowej S (3.2.) i następnie 2 ml stężonego kwasu chlorowodorowego (3.1.), zamknąć i wytrząsnąć.
 - 5.3. Pozostawić do odstania na około dwie minuty.
 - 5.4. Czerwono-fioletowe zabarwienie znajdującej się w warstwie wierzchniej cieczy oraz osadu wskazuje na obecność cyrkonu.

B. Oznaczenie cyrkonu

1. C e l i z a k r e s s t o s o w a n i a
Metoda jest odpowiednia do oznaczania cyrkonu w kompleksach glinowo-cyrkonowo-chlorkowo-wodorotlenowych do maksymalnego stężenia 7,5 % (m/m) cyrkonu w nieaerozolowych środkach przeciwpotowych.
2. Z a s a d a
Cyrkon ekstrahuje się z produktu w kwaśnym środowisku i oznacza metodą płomieniowej absorpcyjnej spektrometrii atomowej.
3. O d c z y n n i k i
Wszystkie odczynniki muszą być czystości analitycznej.
 - 3.1. Kwas chlorowodorowy stężony, $d_{20} = 1,18$ g/ml.
 - 3.2. Kwas chlorowodorowy, roztwór 10 % (v/v): do 500 ml wody w zlewce dodać 100 ml stężonego kwasu chlorowodorowego (3.1.), dokładnie wymieszać. Przenieść roztwór do jednolitrowej kolby miarowej i uzupełnić wodą do kreski.
 - 3.3. Bazowy mianowany roztwór cyrkonu zawierający 1000 µg/ml w 0,5 M roztworze kwasu chlorowodorowego („SpectrosoL” lub równoważny).
 - 3.4. Heksahydrat chlorku glinu [$\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$]: odczynnik; rozpuścić 22,6 g 6-hydratu chlorku glinu w 250 ml 10 % (v/v) roztworu kwasu chlorowodorowego (3.2.).
 - 3.5. Odczynnik chlorku amonu: rozpuścić 5,0 g chlorku amonu w 250 ml 10 % (v/v) roztworu kwasu chlorowodorowego (3.2.).
4. A p a r a t u r a
 - 4.1. Zwykły sprzęt laboratoryjny.
 - 4.2. Mieszadło magnetyczne z ogrzewaniem.
 - 4.3. Bibuła filtracyjna (Whatman nr 41 lub równoważna).
 - 4.4. Spektrofotometr absorpcji atomowej wyposażony w lampę z katodą wnątkową do oznaczania cyrkonu.
5. P r o c e d u r a
 - 5.1. P r z y g o t o w a n i e p r ó b k i.
 - 5.1.1. Odważyć dokładnie około 1,0 g (m gramów) jednorodnej próbki produktu w 150 ml zlewce. Dodać 40 ml wody i 10 ml stężonego kwasu chlorowodorowego (3.1.).

- 5.1.2. Umieścić zlewkę w mieszadle magnetycznym z ogrzewaniem (4.2.). Rozpocząć mieszanie i ogrzewać do wrzenia. Umieścić szkiełko zegarkowe na zlewce, aby zapobiec szybkiemu odparowywaniu. Ogrzewać do wrzenia w ciągu pięciu minut, zdjąć zlewkę z mieszadła i schłodzić do temperatury pokojowej.
- 5.1.3. Przesączyć zawartość zlewki przez bibułę filtracyjną (4.3.) do 100 ml kolby miarowej. Przepłukać zlewkę dwoma 10 ml porcjami wody i po przesączeniu dodać przemywki do kolby miarowej. Uzpełnić objętość wodą do kreski i wymieszać. Tego roztworu używa się również do oznaczania glinu (dział C).
- 5.1.4. Przenieść pipetą 20,00 ml roztworu próbki (5.1.3.), 5,00 ml odczynnika chłorku glinu (3.4.) i 5,00 ml odczynnika chłorku amonu (3.5.) do 50 ml kolby miarowej. Uzpełnić objętość 10 % (v/v) roztworem kwasu chlorowodorowego (3.2.) do kreski i wymieszać.
- 5.2. Warunki analizy metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej:
płomień: podtlenek azotu/acetylen
długość fali: 360,1 nm
korekcja tła: nie stosuje się
własności płomienia: bogaty, dla uzyskania maksymalnej absorpcji konieczna będzie optymalizacja wysokości palnika i warunków spalania.
- 5.3. Krzywa wzorcowa
- 5.3.1. Przenieść pipetą po 5,00, 10,00, 15,00, 20,00 i 25,00 ml bazowego roztworu mianowanego cyrkonu (3.3.) do serii 50 ml kolb miarowych. Do wszystkich kolb miarowych dodać pipetą po 5,00 ml odczynnika chłorku glinu (3.4.) i 5,00 ml odczynnika chłorku amonu (3.5.). Uzpełnić objętość 10 % (v/v) roztworem kwasu chlorowodorowego (3.2.) do kreski i wymieszać. Roztwory te zawierają odpowiednio po 100, 200, 300, 400 i 500 µg cyrkonu w mililitrze. Podobnie przygotować roztwór ślepej próby niezawierający mianowanego roztworu cyrkonu.
- 5.3.2. Zmierzyć absorbancję roztworu ślepej próby (5.3.1.) i stosować uzyskaną wartość jako odpowiadającą zerowemu stężeniu cyrkonu dla krzywej wzorcowej. Zmierzyć absorbancję wszystkich mianowanych roztworów cyrkonu (5.3.1.). Wykreślić krzywą wzorcową odpowiadającą stosunkom wartości absorbancji do stężenia cyrkonu.
- 5.4. Oznaczanie
Zmierzyć absorbancję roztworu próbki (5.1.4.). Z krzywej odwzorowania odczytać stężenie cyrkonu odpowiadające wartości absorbancji otrzymanej dla roztworu próbki.
6. Obliczenie
Obliczyć zawartość cyrkonu w próbce w procentach masowych, stosując wzór:

$$\% \text{ (m/m) cyrkonu} = \frac{c}{40 \times m}$$

w którym:

m – masa w gramach próbki pobranej do analizy (5.1.1.),

c – stężenie cyrkonu w roztworze próbki (5.1.4.), w mikrogramach na milimetr, otrzymane z krzywej wzorcowej.

7. **Powtarzalność (ISO 5725)**
Dla zawartości cyrkonu 3,0 % (m/m) różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać 0,10 % (m/m).
8. **U w a g a**
Dozwolone jest zastosowanie metody plazmy sprzężonej indukcyjnie – emisyjnej spektrometrii atomowej, jako metody alternatywnej w stosunku do płomieniowej absorpcyjnej spektrometrii atomowej.

C. Oznaczanie glinu

1. **Cel i zakres stosowania**
Celem metody jest oznaczanie glinu znajdującego się w kompleksach glinowo-cyrkonowo-chlorkowo-wodorotlenowych do maksymalnego stężenia 12 % (m/m) glinu w nieaerozolowych środkach przeciwopotowych.
2. **Z a s a d a**
Glin ekstrahuje się z produktu w środowisku kwaśnym i oznacza metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej.
3. **O d e c z y n n i k i**
Wszystkie odczynniki muszą być czystości analitycznej.
 - 3.1. Kwas chlorowodorowy stężony, $d_{20} = 1,18$ g/ml.
 - 3.2. Kwas chlorowodorowy, 1% (v/v): do 50 ml wody w zlewce dodać 10 ml stężonego kwasu chlorowodorowego (3.1.), dokładnie wymieszać. Przenieść roztwór do jednolitrowej kolby miarowej i uzupełnić objętość wodą do kreski.
 - 3.3. Bazowy mianowany roztwór glinu zawierający 1000 $\mu\text{g/ml}$ w 0,5 M roztworze kwasu azotowego (V) („SpectrosoL” lub równoważny).
 - 3.4. Odczynnik chlorku potasu: rozpuścić 10,0 g chlorku potasu w 250 ml 1 % (v/v) roztworu kwasu chlorowodorowego (3.2.).
4. **A p a r a t u r a**
 - 4.1. Zwykły sprzęt laboratoryjny.
 - 4.2. Spektrometr absorpcji atomowej wyposażony w lampę z katodą wnątkową do oznaczania glinu.
5. **P r o c e d u r a**
 - 5.1. **Przygotowanie próbki.**
Do oznaczania zawartości glinu używa się roztworu przygotowanego w dziale B.5.1.3.
 - 5.1.1. Przenieść pipetą 5,00 ml roztworu próbki (B.5.1.3.) i 10,00 ml odczynnika chlorku potasu (3.4.) do 100 ml kolby miarowej. Uzupełnić objętość 1 % (v/v) roztworem kwasu chlorowodorowego (3.2.) do kreski i wymieszać.
 - 5.2. **Warunki analizy metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej:**
płomień: podtlenek azotu/acetylen
długość fali: 309,3
korekcja tła: nie stosuje się
własności płomienia: bogaty, dla uzyskania maksymalnej absorpcji konieczna jest optymalizacja wysokości palnika i warunków spalania.
 - 5.3. **Krzywa wzorcowa**
 - 5.3.1. Przenieść pipetą po 1,00, 2,00, 3,00, 4,00 i 5,00 ml bazowego mianowanego roztworu glinu (3.3.) do serii 100 ml kolb miarowych. Do wszystkich kolb miarowych przenieść pipetą po 1,00 ml odczynnika chlorku potasu (3.4.) i uzupełnić objętość 1 % (v/v) roztworem kwasu chlorowodorowego (3.2.) i wymieszać. Te roztwory zawierają po 10, 20, 30, 40 i 50 μg glinu w mililitrze. Podobnie przygotować roztwór ślepej próby niezawierający roztworu mianowanego glinu.

- 5.3.2. Zmierzyć absorbancję roztworu ślepej próby (5.3.1.) i stosować uzyskaną wartość jako odpowiadającą zerowemu stężeniu glinu dla krzywej wzorcowej. Zmierzyć absorbancję wszystkich mianowanych roztworów glinu do kalibrowania. Wykreślić krzywą wzorcową odpowiadającą stosunkom wartości absorbancji do zawartości glinu.
- 5.4. **Oznaczenie**
Zmierzyć absorbancję roztworu próbki (5.1.1.) Z krzywej wzorcowej odczytać stężenie glinu odpowiadające wartości absorbancji otrzymanej dla roztworu próbki.
6. **Obliczenie**
Obliczyć zawartość glinu w próbce w procentach masowych, stosując wzór:

$$\% \text{ (m/m) glinu} = \frac{c}{5 \times m}$$

w którym:

m – masa w gramach próbki pobranej do analizy (B.5.1.1.),

c – stężenie glinu w roztworze próbki (5.1.1.), w mikrogramach na mililitr, otrzymane z krzywej wzorcowej.

7. **Powtarzalność (ISO 5725)**
Dla zawartości glinu 3,5 % (m/m) różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać 0,10 % (m/m).
8. **Uwaga**
Dozwolone jest zastosowanie metody plazmy sprzężonej indukcyjnie – emisyjnej spektrometrii atomowej, jako metody alternatywnej w stosunku do płomieniowej absorpcyjnej spektrometrii atomowej.

D. Oznaczanie chloru

1. **Cel i zakres stosowania**
Celem metody jest oznaczanie chloru obecnego w postaci jonu chlorkowego w kompleksie glinowo-cyrkonowo-wodorotlenowym w nieacrozolowych środkach przeciwopotowych.
2. **Zasada**
Jon chlorkowy w produkcie oznacza się przez miareczkowanie potencjometryczne mianowanym roztworem azotanu (V) srebra.
3. **Odczynniki**
Wszystkie odczynniki muszą być czystości analitycznej.
- 3.1. Kwas azotowy (V) stężony, $d_{20} = 1,42$ g/ml.
- 3.2. Kwas azotowy (V), 5 % (v/v) roztwór: do 250 ml wody w zlewce dodać 25 ml stężonego kwasu azotowego (V) (3.1.), starannie wymieszać. Przenieść ten roztwór do 500 ml kolby miarowej, uzupełnić wodą do kreski.
- 3.3. Aceton.
- 3.4. Azotan (V) srebra, 0,1 M roztwór mianowany („AnalaR” lub równoważny).

4. Aparatura
 - 4.1. Zwykły sprzęt laboratoryjny.
 - 4.2. Mieszadło magnetyczne z ogrzewaniem.
 - 4.3. Elektroda srebrna.
 - 4.4. Kalomelowa elektroda odniesienia.
 - 4.5. Miernik pH/miliwolt odpowiedni do miareczkowania potencjometrycznego.
5. Procedura
 - 5.1. Przygotowanie próbki
 - 5.1.1. W 250 ml zlewce odważyć dokładnie około 1,0 g (m gramów) jednorodnej próbki produktu. Dodać 80 ml wody i 20 ml 5 % (v/v) roztworu kwasu azotowego (V) (3.2.).
 - 5.1.2. Umieścić zlewkę na ogrzewanym mieszadle magnetycznym (4.2.). Rozpocząć mieszanie i ogrzewać do wrzenia. Aby zapobiec szybkiemu odparowywaniu, przykryć zlewkę szkiełkiem zegarkowym. Ogrzewać do wrzenia w ciągu pięciu minut, zdjęć zlewkę i schłodzić do temperatury pokojowej.
 - 5.1.3. Dodać 10 ml acetonu (3.3.), zanurzyć elektrody (4.3. i 4.4.) i rozpocząć mieszanie.
Miareczkować potencjometrycznie 0,1 M roztworem azotanu (V) srebra (3.4.) i wykreślić krzywą różniczkową do oznaczania punktu końcowego (V ml).
6. Obliczenie
Obliczyć zawartość chloru w próbce w procentach masowych, stosując wzór:

$$\% \text{ (m/m) chloru} = \frac{0,3545 \times V}{m}$$

w którym:

m – masa próbki pobranej do analizy (5.1.1.) w gramach,

V – objętość 0,1 M roztworu azotanu (V) srebra, w mililitrach, zużyta do miareczkowania w punkcie końcowym (5.1.3.).

7. Powtarzalność (ISO 5725)
Dla zawartości chloru 4 % (m/m) różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać 0,10 % (m/m).

E. Obliczenie stosunku atomów glinu do atomów cyrkonu oraz sumy atomów glinu i cyrkonu do atomów chloru

1. Obliczenie stosunku atomów glinu do atomów cyrkonu
Obliczyć stosunek Al : Zr, stosując wzór:

$$\text{stosunek Al : Zr} = \frac{\text{Al}\%(\text{m/m}) \times 91,22}{\text{Zr}\%(\text{m/m}) \times 26,98}$$

2. Obliczenie stosunku sumy atomów glinu i cyrkonu do atomów chloru
Obliczyć stosunek (Al + Zr) : Cl, stosując wzór:

$$\text{stosunek (Al + Zr) : Cl} = \frac{\frac{\text{Al}\%(\text{m/m})}{26,98} + \frac{\text{Zr}\%(\text{m/m})}{91,22}}{\text{Cl}\%(\text{m/m})} \times 35,45$$

Identyfikowanie i oznaczanie heksamidyny, dibromoheksamidyny, dibromopropamidyny i chloroheksydyny

1. Cel i zakres stosowania
Celem metody jest jakościowe i ilościowe oznaczanie:
 - heksamidyny i jej soli, łącznie z izetionianem i 4-hydroksybenzoesanem,
 - dibromoheksamidyny i jej soli, łącznie z izetionianem,
 - dibromopropamidyny i jej soli, łącznie z izetionianem,
 - dioctanu, diglukonianu i dichlorowodorku chloroheksydyny w produktach kosmetycznych.
2. Definicja
Stężenia heksamidyny, dibromoheksamidyny, dibromopropamidyny i chloroheksydyny oznaczone tą metodą są wyrażone jako procent masowy (% m/m).
3. Zasada
Identyfikowanie i oznaczanie wykonuje się metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) na fazie odwróconej, jonów dwubiegowych z następną detekcją spektrofotometryczną w zakresie nadfioletu. Heksamidynę, dibromoheksamidynę, dibromopropamidynę i chloroheksydynę identyfikuje się na podstawie ich czasów retencji po rozdziale na kolumnie chromatograficznej.
4. Odczynniki
Wszystkie odczynniki muszą być czystości analitycznej i, tam gdzie to konieczne, odpowiadać HPLC.
 - 4.1. Metanol.
 - 4.2. Monohydrat heptano-1-sulfonianu sodu.
 - 4.3. Kwas octowy lodowaty, $d_{20} = 1,05$ g/ml.
 - 4.4. Chlorek sodowy.
 - 4.5. Fazy ruchome.
 - 4.5.1. Rozpuszczalnik I: 0,005 M roztwór monohydratu heptano-1-sulfonianu sodu (4.2.) w metanolu doprowadzony do pH 3,5 za pomocą kwasu octowego lodowatego (4.3.).
 - 4.5.2. Rozpuszczalnik II: 0,005 M roztwór monohydratu heptano-1-sulfonianu sodu (4.2.) w wodzie doprowadzony do pH 3,5 za pomocą kwasu octowego lodowatego (4.3.).
 - 4.5.3. *Uwaga:* Jeśli konieczne jest poprawienie kształtu pików, można zmodyfikować fazy ruchome i przygotować je następująco:
 - rozpuszczalnik I: rozpuścić 5,84 g chlorku sodowego (4.4.) i 1,1013 g monohydratu heptano-1-sulfonianu sodu (4.2.) w 100 ml wody, dodać 900 ml metanolu (4.1.) i nastawić na pH 3,5 kwasem octowym lodowatym (4.3.).
 - rozpuszczalnik II: rozpuścić 5,84 g chlorku sodowego (4.4.) i 1,1013 g monohydratu heptano-1-sulfonianu sodu (4.2.) w jednym litrze wody i nastawić na pH 3,5 kwasem octowym lodowatym (4.3.).
 - 4.6. Diizetionan heksamidyny $[C_{20}H_{24}N_4O_2 \cdot 2C_2H_6O_4S]$.
 - 4.7. Diizetionian dibromoheksamidyny $[C_{20}H_{24}Br_2N_4O_2 \cdot 2C_2H_4O_4S]$.
 - 4.8. Diizetionian dibromopropamidyny $[C_{17}H_{18}Br_2N_4O_2 \cdot 2C_2H_6O_4S]$.
 - 4.9. Dioctan chloroheksydyny $[C_{22}H_{30}Cl_2N_{10} \cdot 2C_2H_4O_2]$.
 - 4.10. Roztwory odniesienia: przygotować 0,05 % (m/v) roztwory wszystkich czterech środków konserwujących (4.6–4.9) w rozpuszczalniku I (4.5.1.).
 - 4.11. 3,4,4' - trichlorokarbanilid (triclocarban).
 - 4.12. 4,4' - dichloro-3-(trifluorometylo) karbanilid (halocarban).

5. Aparatura
- 5.1. Zwykły sprzęt laboratoryjny.
- 5.2. Wysokosprawny chromatograf cieczowy z detektorem w zakresie promieniowania nadfioletowego o zmiennej długości fali.
- 5.3. Kolumna analityczna: stal kwasoodporna, długość 30 cm, średnica wewnętrzna 4 μm , z wypełnieniem μ -Bondapak C₁₈, 10 μm lub równoważnym.
- 5.4. Łaźnia ultradźwiękowa.
6. Identyfikowanie
- 6.1. Przygotowanie próbki.
Odważyć około 0,5 g próbki w 10 ml kolbie miarowej i uzupełnić objętość do kreski rozpuszczalnikiem I (4.5.1.). Umieścić kolbę w łaźni ultradźwiękowej (5.4.) na 10 minut. Przesączyć lub odwirować roztwór. Zebrać przesącz lub ciecz znajdującą się na wierzchu do analizy chromatograficznej.
- 6.2. Chromatografia
- 6.2.1. Gradientowy przepływ fazy ruchomej

Czas (min)	Rozpuszczalnik I (4.5.1.) (% v/v)	Rozpuszczalnik II (4.5.2.) (% v/v)
0	50	50
15	65	35
30	65	35
45	50	50

- 6.2.2. Nastawić szybkość przepływu fazy ruchomej (6.2.1.) na 1,5 ml/min, a temperaturę kolumny na 35 °C.
- 6.2.3. Nastawić długość fali detektora na 264 nm.
- 6.2.4. Wprowadzić strzykawką po 10 μl wszystkich roztworów odniesienia (4.10.) i zarejestrować ich chromatogramy.
- 6.2.5. Wprowadzić strzykawką 10 μl roztworu próbki (6.1.) i zarejestrować jego chromatogram.
- 6.3. Zidentyfikować, czy w próbce znajduje się heksamidyna, dibromoheksamidyna, dibromopropamidyna lub chloroheksydyna przez porównanie czasu retencji pików zarejestrowanych w ppkt 6.2.5. z czasami retencji otrzymanymi dla roztworów odniesienia w ppkt 6.2.4.
7. Oznaczanie
- 7.1. Oznaczanie
Przygotowanie roztworów odniesienia. Jako wzorzec wewnętrzny zastosować jeden ze środków konserwujących (4.6.-4.9.) nieznajdujący się w próbce. Jeśli nie jest to możliwe, można użyć triclocarbanu (4.11.) lub halocarbanu (4.12.).
- 7.1.1. Bazowy 0,05 % (m/v) roztwór środka konserwującego zidentyfikowanego w ppkt 6.3. w rozpuszczalniku I.
- 7.1.2. Bazowy 0,05 % (m/v) roztwór środka konserwującego wybranego jako wzorzec wewnętrzny w rozpuszczalniku I.
- 7.1.3. Przygotować cztery mianowane roztwory dla wszystkich zidentyfikowanych środków konserwujących poprzez przeniesienie do serii 10 ml kolb miarowych objętości roztworów bazowych zidentyfikowanych środków konserwujących (7.1.1.) i odpowiednich objętości bazowego wewnętrznego roztworu mianowanego (7.1.2.) zgodnie z poniższą tabelą. Uzupełnić objętość we wszystkich kolbach rozpuszczalnikiem (4.5.1.) do kreski i wymieszać.

7.1.4.

Mianowany roztwór	Bazowy wewnętrzny roztwór mianowany	Bazowy roztwór zidentyfikowanego środka konserwującego	
	ilość dodanych ml (7.1.2.)	ilość dodanych ml (7.1.1.)	μl/ml*
I	1,0	0,5	25
II	1,0	1,0	50
III	1,0	1,5	75
IV	1,0	2,0	100

* Wartości te podano jako wskazówkę i odpowiadają one stężeniom zidentyfikowanych środków konserwujących w roztworach mianowanych przygotowanych z użyciem roztworu bazowego, który zawiera dokładnie 0,05 % zidentyfikowanego środka konserwującego.

7.2. Przygotowanie próbki

7.2.1. W 10 ml kolbie miarowej odważyć dokładnie około 0,5 g (p gramów) próbki, dodać 1,0 ml wewnętrznego roztworu mianowanego (7.1.2.) i 6 ml rozpuszczalnika I (4.5.1.) i wymieszać.

7.2.2. Umieścić kolbę w łaźni naddźwiękowej (5.4.) na 10 minut. Schłodzić. Uzupełnić objętość rozpuszczalnikiem I do kreski i wymieszać. Odwirować lub przesączyć przez karbowany sącdek z bibuły filtracyjnej. Zebrać ciecz znajdującą się na wierzchu lub przesączyć, zależnie od stosowanego sposobu analizy chromatograficznej.

7.3. Chromatografia

7.3.1. Nastawić gradient fazy ruchomej, szybkość przepływu fazy ruchomej, temperaturę kolumny i długość fali w detektorze UV w aparaturze HPLC (5.2.) na warunki takie, jakie są wymagane na etapie identyfikowania (6.2.1 do 6.2.3.).

7.3.2. Wprowadzić strzykawką 10 μl roztworu próbki (7.2.2.) i zmierzyć powierzchnię pików. Powtórzyć ten proces z dalszymi 10 μl porcjami roztworu próbki aż do uzyskania zgodnych wyników. Obliczyć stosunek powierzchni pików odpowiadającego analizowanemu związkowi do powierzchni pików odpowiadającego wzorcowi wewnętrznemu.

7.4. Krzywa wzorcowa

7.4.1. Wprowadzić strzykawką po 10 μl roztworów mianowanych (7.1.3.) i zmierzyć powierzchnię pików.

7.4.2. Dla każdego roztworu mianowanego (7.1.3.) obliczyć stosunek powierzchni pików heksamidyny, dibromoheksamidyny, dibromopropamidyny lub chloroheksydyny do powierzchni pików wzorca wewnętrznego. Wykreślić krzywą wzorcową, oznaczając te stosunki na osi rzędnych i odpowiednie stężenia zidentyfikowanych środków konserwujących w roztworach mianowanych, w mikrogramach na mililitr, na osi odciętych.

7.4.3. Z krzywej wzorcowej (7.4.2.) odczytać stężenie zidentyfikowanego środka konserwującego odpowiadające stosunkowi powierzchni pików obliczonemu w ppkt 7.3.2.

8. Obliczenie
- 8.1. Obliczyć zawartość heksamidyny, dibromoheksamidyny, dibromopropamidyny lub chloroheksydyny w próbce w procentach masowych, stosując wzór:

$$\%(\text{m/m}) = \frac{c}{1000 \times p} \times \frac{MW_1}{MW_2}$$

w którym:

- p – masa próbki pobranej do analizy, w gramach (7.2.1.),
- c – stężenie środka konserwującego w roztworze próbki, w mikrogramach na mililitr, otrzymane z krzywej wzorcowej,
- MW₁ – ciężar cząsteczkowy podstawowej formy obecnego środka konserwującego,
- MW₂ – ciężar cząsteczkowy odpowiedniej soli (patrz pkt 10).
9. Powtarzalność (ISO 5725)
- Dla stężenia heksamidyny, dibromoheksamidyny, dibromopropamidyny lub chloroheksydyny 0,1 % (m/m) różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać 0,005 %.
10. Tablica ciężarów cząsteczkowych

Hexamidine	C ₂₀ H ₂₆ N ₄ O ₂	354,45
Hexamidine diisethionate	C ₂₀ H ₂₆ N ₄ O ₂ · 2C ₂ H ₆ O ₄ S	606,72
Hexamidine di-p-hydroxybenzoate	C ₂₀ H ₂₆ N ₄ O ₂ · 2C ₇ H ₆ O ₃	630,71
Dibromohexamidine	C ₂₀ H ₂₄ Br ₂ N ₄ O ₂	512,24
Dibromohexamidine diisethionate	C ₂₀ H ₂₄ Br ₂ N ₄ O ₂ · 2C ₂ H ₆ O ₄ S	764,51
Dibromopropamidine	C ₁₇ H ₁₈ Br ₂ N ₄ O ₂	470,18
Dibromopropamidine diisethionate	C ₁₇ H ₁₈ Br ₂ N ₄ O ₂ · 2C ₂ H ₆ O ₄ S	722,43
Chlorhexidine	C ₂₂ H ₃₀ Cl ₂ N ₁₀	505,45
Chlorhexidine diacetate	C ₂₂ H ₃₀ Cl ₂ N ₁₀ · 2C ₂ H ₄ O ₂	625,56
Chlorhexidine digluconate	C ₂₂ H ₃₀ Cl ₂ N ₁₀ · 2C ₆ H ₁₂ O ₇	897,76
Chlorhexidine dihydrochloride	C ₂₂ H ₃₀ Cl ₂ N ₁₀ · 2HCl	578,37

Identyfikowanie i oznaczanie kwasu benzooesowego, kwasu 4-hydroksybenzooesowego, kwasu sorbowego, kwasu salicylowego i kwasu propionowego w produktach kosmetycznych

1. Cel i zakres zastosowania
- Metoda jest stosowana do identyfikowania i oznaczania kwasu benzooesowego, kwasu 4-hydroksybenzooesowego, kwasu sorbowego, kwasu salicylowego i kwasu propionowego w produktach kosmetycznych; oddzielne procedury dotyczą identyfikowania tych środków konserwujących; podano procedury oznaczania kwasu propionowego i oznaczania kwasu 4-hydroksybenzooesowego, kwasu salicylowego, kwasu sorbowego i kwasu benzooesowego.
2. Definicja
- Ilości kwasu benzooesowego, kwasu 4-hydroksybenzooesowego, kwasu salicylowego, kwasu sorbowego i kwasu propionowego oznaczone tą metodą są wyrażone w procentach masowych wolnych kwasów.

A. Identyfikowanie

1. Zasada
- Ekstrakt otrzymany przez kwasowo/zasadową ekstrakcję środków konserwujących analizuje się metodą chromatografii cienkowarstwowej (TLC), w ciągu jednego dnia po otrzymaniu pochodnej. Zależnie od wyników, identyfikacja zostaje potwierdzona metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) lub w przypadku kwasu propionowego metodą chromatografii gazowej (GC).

2. Odczynniki
 - 2.1. Zasada ogólna
Wszystkie odczynniki muszą być czystości analitycznej. Używana woda musi być wodą destylowaną lub wodą o co najmniej równoważnej czystości.
 - 2.2. Aceton
 - 2.3. Eter dietylowy
 - 2.4. Acetonitryl
 - 2.5. Toluen
 - 2.6. n-Heksan
 - 2.7. Ciekła parafina
 - 2.8. Kwas chlorowodorowy, 4 M roztwór
 - 2.9. Wodorotlenek potasu, 4 M roztwór wodny
 - 2.10. Dihydrat chlorku wapnia, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
 - 2.11. Węglan litu, Li_2CO_3
 - 2.12. 2-bromo-2'-acetylnaftalen
 - 2.13. Kwas 4-hydroksybenzoesowy
 - 2.14. Kwas salicylowy
 - 2.15. Kwas benzoesowy
 - 2.16. Kwas sorbowy
 - 2.17. Kwas propionowy
 - 2.18. Roztwory odniesienia
Przygotować 0,1 % (m/v) roztwory (100 mg/100 ml) wszystkich pięciu środków konserwujących (2.13.–2.17.) w eterze dietylowym
 - 2.19. Odczynnik do otrzymywania pochodnych
0,5 % (m/v) roztwór 2-bromo-2'-acetylnaftalenu (2.12.) w acetonitrylu (2.4.) (50 mg/10 ml). Roztwór ten powinien być przygotowywany co tydzień i przechowywany w lodówce
 - 2.20. Roztwór katalizatora
0,3 % (m/v) roztwór węglanu litu (2.11.) w wodzie (300 mg/100 ml). Roztwór powinien być świeżo przygotowany
 - 2.21. Rozpuszczalnik rozwijający
Toluen (2.5.)/aceton (2.2.) (20:0,5, v/v)
 - 2.22. Ciekła parafina (2.7.)/n-heksan (2.6.) (1:2, v/v).
3. Aparatura
Zwykły sprzęt laboratoryjny
 - 3.1. Łaźnia wodna, z możliwością utrzymania temperatury 60 °C
 - 3.2. Komora do rozwijania chromatogramu
 - 3.3. Źródło światła ultrafioletowego, 254 i 366 nm
 - 3.4. Płytki cienkowarstwowe, Kieselgel 60, bez wskaźnika fluorescencji, 20 x 20 cm, grubość warstwy 0,25 mm ze strefą nanoszenia 2,5 x 20 cm (Merck 11845 lub równoważne)
 - 3.5. Mikrostrzykawka, 10 μl
 - 3.6. Mikrostrzykawka, 25 μl
 - 3.7. Suszarka z możliwością utrzymania temperatury do 105 °C
 - 3.8. 50 ml szklane próbki z gwintowanym korkiem
 - 3.9. Bibuła filtracyjna, średnica 90 mm (Schleicher & Schuli, Weissband nr 5892 lub równoważna)
 - 3.10. Uniwersalny papierek wskaźnikowy pH = 1-11
 - 3.11. 5 ml szklane fiołki na próbki
 - 3.12. Rotacyjna wyparka warstewkowa (Rotavapor lub równoważna)
 - 3.13. Ogrzewana płytka.

4. Procedura

4.1. Przygotowanie próbki

W 50 ml szklanej probówce z gwintowanym korkiem (3.8.) odważyć około 1 g próbki. Dodać cztery krople 4 M kwasu chlorowodorowego (2.8.) i 40 ml acetonu (2.2.). W przypadku silnie alkalicznych wyrobów, takich jak mydło toaletowe, należy dodać 20 kropli 4 M kwasu chlorowodorowego. Papierkiem wskaźnikowym (3.10.) sprawdzić, czy pH wynosi około 2. Zamknąć probówkę i wytrząsać energicznie w ciągu jednej minuty.

Jeśli konieczne jest ułatwienie ekstrakcji środka konserwującego do fazy acetonowej, należy ogrzewać łagodnie mieszaninę do około 60 °C do stopienia fazy ciekłej.

Schłodzić roztwór do temperatury pokojowej i przesączyć przez bibułę filtracyjną (3.9.) do kolby stożkowej. Przenieść 20 ml przesączu do 200 ml kolby stożkowej, dodać 20 ml wody i wymieszać. Doprowadzić odczyn mieszaniny do pH około 10 za pomocą wodorotlenku potasu 4 M (2.9.), używając papierka wskaźnikowego (3.10.) do oznaczenia pH.

Dodać 1 g chlorku wapnia (2.10.) i energicznie wytrząsnąć. Przesączyć przez bibułę filtracyjną (3.9.) do 250 ml rozdzielacza zawierającego 75 ml eteru dietylowego (2.3.) i wytrząsać energicznie przez jedną minutę. Pozostawić do rozdzielenia i przenieść warstwę wodną do 250 ml kolby stożkowej. Odrzucić warstwę eterową. Używając papierka wskaźnikowego (3.10.), doprowadzić odczyn 4 M kwasem chlorowodorowym (2.8.) do pH około 2. Dodać 10 ml eteru dietylowego (2.3.), zamknąć kolbę i wytrząsać energicznie przez jedną minutę, pozostawić do rozdzielenia i przenieść warstwę eterową do rotacyjnej wyparki warstewkowej (3.12.). Odrzucić warstwę wodną.

Odparować warstwę eterową prawie do sucha i ponownie rozpuścić pozostałość w 1 ml eteru dietylowego (2.3.). Przenieść roztwór do fiolki na próbkę (3.11.).

4.2. Chromatografia cienkowarstwowa

Dla wszystkich roztworów odniesienia i próbek analizowanych chromatograficznie nanieść strzykawką (3.5.) po około 3 µl węglanu litu (2.20.) w równych odległościach na linii początkowej w strefie nanoszenia płytki do chromatografii cienkowarstwowej (3.4.) i wysuszyć w strumieniu zimnego powietrza.

Umieścić płytkę cienkowarstwową na ogrzewanej płytce (3.13.) podgrzanej do 40 °C dla otrzymania możliwie najmniejszych plam. Nanieść mikrostrzykawką (3.5.) po 1 µl wszystkich roztworów odniesienia (2.18.) i roztworu próbki (4.1.) na linii początkowej płytki, dokładnie w miejscach plam, w których naniesiono roztwór węglanu litu.

Nanieść ponownie po około 15 µl odczynnika do otrzymywania pochodnych (2.19.) (roztworu 2-bromo-2'-acetylonafalenu), dokładnie w miejscach plam, w których naniesione były roztwory odniesienia i próbki oraz roztwór węglanu litu.

Ogrzewać płytkę do chromatografii cienkowarstwowej w suszarce (3.7.) w 80 °C w ciągu 45 minut. Po schłodzeniu rozwijać płytkę w komorze (3.2.), którą doprowadzono do stanu równowagi w ciągu 15 minut (bez wyłożenia wnętrza bibułą filtracyjną), używając rozpuszczalnika rozwijającego 2.21. (toluen/aceton), aż do osiągnięcia przez czoło rozpuszczalnika odległości 15 cm (może trwać to około 80 minut).

Wysuszyć płytkę w strumieniu zimnego powietrza i oceniać otrzymane plamy w świetle UV (3.3.). Dla wzmocnienia fluorescencji słabo widocznych plam można zamoczyć płytkę do chromatografii cienkowarstwowej w mieszaninie ciekła parafina/n-heksan (2.22.).

5. **Identyfikacja**
Obliczyć współczynnik R_f dla wszystkich plam. Porównać wartość R_f i zachowanie próbki pod wpływem promieniowania UV z wartościami otrzymanymi dla roztworów odniesienia. Sformułować wstępny wniosek o obecności i zidentyfikowaniu środka konserwującego znajdującego się w próbce. Przeprowadzić analizę metodą HPLC opisaną w dziale B lub, jeśli podejrzewana jest obecność w próbce kwasu propionowego, analizę metodą GC opisaną w dziale C. Porównać czasy retencji z czasami otrzymanymi dla roztworów odniesienia.
Podsumować wyniki otrzymane metodami TLC i HPLC lub GC oraz potwierdzić ostateczną identyfikację środków konserwujących znajdujących się w próbce na podstawie otrzymanych wyników.

B. Oznaczanie kwasu benzoowego, kwasu 4-hydroksybenzoowego, kwasu sorbowego i kwasu salicylowego

1. **Zasada**
Próbkę po zakwaszeniu ekstrahuje się mieszaniną alkoholu etylowego i wody. Po przesączeniu środki konserwujące oznacza się metodą wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC).
2. **Odczynniki**
- 2.1. Wszystkie odczynniki muszą być czystości analitycznej i, jeśli potrzeba, odpowiednie do HPLC. Używana woda musi być wodą destylowaną lub o co najmniej równoważnej czystości
 - 2.2. Alkohol etylowy absolutny
 - 2.3. Kwas 4-hydroksybenzoowy
 - 2.4. Kwas salicylowy
 - 2.5. Kwas benzoowy
 - 2.6. Kwas sorbowy
 - 2.7. Octan sodu ($\text{CH}_3\text{COONa} \times 3 \text{H}_2\text{O}$)
 - 2.8. Kwas octowy, $d_4^{20}=1,05 \text{ g/ml}$
 - 2.9. Acetonitryl
 - 2.10. Kwas siarkowy (VI), 2 M
 - 2.11. Wodorotlenek potasu, 0,2 M roztwór wodny
 - 2.12. Kwas 2-metoksybenzoowy
 - 2.13. Mieszanina alkohol etylowy/woda
Zmieszać dziewięć objętości alkoholu etylowego (2.2.) i jedną objętość wody (2.1.)
 - 2.14. Roztwór wzorca wewnętrznego
Przygotować roztwór zawierający w przybliżeniu 1 g kwasu 2-metoksybenzoowego (2.12.) w 500 ml mieszaniny alkohol etylowy/woda (2.13.)
 - 2.15. Faza ruchoma do HPLC
 - 2.15.1. Bufor octanowy: do 1,0 l wody dodać 6,35 g octanu sodu (2.7.) i 20,0 ml kwasu octowego (2.8.) i wymieszać
 - 2.15.2. Przygotować fazę ruchomą przez zmieszanie dziewięciu objętości buforu octanowego (2.15.1.) i jednej objętości acetonitrylu (2.9.)
 - 2.16. Bazowy roztwór środków konserwujących
Odważyć dokładnie około 0,05 g kwasu 4-hydroksybenzoowego (2.3.), 0,2 g kwasu salicylowego (2.4.), 0,2 g kwasu benzoowego (2.5.) i 0,05 g kwasu sorbowego (2.6.) w 50 ml kolbie miarowej i uzupełnić objętość do kreski mieszaniną alkohol etylowy/woda (2.13.). Przechowywać przyrządzony roztwór w lodówce. Roztwór jest trwały przez jeden tydzień.

- 2.17. Mianowane roztwory środków konserwujących
Do serii 20 ml kolb miarowych przenieść odpowiednio po: 8,00; 4,00; 2,00; 1,00 i 0,50 ml bazowego roztworu środków konserwujących (2.16.). Do wszystkich kolb dodać po 10,00 ml roztworu wzorca wewnętrznego (2.14.) i 0,5 ml 2 M kwasu siarkowego (VI) (2.10.). Uzpełnić objętość do kreski mieszaniną alkohol etylowy/woda (2.13.). Roztwory te muszą być świeżo przygotowane.
3. Aparatura
Zwykły sprzęt laboratoryjny
- 3.1. Łaźnia wodna nastawiona na 60 °C
- 3.2. Wysokosprawny chromatograf cieczowy z detektorem o zmiennej długości fali UV i pętlą 10 µl dla wprowadzenia próbki
- 3.3. Kolumna analityczna
Stal kwasoodporna, długość 12,5 do 25,0 cm, średnica wewnętrzna 4,6 mm, z wypełnieniem Nucleosil 5C18 lub równoważnym
- 3.4. Bibuła filtracyjna, średnica 90 mm, Schleicher i Schuli, Weissband nr 5892 lub równoważna
- 3.5. 50 ml próbówki szklane z gwintowanym korkiem
- 3.6. 5 ml szklane fiołki na próbki
- 3.7. Kamyczki wrzenne, o wymiarach 2 do 4 mm, z karborundu (węgliku krzemu) lub równoważne.
4. Procedura
- 4.1. Przygotowanie próbki
- 4.1.1. Przygotowanie próbki bez dodawania wzorca wewnętrznego
Odważyć 1 g próbki w 50 ml szklanej probówce z gwintowanym korkiem (3.5.). Do próbówki dodać pipetą 1,00 ml 2 M kwasu siarkowego (VI) (2.10.) i 40 ml mieszaniny alkohol etylowy/woda (2.13.). Dodać około 1 g kamyczków wrzennych (3.7.), zamknąć probówkę i wytrząsać energicznie przez co najmniej jedną minutę, aż do otrzymania jednorodnej zawiesiny. Dla ułatwienia ekstrakcji środków konserwujących do fazy etanolowej, należy umieścić probówkę w łaźni wodnej (3.1.) utrzymywanej w 60 °C na dokładnie pięć minut. Probówkę natychmiast schłodzić w strumieniu zimnej wody i umieścić ekstrakt na jedną godzinę w temperaturze 5 °C. Przesączyć ekstrakt przez bibułę filtracyjną (3.4.). Przenieść około 2 ml ekstraktu do fiołki na próbki (3.6.). Przechowywać ekstrakt w 5 °C i wykonać oznaczenie metodą HPLC w ciągu 24 godzin od przygotowania.
- 4.1.2. Przygotowanie próbki z dodawaniem wzorca wewnętrznego
Odważyć z dokładnością do trzeciego miejsca po przecinku $1 \pm 0,1$ g (a gramów) próbki w 50 ml probówce szklanej z gwintowanym korkiem (3.5.). Dodać pipetą 1,00 ml 2 M kwasu siarkowego (VI) (2.10.) i 30 ml mieszaniny alkohol etylowy/woda (2.13.). Dodać około 1 g kamyczków wrzennych (3.7.) i 10,00 ml roztworu wzorca wewnętrznego (2.14.). Zamknąć probówkę i wytrząsać energicznie w ciągu co najmniej jednej minuty do otrzymania jednorodnej zawiesiny. Dla ułatwienia ekstrakcji środków konserwujących do fazy etanolowej, należy umieścić rurkę w łaźni wodnej (3.1.) utrzymywanej w 60 °C na dokładnie pięciu minut. Probówkę schłodzić natychmiast w strumieniu zimnej wody i umieścić ekstrakt na jedną godzinę w temperaturze 5 °C. Przesączyć ekstrakt przez bibułę filtracyjną (3.4.). Przenieść około 2 ml przesączu do fiołki na próbki (3.6.). Przechowywać przesącz w temperaturze 5 °C i wykonać oznaczenie metodą HPLC w ciągu 24 godzin od przygotowania.

4.2. Wysokosprawna chromatografia cieczowa

Faza ruchoma: acetonitryl/bufor octanowy (2.15.)

Nastawić szybkość przepływu fazy ruchomej przez kolumnę na $2,0 \pm 0,5$ ml/minutę. Ustawić długość fali w detektorze na 240 nm.

4.2.1. Krzywa wzorcowa

Wprowadzić kolejno strzykawką do chromatografu cieczowego (3.2.) 10 μ l porcje wszystkich roztworów mianowanych środków konserwujących (2.17.). Dla wszystkich roztworów oznaczyć stosunki wysokości pików analizowanych środków konserwujących do wysokości pików wzorca wewnętrznego otrzymane z chromatogramów. Sporządzić dla wszystkich środków konserwujących wykres zależności stosunku wysokości pików od stężenia. Upewnić się, że podczas kreślenia krzywej wzorcowej otrzymuje się zależność liniową dla mianowanych roztworów.

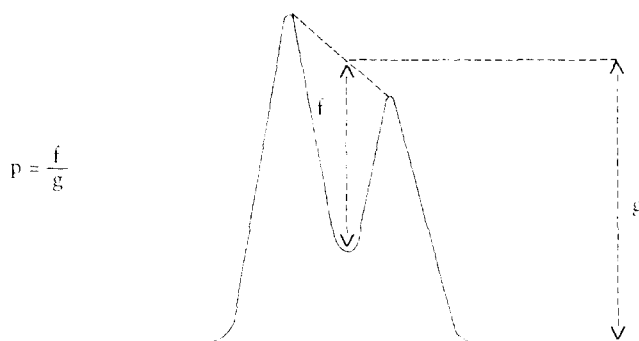
4.2.2. Oznaczanie

Do chromatografu cieczowego (3.2.) wprowadzić strzykawką 10 μ l ekstraktu próbki (4.1.1.) i zarejestrować chromatogram. Porównać otrzymane chromatogramy. Jeśli na chromatogramie ekstraktu próbki (4.1.1.) nie występuje pik mający w przybliżeniu ten sam czas retencji jak kwas 2-metoksybenzoesowy (polecany jako wzorzec wewnętrzny), wprowadzić strzykawką do chromatografu cieczowego 10 μ l ekstraktu próbki z dodanym wzorcem wewnętrznym (4.1.2.) i zarejestrować chromatogram.

Jeśli na chromatogramie ekstraktu próbki (4.1.1.) obserwuje się pik przeszkadzający o takim samym czasie retencji jak kwas 2-metoksybenzoesowy, należy wybrać inny odpowiedni wzorzec wewnętrzny. (Jeśli jeden z badanych środków konserwujących nie występuje na chromatogramie, to środek ten może być używany jako wzorzec wewnętrzny).

Upewnić się, czy chromatogramy otrzymane dla roztworu wzorca wewnętrznego i roztworu próbki odpowiadają następującym wymaganiom:

- rozdział pików w najgorszej rozdzielonej parze wynosi najmniej 0,90 (definicje rozdziału pików przedstawiono na rysunku 1);

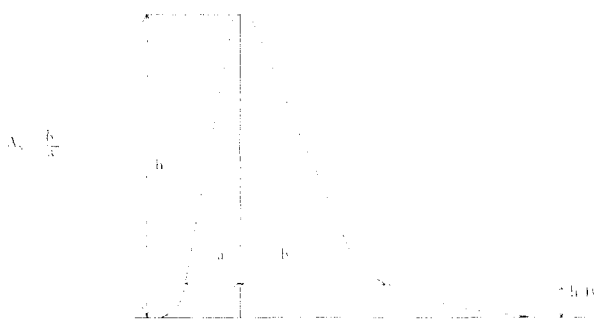


Rys. 1. Rozdział pików

jeśli nie uzyskano wymaganego rozdziału pików, powinno się zastosować kolumnę o większej zdolności rozdzielczej lub poprawić skład fazy ruchomej, aż do spełnienia wymagań,

- współczynnik asymetrii A_s wszystkich otrzymanych pików znajduje się w zakresie między 0,9 i 1,5 (definicję współczynników asymetrii pików

przedstawiono na rysunku 2); do zarejestrowania chromatogramu w celu oznaczenia współczynnika asymetrii polecana jest szybkość przesuwu papieru w rejestratorze, co najmniej 2 cm/minutę,



Rys. 2. Współczynnik asymetrii piku

– otrzymuje się stałą linię bazową.

5. Obliczenie

Do obliczenia stężenia kwasowych środków konserwujących w roztworze próbki należy stosować stosunki wysokości pików badanych środków konserwujących do wysokości piku kwasu 2-metoksybenzoesowego (wzorzec wewnętrzny) i krzywą wzorcową.

Zawartość w próbce kwasu benzoesowego, kwasu 4-hydroksybenzoesowego, kwasu sorbowego lub kwasu salicylowego obliczyć w procentach masowych (x_i), stosując wzór:

$$x_i \text{ (m/m)} = \frac{100 \cdot 20 \cdot b}{10^6 \cdot a} = \frac{b}{500 \cdot a}$$

w którym:

a – masa w gramach próbki pobranej do analizy (4.1.2.),

b – stężenie środka konserwującego ($\mu\text{g/ml}$) w ekstrakcie próbki (4.1.2.) otrzymane z krzywej wzorcowej.

6. Powtarzalność (ISO 5725)

Dla zawartości kwasu 4-hydroksybenzoesowego 0,40 % różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać absolutnej wartości 0,035 %.

Dla zawartości kwasu benzoesowego 0,50 % różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać absolutnej wartości 0,050 %.

Dla zawartości kwasu salicylowego 0,50 % różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać absolutnej wartości 0,045 %.

Dla zawartości kwasu sorbowego 0,60 % różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać absolutnej wartości 0,035 %.

7. Uwagi

7.1. Wyniki testu odchyień wykonane dla tej metody wykazały, że ilość kwasu siarkowego (VI) dodanego do ekstraktu kwasów z próbki jest krytyczna oraz ustalone ograniczone ilości próbki powinny być utrzymane w zalecanych granicach.

7.2. Jeśli potrzeba, można stosować odpowiednią kolumnę zabezpieczającą.

C. Oznaczanie kwasu propionowego

1. Cel i zakres
Metoda jest odpowiednia do oznaczania kwasu propionowego o maksymalnym stężeniu 2 % (m/m) w produktach kosmetycznych.
2. Definicja
Stężenie kwasu propionowego określone tą metodą jest wyrażone w procentach masowych (% m/m) wyrobu.
3. Zasada
Po ekstrakcji kwasu propionowego z wyrobu oznaczenie przeprowadza się metodą chromatografii gazowej z użyciem kwasu 2-metylopropionowego jako wzorca wewnętrznego.
4. Odczynniki
Wszystkie odczynniki muszą być czystości analitycznej; musi być używana woda destylowana lub woda o równoważnej jakości.
 - 4.1. Alkohol etylowy 96 % (v/v)
 - 4.2. Kwas propionowy
 - 4.3. Kwas 2-metylopropionowy
 - 4.4. Kwas ortofosforowy (V), 10 % (m/v)
 - 4.5. Roztwór kwasu propionowego
Odważyć dokładnie około 1,00 g (p gramów) kwasu propionowego w 50 ml kolbie miarowej i uzupełnić objętość alkoholem etylowym (4.1.)
 - 4.6. Roztwór wzorca wewnętrznego
Odważyć dokładnie około 1,00 g (e gramów) kwasu 2-metylopropionowego w 50 ml kolbie miarowej i uzupełnić objętość alkoholem etylowym (4.1.).
5. Aparatura
 - 5.1. Zwykły sprzęt laboratoryjny
 - 5.2. Chromatograf gazowy z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym
 - 5.3. Szklana probówka (20 x 150 mm) z korkiem gwintowanym
 - 5.4. Łaźnia wodna o temperaturze 60 °C
 - 5.5. 10 ml szklana strzykawka z membraną filtracyjną o średnicy porów 0,45 µm.
6. Procedura
 - 6.1. Przygotowanie próbki
 - 6.1.1. Przygotowanie próbki bez wzorca wewnętrznego
W szklanej probówce (5.3.) odważyć około 1 g próbki. Dodać 0,5 ml kwasu fosforowego (V) (4.4.) i 9,5 ml alkoholu etylowego (4.1.). Zamknąć probówkę i energicznie wytrząsnąć. Jeśli to konieczne, w celu całkowitego rozpuszczenia fazy lipidowej, umieścić probówkę w łaźni wodnej ogrzewanej do 60 °C (5.4.) na pięć minut. Schłodzić szybko pod strumieniem bieżącej wody. Przesączyć część roztworu przez filtr membranowy (5.5.). Zanalizować chromatograficznie przesącz w ciągu tego samego dnia.
 - 6.1.2. Przygotowanie próbki z wzorcem wewnętrznym
Odważyć z dokładnością do trzeciego miejsca po przecinku $1 \pm 0,1$ g (a gramów) próbki do szklanej probówki (5.3.). Dodać 0,5 ml kwasu ortofosforowego (V) (4.4.), 0,50 ml roztworu wzorca wewnętrznego (4.6.) i 9 ml alkoholu etylowego (4.1.). Zamknąć probówkę i energicznie wytrząsnąć. Jeśli to konieczne, w celu rozpuszczenia fazy lipidowej, umieścić rurkę w łaźni wodnej ogrzewanej do 60 °C (5.4.) na pięć minut. Schłodzić szybko pod strumieniem bieżącej wody. Przesączyć część roztworu przez filtr membranowy (5.5.). Zanalizować chromatograficznie przesącz tego samego dnia.

6.2. Warunki chromatografii gazowej

Poleca się następujące warunki operacyjne.

Kolumna:

Typ	stal kwasoodporna
Długość	2m
Średnica	1/8"
Wypełnienie	10 % SP TM 1000 (lub równoważne) + 1 % H ₃ PO ₄ na Chromosorbie WAW 100 do 120 mesh.

Temperatury:

Dozownik	200 °C
Kolumna	120 °C
Detektor	200 °C
Gaz nośny	azot
Szybkość przepływu	2,5 ml/min.

6.3. Analiza chromatograficzna

6.3.1. Krzywa wzorcowa

Przenieść pipetą odpowiednio: 0,25; 0,50; 1,00; 2,00 i 4,00 ml roztworu kwasu propionowego (4.5.) do serii 20 ml kolb miarowych. Do wszystkich kolb miarowych przenieść pipetą po 1,00 ml roztworu wzorca wewnętrznego (4.6.), uzupełnić objętość alkoholem etylowym (4.1.) i wymieszać. Roztwory przygotowane w ten sposób zawierają e mg/ml kwasu 2-metylopropionowego jako wzorca wewnętrznego (co oznacza 1 mg/ml, jeśli e=1000) i p/4; p/2; p; 2p; 4 p mg/ml kwasu propionowego (co oznacza: 0,25; 0,50; 1,00; 2,00; 4,00 mg/ml, jeśli p=1000).

Wprowadzić po 1 µl wszystkich tych roztworów i sporządzić krzywą wzorcową przez wykreślenie stosunku mas kwas propionowy/kwas metylopropionowy na osi odciętych i stosunku odpowiednich powierzchni pików na osi rzędnych. Trzykrotnie wprowadzić na kolumnę kolejno wszystkie roztwory i obliczyć średni stosunek pików.

6.3.2. Oznaczenie

Wprowadzić strzykawką 1 µl przesącza próbki 6.1.1. Porównać chromatogram z chromatogramem jednego z roztworów mianowanych (6.3.1.). Jeśli pik ma w przybliżeniu ten sam czas retencji jak kwas 2-metylopropionowy, należy zmienić wzorec wewnętrzny. Jeśli nie obserwuje się żadnego nakładania się pików, wprowadzić 1 µl przesącza próbki 6.1.2. i zmierzyć powierzchnie pików kwasu propionowego i pików wzorca wewnętrznego. Trzykrotnie wprowadzić na kolumnę kolejno wszystkie roztwory i obliczyć średni stosunek pików.

7. Obliczenia

7.1. Z krzywej wzorcowej otrzymanej w pkt 6.3.1. wyznaczyć stosunek mas (K) odpowiadający stosunkowi powierzchni pików obliczonej w pkt 6.3.2.

7.2. Z tak wyznaczonego stosunku mas obliczyć zawartość kwasu propionowego w próbce (x) jako procent masowy, stosując wzór:

$$x\%(m/m) = K \frac{0,5 \cdot 100 \cdot e}{50 \cdot a} = K \frac{e}{a}$$

w którym:

K – stosunek obliczony w pkt 7.1.,

e – masa w gramach wzorca wewnętrznego odważona w pkt 4.6.,

a – masa w gramach próbki odważonej w pkt 6.1.2.

Zaokrąglić wyniki do jednego miejsca po przecinku.

8. Powtarzalność (ISO 5725)
Dla zawartości kwasu propionowego 2 % (m/m) różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać 0,12 %.

Identyfikowanie i oznaczenie hydrochinonu, eteru monometylowego hydrochinonu, eteru monoetylowego hydrochinonu i eteru monobenzylowego hydrochinonu w produktach kosmetycznych

A. Identyfikowanie

1. Cel i zakres
Metoda opisuje wykrywanie i identyfikowanie hydrochinonu, eteru monometylowego hydrochinonu, eteru monoetylowego hydrochinonu i eteru monobenzylowego hydrochinonu.
2. Zasada
Hydrochinon i jego etery identyfikuje się metodą chromatografii cienkowarstwowej (TLC).
3. Odczynniki
Wszystkie odczynniki muszą być czystości analitycznej.
 - 3.1. Alkohol etylowy, 96 % (v/v)
 - 3.2. Chloroform
 - 3.3. Eter dietylowy
 - 3.4. Rozpuszczalnik rozwijający: chloroform/eter dietylowy 66:33 (v/v)
 - 3.5. Amoniak, 25 % (m/m), $d_4^{20} = 0,91$ g/ml
 - 3.6. Kwas askorbinowy
 - 3.7. Hydrochinon
 - 3.8. Eter monometylowy hydrochinonu
 - 3.9. Eter monoetylowy hydrochinonu
 - 3.10. Eter monobenzylowy hydrochinonu
 - 3.11. Roztwory odniesienia
Poniższe roztwory odniesienia powinny być świeżo przygotowane i są trwale jeden dzień.
 - 3.11.1. Odważyć 0,05 g hydrochinonu (3.7.) w 10 ml kalibrowanej probówce. Dodać 0,250 g kwasu askorbinowego (3.6.) i 5 ml alkoholu etylowego (3.1.). Dodawać amoniak (3.5.) do uzyskania pH 10 i uzupełnić objętość do 10 ml alkoholem etylowym (3.1.).
 - 3.11.2. Odważyć 0,05 g eteru monometylowego hydrochinonu (3.9.) w 10 ml kalibrowanej probówce. Dodać 0,250 g kwasu askorbinowego (3.6.) i 5 ml alkoholu etylowego (3.1.). Dodawać amoniak (3.5.) do uzyskania pH 10 i uzupełnić objętość do 10 ml alkoholem etylowym (3.1.).
 - 3.11.3. Odważyć 0,05 g eteru monoetylowego hydrochinonu (3.8.) w 10 ml kalibrowanej probówce. Dodać 0,250 g kwasu askorbinowego (3.6.) i 5 ml alkoholu etylowego (3.1.). Dodawać amoniak (3.5.) do uzyskania pH 10 i uzupełnić objętość do 10 ml alkoholem etylowym (3.1.).
 - 3.11.4. Odważyć 0,05 g eteru monobenzylowego hydrochinonu (3.10.) w 10 ml kalibrowanej probówce. Dodać 0,250 g kwasu askorbinowego (3.6.) i 5 ml alkoholu etylowego (3.1.). Dodawać amoniak (3.5.) do uzyskania pH 10 i uzupełnić objętość do 10 ml alkoholem etylowym (3.1.).

- 3.12. Azotan (V) srebra
- 3.13. Kwas dodekamolibdenianofosforowy
- 3.14. Heksahydrat heksacyjanożelazianu (III) potasu
- 3.15. Heksahydrat chlorku żelaza (III)
- 3.16. Odczynniki wywołujące
 - 3.16.1. Do 5 % (m/v) wodnego roztworu azotanu (V) srebra (3.12.) dodawać amoniak (3.5.), aż powstający osad się rozpuści.
Ostrzeżenie:
Roztwór staje się nietrwały, grozi wybuchem przy przechowywaniu i powinien być odrzucony po użyciu.
 - 3.16.2. 10 % (m/v) roztwór kwasu dodekamolibdenianofosforowego (3.13.) w alkoholu etylowym (3.1.).
 - 3.16.3. Przygotować 1 % (m/v) wodny roztwór heksacyjanożelazianu (III) potasu (3.14.) i 2 % (m/v) wodny roztwór chlorku żelaza (III) (3.15.). Wymieszać równe części obu roztworów bezpośrednio przed użyciem.
4. Aparatura
 - 4.1. Typowy sprzęt do chromatografii cienkowarstwowej (TLC)
 - 4.2. Płytki TLC, przygotowane fabrycznie: żel krzemionkowy GHR/UV₂₅₄; 20 x 20 cm (Machery, Nagel, lub równoważne). Grubość warstwy 0,25 mm
 - 4.3. Łaźnia ultradźwiękowa
 - 4.4. Wirówka
 - 4.5. Lampa UV, długość fali 254 nm
5. Procedura
 - 5.1. Przygotowanie próbki
Odważyć 3,0 g próbki w 10 ml kalibrowanej probówce. Dodać 0,250 g kwasu askorbinowego (3.6.) i 5 ml alkoholu etylowego (3.1.). Doprowadzić odczyn roztworu do pH 10, dodając amoniak (3.5.). Uzupelnąć objętość do 10 ml alkoholem etylowym (3.1.). Zamknąć probówkę korkiem i homogenizować roztwór w łaźni ultradźwiękowej w ciągu 10 minut. Przesączyć przez bibułę filtracyjną lub odwirować przy 3 000 obrotach/minutę.
 - 5.2. TLC
 - 5.2.1. Wysycić komorę chromatograficzną rozpuszczalnikiem rozwijającym (3.4.).
 - 5.2.2. Nanieść na płytkę po 2 µl roztworów odniesienia (3.11.) i 2 µl roztworu próbki (5.1.). Chromatogram rozwijać w ciemności w temperaturze otoczenia aż do osiągnięcia przez czoło rozpuszczalnika wysokości 15 cm od linii początkowej.
 - 5.2.3. Wyjąć płytkę i wysuszyć w temperaturze pokojowej.
 - 5.3. Wykrywanie
 - 5.3.1. Obserwować płytkę w świetle UV przy 254 nm i zaznaczyć położenie plam.
 - 5.3.2. Spryskać płytkę:
 - odczynnikiem azotanu (V) srebra (3.16.1.) lub
 - odczynnikiem kwasu dodekamolibdenianofosforowego (V) (3.16.2.), ogrzewać do około 120 °C, lub
 - roztworem heksacyjanożelazianu (III) potasu i roztworu chlorku żelaza (III) (3.16.3.).

6. **Identyfikowanie**
Obliczyć wartość R_F dla wszystkich plam.
Porównać plamy otrzymane dla roztworu próbki z plamami otrzymanymi dla roztworów odniesienia pod względem ich wartości R_F , kolorów plam w świetle UV i kolorów plam po ich wywołaniu odczynnikami do spryskiwania. Wykonać analizę metodą HPLC opisaną w następnej części B i porównać czasy retencji otrzymane dla pików (pików) próbki z czasami dla pików roztworów odniesienia. Wykorzystać wyniki z analizy metodą TLC i HPLC w celu zidentyfikowania obecności hydrochinonu i/lub jego eterów.
7. **Uwagi**
W opisanych warunkach otrzymano następujące wartości R_F :
- | | |
|---------------------------------|-------|
| hydrochinon | 0,32 |
| eter monometylowy hydrochinonu | 0,53 |
| eter monoetylowy hydrochinonu | 0,55 |
| eter monobenzylowy hydrochinonu | 0,58. |

B. Oznaczanie

1. **Cel i zakres**
Przedstawiono szczegółowo procedurę oznaczania hydrochinonu, eteru monometylowego hydrochinonu, eteru monoetylowego hydrochinonu i eteru monobenzylowego hydrochinonu w produktach kosmetycznych do rozjaśniania skóry.
2. **Zasada**
Próbkę ekstrahuje się mieszaniną woda/metanol podczas łagodnego ogrzewania w celu stopienia wszystkich ciekłych materiałów. Oznaczanie analizowanych substancji w powstałym roztworze wykonuje się metodą chromatografii cieczowej z zastosowaniem fazy odwróconej z detekcją w zakresie promieniowania UV.
3. **Odczynniki**
- 3.1. Wszystkie odczynniki powinny być jakości analitycznej. Stosowana woda musi być wodą destylowaną lub wodą o co najmniej równoważnej czystości.
- 3.2. Metanol
- 3.3. Hydrochinon
- 3.4. Eter monometylowy hydrochinonu
- 3.5. Eter monoetylowy hydrochinonu
- 3.6. Eter monobenzylowy hydrochinonu (monobenzon)
- 3.7. Tetrahydrofuran o jakości odpowiedniej dla HPLC
- 3.8. Mieszanina woda/metanol 1:1 (v/v). Zmieszać jedną objętość wody z jedną objętością metanolu (3.2.)
- 3.9. Faza ruchoma: mieszanina tetrahydrofuran/woda 45:55 (v/v). Zmieszać 45 objętości tetrahydrofuranu (3.7.) i 55 objętości wody
- 3.10. **Roztwór odniesienia**
Odważyć 0,06 g hydrochinonu (3.3.), 0,08 g eteru monometylowego hydrochinonu (3.4.), 0,10 g eteru monoetylowego hydrochinonu (3.5.) i 0,12 g eteru monobenzylowego hydrochinonu (3.6.) w 50 ml kolbie miarowej. Rozpuścić i uzupełnić objętość metanolem (3.2.). Przygotować roztwór odniesienia przez rozcieńczenie 10,00 ml tego roztworu do 50 ml mieszaniną woda/metanol (3.8.). Roztwory te muszą być świeżo przygotowane.
4. **Aparatura**
Zwykły sprzęt laboratoryjny:
- 4.1. Łaźnia wodna, z możliwością utrzymania temperatury 60 °C
- 4.2. Wysokosprawny chromatograf cieczowy z detektorem UV o zmiennej długości fali i 10 µl pętlą do wprowadzania próbki

- 4.3. Kolumna analityczna
Kolumna ze stali kwasoodpornej, długość 250 mm, średnica wewnętrzna 4,6 mm z wypełnieniem fenylowym Zorbax (chemicznie związany feniloetylosilan osadzony na nośniku Zorbax SIL, zakończony trimetylochlorosilanem), rozmiar cząsteczek 6 µm, lub równoważnym. Nie należy używać kolumny zabezpieczającej (ochronnej), z wyjątkiem ochrony fenylowej lub równoważnej
- 4.4. Krążki bibuły filtracyjnej o średnicy 90 mm (Schleicher i Schuli, Weissband nr 5892 lub równoważna).
5. Procedura
- 5.1. Przygotowanie próbki
Odważyć z dokładnością do trzeciego miejsca $1 \pm 0,1$ g (a gramów) próbki w 50 ml kolbie miarowej. Dyspergować próbkę w 25 ml mieszaniny woda/metanol (3.8.). Zamknąć kolbę i wytrząsać energicznie do uzyskania jednorodnej zawiesiny. Wytrząsać przez co najmniej jedną minutę. W celu poprawienia ekstrakcji umieścić kolbę w łaźni wodnej (4.1.) utrzymywanej w temperaturze 60 °C. Schłodzić kolbę i uzupełnić objętość mieszaniną woda/metanol (3.8.). Przesączyć ekstrakt, używając krążków bibuły filtracyjnej (4.4.). Wykonać oznaczenie metodą HPLC w ciągu 24 godzin od przygotowania ekstraktu.
- 5.2. Wysokosprawną chromatografię cieczową
- 5.2.1. Uregulować szybkość przepływu fazy ruchomej (3.9.) na 1,0 ml/min i nastawić długość fali detektora na 295 nm.
- 5.2.2. Wprowadzić strzykawką 10 µl roztworu próbki otrzymanego, jak opisano w pkt 5.1., i zarejestrować chromatogram. Zmierzyć powierzchnie pików. Przeprowadzić kalibrowanie według opisu w ppkt 5.2.3. Porównać chromatogramy otrzymane dla roztworów próbki i roztworu mianowanego. Powierzchnie pików i współczynniki kalibracyjne R_F obliczone w ppkt 5.2.3. zastosować do obliczenia stężeń analizowanych substancji w roztworze próbki.
- 5.2.3. Krzywa wzorcowa
Wprowadzić strzykawką 10 µl roztworu odniesienia (3.10.) i zarejestrować chromatogram. Wprowadzać próbkę kilkakrotnie aż do otrzymania stałej powierzchni pików.
Oznaczyć współczynnik kalibracji R_F :

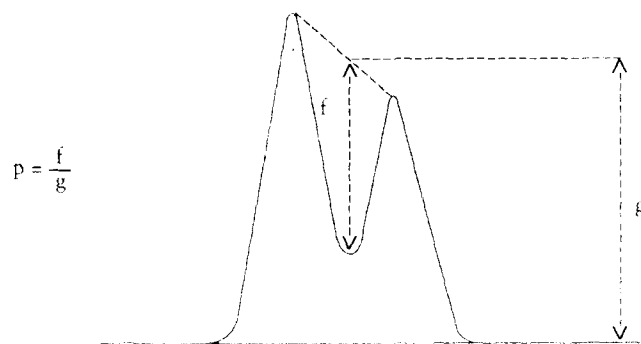
$$R_F_i = \frac{p_i}{c_i}$$

w którym:

- p_i – powierzchnia pików dla hydrochinonu, eteru monometylowego hydrochinonu, eteru monoetylowego hydrochinonu lub eteru monobenzylowego hydrochinonu,
 c_i – stężenie (g/50 ml) w roztworze odniesienia (3.10.) hydrochinonu, eteru monometylowego hydrochinonu, eteru monoetylowego hydrochinonu lub eteru monobenzylowego hydrochinonu.

Należy upewnić się, czy chromatogramy otrzymane dla roztworu mianowanego i roztworu próbki odpowiadają następującym wymaganiom:

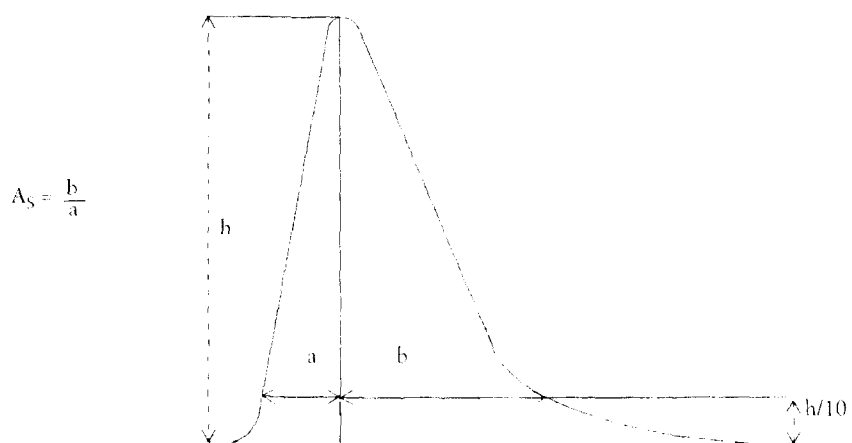
- rozdział pików w najgorzej rozdzielonej parze powinien wynosić co najmniej 0,90 (definicję rozdziału pików przedstawiono na rysunku 1);



Rys. 1. Rozdział pików

jeśli nie uzyskano wymaganego rozdziału pików, należy zastosować kolumnę o większej rozdzielczości lub poprawiać skład fazy ruchomej aż do spełnienia wymagań,

- współczynnik asymetrii A_s , wszystkich otrzymanych pików powinien znajdować się w zakresie od 0,9 do 1,5 (definicję współczynnika asymetrii pików przedstawiono na rysunku 2); do zarejestrowania chromatogramu w celu oznaczenia współczynnika asymetrii polecana jest szybkość przesuwu papieru co najmniej 2 cm/min,



Rys. 2. Współczynnik asymetrii pików

- otrzymuje się stałą linię podstawową.

6. Obliczenie

Powierzchnie pików oznaczanych substancji stosuje się do obliczenia stężenia (stężeń) tej (tych) substancji w próbce. Obliczyć stężenie analizowanej substancji w próbce w procentach masowych (x_i), stosując wzór:

$$x_i \%(m/m) = \frac{b_i \cdot 100}{RF_i \cdot a}$$

w którym:

a – masa analizowanej próbki w gramach,

b_i – powierzchnia pików substancji analizowanej „i” w próbce.

7. Powtarzalność (ISO 5725)

- 7.1. Dla zawartości hydrochinonu 2,0 % różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać absolutnej wartości 0,13 %.

- 7.2. Dla zawartości eteru monometylowego hydrochinonu 1,0 % różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać absolutnej wartości 0,1 %.
- 7.3. Dla zawartości eteru monoetylowego hydrochinonu 1,0 % różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać absolutnej wartości 0,11 %.
- 7.4. Dla zawartości eteru monobenzylowego hydrochinonu 1,0 % różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać absolutnej wartości 0,11 %.
8. Odtwarzalność (ISO 5725)
- 8.1. Dla zawartości hydrochinonu 2,0 % różnica między wynikami dwóch oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki w różnych warunkach (inne laboratoria, inni wykonawcy, inna aparatura i/lub inny czas) nie powinna przekraczać absolutnej wartości 0,37 %.
- 8.2. Dla zawartości eteru monometylowego hydrochinonu 1,0 % różnica między wynikami dwóch oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki w różnych warunkach (inne laboratoria, inni wykonawcy, inna aparatura i/lub inny czas) nie powinna przekraczać absolutnej wartości 0,21 %.
- 8.3. Dla zawartości eteru monoetylowego hydrochinonu 1,0 % różnica między wynikami dwóch oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki w różnych warunkach (inne laboratoria, inni wykonawcy, inna aparatura i/lub inny czas) nie powinna przekraczać absolutnej wartości 0,19 %.
- 8.4. Dla zawartości eteru monobenzylowego hydrochinonu 1,0 % różnica między wynikami dwóch oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki w różnych warunkach (inne laboratoria, inni wykonawcy, inna aparatura i/lub inny czas) nie powinna przekraczać absolutnej wartości 0,11 %.
9. Uwagi
- 9.1. Jeśli stwierdzono zawartość hydrochinonu znacznie ponad 2 %, a wymagana jest dokładna ocena zawartości, ekstrakt próbki (5.1.) powinno się rozcieńczyć do stężenia podobnego do tego, jakie można by otrzymać z próbki zawierającej 2 % hydrochinonu, i powtórzyć oznaczenie. (Dla wysokich stężeń hydrochinonu, w niektórych przyrządach absorbancja może znaleźć się poza liniowym zakresem wskazań detektora.)
- 9.2. Zakłócenia
- Opisana powyżej metoda pozwala na oznaczenie hydrochinonu i jego eterów w jednym izokratycznym przebiegu. Zastosowanie kolumny fenylovej zapewnia wystarczającą zdolność zatrzymywania hydrochinonu, czego nie można zagwarantować przy zastosowaniu kolumny C 18 z użyciem podanej fazy ruchomej. Jednakże, metoda ta jest podatna na zakłócenia przez szereg parabenów (estrów kwasu 4-hydroksybenzoesowego). W takich przypadkach należy powtórzyć oznaczenie z różnymi układami faza ruchoma/faza stacjonarna. Odpowiednie metody można znaleźć w publikacjach: M. Herpol-Boiremans, M.O. Masse, Identification et dosage de l'hydroquinone et de ses ethers methylique et benzylique dans les produits cosmetiques pour blanchir la peau. Int. J. Cosmet. Sci. 8-203-214 (1986), J.Frith and I.Rix, Determination of hydroquinone in skin toning creams, Analyst (1986), 111, p.129.

Kolumna: Zorbax ODS, 4,6 mm x 25 mm lub równoważna,

temperatura: 36 °C,

szybkość przepływu: 1,5 ml/min

faza ruchoma:

dla hydrochinonu: metanol/woda 5/95 (v/v)

dla eteru monometylowego hydrochinonu: metanol/woda 30/70 (v/v)

dla eteru monobenzylowego hydrochinonu: metanol/woda 80/20 (v/v),

Kolumna: Spherisorb S5-ODS lub równoważna,

faza ruchoma: woda/metanol 90/10 (v/v),

szybkość przepływu: 1,5 ml/min.

Te warunki są odpowiednie również dla hydrochinonu (J.Frith and I.Rix, Determination of hydroquinone in skin toning creams, Analyst (1986), 111, p.129.).

**Identyfikowanie i oznaczanie 2-fenoksyetanolu,
1-fenoksypropan-2-olu, 4-hydroksybenzoesanów metylu,
etylu, propylu, butylu i benzylu w produktach
kosmetycznych**

A. Identyfikowanie

1. **Przedmiot i zakres stosowania**

W metodzie określa się procedurę TLC, która w połączeniu z metodą oznaczania opisaną w dziale B pozwala na identyfikowanie 2-fenoksyetanolu, 1-fenoksypropan-2-olu, 4-hydroksybenzoesanu metylu, 4-hydroksybenzoesanu etylu, 4-hydroksybenzoesanu propylu, 4-hydroksybenzoesanu butylu i 4-hydroksybenzoesanu benzylu w produktach kosmetycznych.
2. **Zasada**

Środki konserwujące ekstrahuje się acetonem z zakwaszonej próbki kosmetyku. Po przesączeniu roztwór acetonowy miesza się z wodą i w środowisku alkalicznym kwasy tłuszczowe zostają strącone w postaci soli wapnia. Alkaliczną mieszaninę aceton/woda ekstrahuje się eterem dietylowym w celu usunięcia substancji lipofilowych. Po zakwaszeniu środki konserwujące ekstrahuje się eterem dietylowym. Próbkę ekstraktu w eterze dietylowym nanosi się na płytkę do chromatografii cienkowarstwowej pokrytą żelem krzemionkowym. Po rozwinięciu chromatogram otrzymany na płycie obserwuje się w świetle UV i wywołuje, używając odczynnika Millona.
3. **Odczynniki**
 - 3.1. **Ogólne**

Wszystkie używane odczynniki powinny być czystości analitycznej. Woda powinna być wodą destylowaną lub wodą o co najmniej równej czystości.
 - 3.2. Aceton
 - 3.3. Eter dietylowy
 - 3.4. n-Pentan
 - 3.5. Metanol
 - 3.6. Kwas octowy lodowaty
 - 3.7. Kwas chlorowodorowy, roztwór $c(\text{HCl}) = 4 \text{ mol/l}$
 - 3.8. Wodorotlenek potasu, roztwór $c(\text{KOH}) = 4 \text{ mol/l}$
 - 3.9. Dihydrat chlorku wapnia ($\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$)
 - 3.10. Odczynnik wywołujący: odczynnik Millona
Odczynnik Millona [azotan rtęci (II)] to fabrycznie przygotowany roztwór, dostępny w handlu (Fluka 69820).
 - 3.11. 2-fenoksyetanol
 - 3.12. 1-fenoksypropan-2-ol
 - 3.13. 4-hydroksybenzoesan metylu (metyloparaben)
 - 3.14. 4-hydroksybenzoesan etylu (etyloparaben)
 - 3.15. 4-hydroksybenzoesan n-propylu (propyloparaben)
 - 3.16. 4-hydroksybenzoesan n-butylu (butyloparaben)
 - 3.17. 4-hydroksybenzoesan benzylu (benzyloparaben)
 - 3.18. **Roztwory odniesienia**

Przygotować 0,1 % (m/v) roztwory wszystkich substancji odniesienia 3.11.–3.17. w metanolu.
 - 3.19. **Rozpuszczalnik rozwijający**

Zmieszać 88 objętości n-pentanu (3.4.) z 12 objętościami kwasu octowego lodowatego (3.6.).

4. Aparatura
Standardowe wyposażenie laboratoryjne:
 - 4.1. Łaźnia wodna, z możliwością utrzymania temperatury 60 °C.
 - 4.2. Komora chromatograficzna (niewyłożona bibułą filtracyjną).
 - 4.3. Źródło światła ultrafioletowego, 254 nm.
 - 4.4. Płytki do chromatografii cienkowarstwowej, 20 cm × 20 cm, pokryte fabrycznie 0,25 mm warstwą żelu krzemionkowego 60 F₂₅₄ ze strefą nanoszenia (Merek nr 11798 lub równoważne).
 - 4.5. Suszarka z możliwością utrzymania temperatury 105 °C.
 - 4.6. Suszarka do suszenia włosów gorącym powietrzem.
 - 4.7. Wełniany wałek do malowania, długość około 10 cm, średnica zewnętrzna około 3,5 cm. Grubość wełnianej warstwy powinna wynosić 2–3 mm. Jeżeli konieczne, należy przyciąć wełnianą warstwę (patrz uwaga 5.2.).
 - 4.8. 50 ml szklana probówka z gwintowanym korkiem.
 - 4.9. Płytką ogrzewana elektrycznie z termostatyczną kontrolą temperatury. Nastawienie temperatury około 80 °C. W celu uzyskania równomiernego rozprowadzania ciepła, płytkę grzejącą należy przykryć płytką aluminiową o wymiarach 20 cm × 20 cm i grubości 6 mm.
5. Procedura
 - 5.1. Przygotowanie próbki.

Odważyć około 1 g próbki w 50 ml szklanej probówce z gwintowanym korkiem (4.8.). Dodać cztery krople roztworu kwasu chlorowodorowego (3.7.) i 40 ml acetonu.

Do produktów kosmetycznych silnie alkalicznych, takich jak mydło toaletowe, dodać 20 kropli roztworu kwasu chlorowodorowego. Zamknąć probówkę, dla ułatwienia ekstrakcji środków konserwujących do fazy acetonowej łagodnie ogrzewać mieszaninę do około 60 °C i wytrząsać energicznie przez jedną minutę.

Zmierzyć pH roztworu papierkiem wskaźnikowym i doprowadzić kwasem chlorowodorowym do pH ≤ 3. Ponownie wytrząsać energicznie przez jedną minutę.

Schłodzić roztwór do temperatury pokojowej i przesączyć przez bibułę filtracyjną do kolby stożkowej. Przenieść 20 ml przesączu do 200 ml kolby stożkowej, dodać 60 ml wody i wymieszać. Doprowadzić odczyn mieszaniny do pH 10, dodając wodorotlenek potasu (3.8.), używając papierka wskaźnikowego. Dodać 1 g dihydratu chlorku wapnia (3.9.) i wytrząsać energicznie. Przesączyć roztwór przez bibułę filtracyjną do 250 ml rozdzielacza zawierającego 75 ml eteru dietylowego i wytrząsać energicznie przez jedną minutę.

Pozostawić warstwy do rozdzielenia i zebrać warstwę wodną w 200 ml kolbie stożkowej. Doprowadzić odczyn roztworu do pH około 2, dodając roztwór kwasu chlorowodorowego, używając papierka wskaźnikowego. Następnie dodać 10 ml eteru dietylowego i wytrząsać energicznie przez jedną minutę. Pozostawić do rozdzielenia warstw i przenieść około 2 ml warstwy eteru dietylowego do 5 ml fiolki na próbkę.
 - 5.2. Chromatografia cienkowarstwowa (TLC).

Umieścić płytkę do chromatografii cienkowarstwowej (ppkt 4.4.) na ogrzewanej płytce aluminiowej (4.9.). Nanieść po 10 µl kolejno wszystkich roztworów odniesienia (3.18.) i 100 µl roztworu (roztworów) próbki (próbek) (5.1.) na linię startu w strefie nanoszenia na płytce do chromatografii cienkowarstwowej.

Jeżeli jest to pożądané, można użyć strumienia powietrza dla ułatwienia odparowania rozpuszczalnika. Zdjąć płytkę TLC z ogrzewanej płytki i pozostawić do schłodzenia do temperatury pokojowej. Przenieść 100 ml rozpuszczalnika rozwijającego (3.19.) do komory chromatograficznej (4.2.).

Niezwłocznie umieścić płytkę TLC w nienasyconej komorze i rozwijać w temperaturze pokojowej do chwili, gdy czoło rozpuszczalnika osiągnie odległość około 15 cm od linii bazowej.

Wyjąć płytkę z komory chromatograficznej i wysuszyć w strumieniu gorącego powietrza za pomocą suszarki do włosów z gorącym powietrzem.

Zbadać płytkę w świetle UV (4.3.) i zaznaczyć położenie plam. Ogrzewać płytkę w ciągu 30 minut w suszarce (4.5.) w 100 °C dla usunięcia nadmiaru kwasu octowego. Wywołać plamy środków konserwujących na chromatogramie odczynnikiem Millona (3.10.) przez zanurzenie wałka do malowania (4.7.) w odczynniku i przesunięcie po płycie TLC w celu równomiernego nawilżenia.

Uwaga: Alternatywnie plamy można wywołać przez staranne spryskanie odczynnikiem Millona wszystkich plam zaznaczonych w świetle UV.

Estry kwasu 4-hydroksybenzoesowego pojawiają się jako czerwone plamy, 2-fenoksyetanol i 1-fenoksypropan-2-ol jako żółte plamy. Jednak należy zauważyć, że sam kwas 4-hydroksybenzoesowy, który może znajdować się w próbkach jako środek konserwujący lub produkt rozkładu parabenu, pojawi się również jako czerwona plama (7.3. i 7.4.).

6. Identyfikowanie

Obliczyć wartości R_F dla wszystkich plam. Porównać plamy otrzymane z roztworu próbki z plamami roztworów odniesienia ze względu na ich wartości R_F , zachowanie w promieniowaniu UV i kolor po wywołaniu. Wyciągnąć wstępne wnioski dotyczące identyfikowania środków konserwujących. Jeżeli zachodzi przypuszczenie, że parabeny znajdują się w próbce, należy zastosować chromatografię cieczową HPLC opisaną w dziale B. Połączyć wyniki otrzymane z TLC i wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) dla potwierdzenia obecności 2-fenoksyetanolu, 1-fenoksypropan-2-olu i parabenów.

7. Uwagi

7.1. Ze względu na toksyczne działanie odczynnika Millona najlepszym sposobem jego stosowania jest jedna z opisanych procedur. Nie zaleca się spryskiwania.

7.2. Inne związki zawierające grupy hydroksylowe mogą również dawać barwne plamy z odczynnikiem Millona. Tablicę kolorów i wartości R_F otrzymanych dla pewnej liczby środków konserwujących z użyciem procedury TLC można znaleźć w: de Kruijf N., Rijk M. A. H., Pranato-Soetardhi L. A. i Schouten A. Determination of preservatives in cosmetic product I: Thin-layer chromatographic procedure for the identification of preservatives in cosmetic products (*J. Chromatography* 410, 395-411).

7.3. Wartości R_F podane w tabeli poniżej służą jako wskazówka do identyfikacji plam.

Związek	$R_F \times 100$	Barwa
kwas 4-hydroksybenzoesowy	11	czerwona
metyloparaben	12	czerwona
etyloparaben	17	czerwona
propyloparaben	21	czerwona

Związek	R _F x 100	Barwa
butyloparaben	26	czerwona
benzyloparaben	16	czerwona
2-fenoksyetanol	29	żółta
l-fenoksypropan-2-ol	50	żółta

- 7.4. Nie uzyskuje się rozdzielenia kwasu 4-hydroksybenzoesowego i metyloparabenu lub benzyloparabenu i etyloparabenu. Identyfikowanie tych związków powinno być potwierdzone przez przeprowadzenie analizy metodą HPLC opisaną w dziale B i porównanie czasów retencji otrzymanych dla próbki z czasami wzorców.

B. Oznaczanie

1. **Przedmiot i zakres zastosowania**
Metodę tę stosuje się do oznaczania 2-fenoksyetanolu, l-fenoksypropan-2-olu, 4-hydroksybenzoesanu metylu, 4-hydroksybenzoesanu etylu, 4-hydroksybenzoesanu propylu, 4-hydroksybenzoesanu butylu i 4-hydroksybenzoesanu benzylu w produktach kosmetycznych.
2. **Definicje**
Ilości środków konserwujących oznaczone tą metodą są wyrażone w procentach masowych.
3. **Zasada**
Próbkę zakwasza się dodając kwas siarkowy i następnie dysperguje w mieszaninie alkoholu etylowego i wody. Po łagodnym podgrzaniu w celu stopienia fazy tłuszczowej, dla poprawienia ilościowej ekstrakcji, mieszaninę filtruje się.
Środki konserwujące w przesączu oznacza się metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) na odwróconych fazach, stosując 4-hydroksybenzoesan izopropylu jako wzorzec wewnętrzny.
4. **Odczynniki**
 - 4.1. **Ogólne**
Wszystkie odczynniki muszą posiadać czystość analityczną i być odpowiednie do HPLC tam, gdzie jest to wymagane. Woda powinna być wodą destylowaną lub wodą o co najmniej równej czystości
 - 4.2. Alkohol etylowy absolutny
 - 4.3. 2-fenoksyetanol
 - 4.4. l-fenoksypropan-2-ol
 - 4.5. 4-hydroksybenzoesan metylu (metyloparaben)
 - 4.6. 4-hydroksybenzoesan etylu (etyloparaben)
 - 4.7. 4-hydroksybenzoesan n-propylu (propyloparaben)
 - 4.8. 4-hydroksybenzoesan izopropylu (izopropyloparaben)
 - 4.9. 4-hydroksybenzoesan n-butylu (butyloparaben)
 - 4.10. 4-hydroksybenzoesan benzylu (benzyloparaben)
 - 4.11. Tetrahydrofuran
 - 4.12. Metanol
 - 4.13. Acetonitryl
 - 4.14. Kwas siarkowy, roztwór $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 2 \text{ mol/l}$
 - 4.15. Mieszanina alkohol etylowy/woda
Zmieszać dziewięć objętości alkoholu etylowego (4.2.) i jedną objętość wody.
 - 4.16. Roztwór wzorca wewnętrznego
Odważyć dokładnie około 0,25 g izopropyloparabenu (4.8.), przenieść do 500 ml kolby miarowej, rozpuścić i uzupełnić objętość mieszaniną alkohol etylowy/woda (4.15.).

- 4.17. Faza ruchoma: mieszanina tetrahydrofuran/woda/metanol/acetonitryl
Zmieszać 5 objętości tetrahydrofuranu, 60 objętości wody, 10 objętości metanolu i 25 objętości acetonitrylu.
- 4.18. Bazowy roztwór środków konserwujących
Do 100 ml kolby miarowej odważyć dokładnie około 0,2 g 2-fenoksyetanolu, 0,2 g 1-fenoksypropan-2-olu, 0,05 g metyloparabenu, 0,05 g etyloparabenu, 0,05 g propyloparabenu, 0,05 g butyloparabenu i 0,025 g benzyloparabenu, rozpuścić i uzupełnić objętość mieszaniną etanol/woda. Roztwór przechowywany w lodówce jest trwały przez jeden tydzień.
- 4.19. Standardowe roztwory środków konserwujących
Z roztworu bazowego (4.18.) przenieść odpowiednio 20,00 ml, 10,00 ml, 5,00 ml, 2,00 ml i 1,00 ml do 50 ml kolb miarowych. Do każdej kolby dodać po 10,00 ml roztworu wzorca wewnętrznego (4.16.), 1,0 ml roztworu kwasu siarkowego (4.14.) i uzupełnić objętość mieszaniną alkohol etylowy/woda. Roztwory te powinny być świeżo przygotowane.
5. Aparatura
Standardowe wyposażenie laboratoryjne:
- 5.1. Łaźnia wodna, z możliwością utrzymania temperatury $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 5.2. Wysokosprawny chromatograf cieczowy z detektorem UV o długości fali 280 nm.
- 5.3. Kolumna analityczna
Stal kwasoodporna, długość 25 cm, średnica wewnętrzna 4,6 mm (lub długość 12,5 cm, średnica wewnętrzna 4,6 mm) z wypełnieniem Nucleosil 5C18 lub równoważne (patrz pkt 10.1.).
- 5.4. 100 ml szklane probówki z gwintowanym korkiem.
- 5.5. Kamyki wrzenne, z karborundu, o wymiarach 2 do 4 mm lub równoważne.
6. Procedura
- 6.1. Przygotowanie próbek
- 6.1.1. Przygotowanie próbki bez dodatku wzorca wewnętrznego
Do 100 ml szklanej probówki z gwintowanym korkiem odważyć około 1,0 g próbki. Pipetą dodać do probówki 1,0 ml roztworu kwasu siarkowego (4.14.) i 50 ml mieszaniny alkohol etylowy/woda (4.15.). Dodać około 1 g kamyków wrzennych (5.5.), zamknąć probówkę i wytrząsać energicznie aż do otrzymania homogenicznej zawiesiny. Wytrząsać przez co najmniej przez jedną minutę. Dla ułatwienia ekstrakcji środków konserwujących do fazy metanolowej umieścić probówkę na pięć minut w łaźni wodnej (5.1.) utrzymywanej w temperaturze $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.
Niezwłocznie schłodzić probówkę w strumieniu zimnej wody i umieścić ekstrakt w lodówce na jedną godzinę. Przesączyć ekstrakt przez bibułę filtracyjną. Przenieść około 2 ml przesączu do 5 ml fiolki na próbkę. Ekstrakty należy przechowywać w lodówce i oznaczyć skład metodą HPLC w ciągu 24 godzin.
- 6.1.2. Przygotowanie próbki z dodatkiem wzorca wewnętrznego
Do 100 ml szklanej probówki z gwintowanym korkiem odważyć z dokładnością do trzeciego miejsca po przecinku $1,0 \pm 0,1$ g próbki.
Do probówki pipetować 1,0 ml roztworu kwasu siarkowego i 40,0 ml mieszaniny alkohol etylowy/woda. Dodać około 1 g kamyków wrzennych (5.5.) i dokładnie 10,00 ml roztworu wzorca wewnętrznego. Zamknąć probówkę i wstrząsać energicznie aż do otrzymania homogenicznej zawiesiny. Wstrząsać przez co najmniej jedną minutę. W celu ułatwienia ekstrakcji środków konserwujących do fazy metanolowej umieścić probówkę na pięć minut w łaźni wodnej utrzymywanej w temperaturze $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Niezwłocznie schłodzić próbkę w strumieniu bieżącej zimnej wody i umieścić ekstrakt w lodówce na jedną godzinę. Przesączyć ekstrakt przez bibułę filtracyjną.

Przenieść około 2 ml przesączu do 5 ml fiołki na próbkę (roztwór testowy). Przechowywać ekstrakt w lodówce i wykonać oznaczenia metodą HPLC w ciągu 24 godzin.

6.2. Wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC).

6.2.1. Warunki analizy chromatograficznej:

- faza ruchoma: mieszanina tetrahydrofuran/woda/metanol/acetonytryl (4.17.),
- szybkość przepływu: 1,5 ml/minutę,
- długość fali detekcji: 280 nm.

6.2.2. Krzywa wzorcowa

Wstrzyknąć po 10 µl wszystkich standardowych roztworów środków konserwujących (4.19.). Z otrzymanych chromatogramów oznaczyć stosunki wysokości pików standardowych roztworów środków konserwujących do wysokości pików wzorca wewnętrznego. Wykreślić krzywą dla każdego środka konserwującego odnosząc te stosunki do stężeń roztworów standardowych.

6.2.3. Oznaczanie

Wstrzyknąć po 10 µl roztworu próbki bez wzorca wewnętrznego (6.1.1.) do chromatografu i zarejestrować chromatogram.

Wstrzyknąć 10 µl jednego ze standardowych roztworów środków konserwujących (4.19.) i zarejestrować chromatogram. Porównać otrzymane chromatogramy.

Jeżeli na chromatogramie ekstraktu próbki (6.1.1.) nie ma żadnego pików mającego w przybliżeniu ten sam czas retencji jak izopropyloparaben (polecany wzorzec wewnętrzny), kontynuować, wprowadzając strzykawką 10 µl roztworu próbki z wzorcem wewnętrznym (6.1.2.). Zarejestrować chromatogram i zmierzyć wysokości pików.

Jeżeli na chromatogramie roztworu próbki występuje pik przeszkadzający o takim samym czasie retencji jak izopropyloparaben, należy wybrać inny wzorzec wewnętrzny.

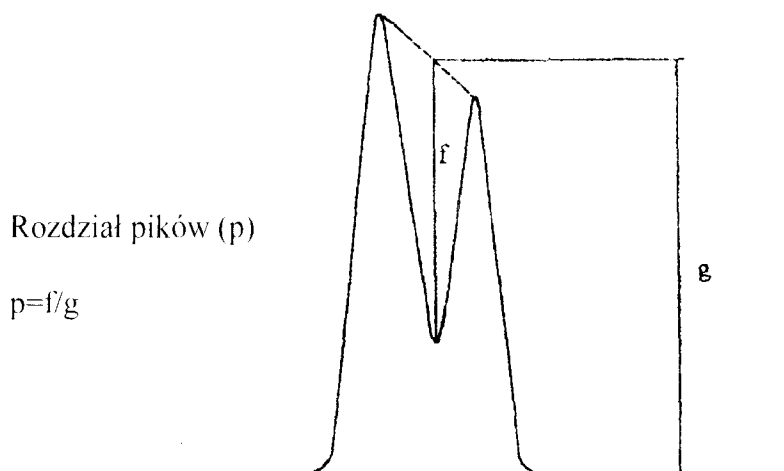
Jeżeli jeden ze środków konserwujących poddawanych badaniu jest nieobecny na chromatogramie, ten środek można stosować jako alternatywny wzorzec wewnętrzny.

Obliczyć stosunki wysokości pików badanych środków konserwujących do wysokości pików wzorca wewnętrznego.

Upewnić się, że dla roztworów standardowych stosowanych w procedurze wyznaczania krzywej wzorcowej otrzymuje się liniową zależność.

Upewnić się, że chromatogramy otrzymane dla roztworu standardowego i roztworu próbki odpowiadają następującym wymaganiom:

- rozdział pików najgorzej rozdzielonej pary powinien wynosić co najmniej 0,90 (definicję rozdziału pików przedstawiono na rys. 1);



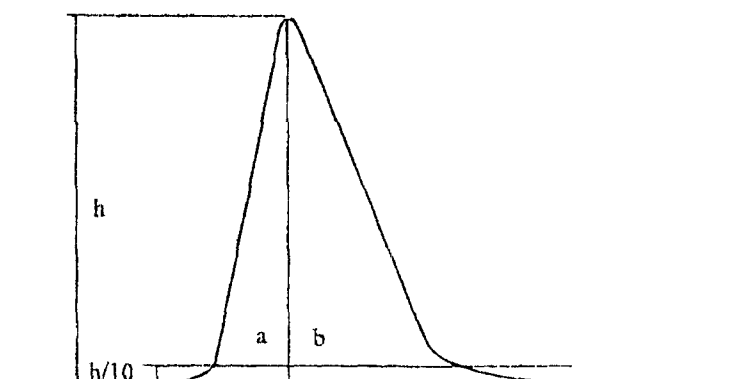
Rys. 1. Rozdział szczytów

jeżeli nie uzyskano wystarczającego rozdzielania, można zastosować kolumnę o większej rozdzielczości lub poprawiać skład fazy ruchomej aż do spełnienia wymagań,

współczynniki asymetrii A_s wszystkich otrzymanych pików znajdują się w zakresie 0,9-1,5 (definicję współczynnika asymetrii przedstawiono na rys. 2); do zarejestrowania chromatogramu w celu oznaczenia współczynnika asymetrii zaleca się szybkość przesuwu papieru co najmniej 2 cm/min,

Współczynnik asymetrii
 pików A_s

$A_s = b/a$

Rys. 2. Współczynnik asymetrii szczytu A_s

powinno się otrzymać stałą linię podstawową.

7. Obliczenie

Zastosować krzywą wzorcową (6.2.2.) i stosunki wysokości pików badanych środków konserwujących do wysokości pików wzorca wewnętrznego do obliczenia stężenia środków konserwujących w roztworze próbki. Obliczyć zawartość 2-fenoksycetanolu, 1-fenoksypropan-2-olu, 4-hydroksybenzoesanu metylu, 4-hydroksybenzoesanu etylu, 4-hydroksybenzoesanu propylu, 4-hydroksybenzoesanu butylu i 4-hydroksybenzoesanu benzylu, w_i , w procentach masowych (% m/m), stosując wzór:

$$\%w_i(m/m) = \frac{b_i}{200 \times a}$$

w którym:

b_i – stężenie ($\mu\text{g/ml}$) środka konserwującego „i” w roztworze badanym, odczytane z krzywej wzorcowej,

a – masa (g) analizowanej próbki.

8. Powtarzalność
Patrz uwagi 10.5.
9. Odtwarzalność (ISO 5725)
Patrz uwagi 10.5.
10. Uwagi
- 10.1. Faza spoczynkowa
Zachowanie retencyjne roztworu przy oznaczaniu metodą HPLC zależy w dużym stopniu od rodzaju, gatunku i przygotowania fazy spoczynkowej. O tym, czy kolumnę można zastosować do rozdzielania badanych środków konserwujących, można wnioskować na podstawie wyników otrzymanych dla roztworów standardowych (patrz ppkt 6.2.3.). Stwierdzono, że poza proponowanymi już materiałami do wypełnienia kolumn odpowiednie są również Hypersil ODS i Zorbax ODS. W celu uzyskania wymaganego rozdzielania można również optymalizować skład zalecanej fazy ruchomej.
- 10.2. Długość fali detekcji
Badanie chropowatości opisanej metody wykazało, że niewielka zmiana w długości fali detekcji może mieć znaczący wpływ na wyniki oznaczenia. Dlatego parametr ten musi być starannie kontrolowany podczas analizy.
- 10.3. Zakłócenia
W warunkach opisanych w tej metodzie wiele innych związków, takich jak środki konserwujące i dodatki do kosmetyków, ulega równie dobrze eluowaniu. Czasy retencji wielu środków konserwujących wymienionych w załączniku VI do dyrektywy Rady dotyczącej produktów kosmetycznych można znaleźć w: de Kruijf N., Rijk M. A. H., Pranato-Soetardhi L. A. i Schouten A. Determination of preservatives in cosmetic products II. Highperformance liquid chromatographic identification (*J. Chromatography*, 1989, 469, str. 317-398).
- 10.4. Do zamontowanej kolumny analitycznej można użyć odpowiedniej kolumny zabezpieczającej.
- 10.5. Metodę sprawdzono we wspólnym doświadczeniu z udziałem dziewięciu laboratoriów. Analizowano trzy próbki. Poniższa tabela podaje zawartość w % m/m (m), powtarzalność (r) i odtwarzalność (R) substancji obecnych we wszystkich trzech próbkach.

Próbka	2-fenoksycetanol		1-fenoksypropan-2-ol	metyloparaben	etyloparaben	propyloparaben	butyloparaben	benzyloparaben
	m	r						
Krem witaminowy	m	1,124		0,250	0,0628	0,0310	0,0906	
	r	0,016		0,018	0,0035	0,0028	0,0044	
	R	0,176		0,030	0,0068	0,0111	0,0034	
Krem nawilżający	m	1,196		0,266	0,076			
	r	0,040		0,003	0,002			
	R	0,147		0,022	0,004			
Krem do masażu	m		0,806			0,180	0,148	0,152
	r		0,067			0,034	0,013	0,015
	R		0,112			0,078	0,012	0,016