

R o č n í k 2001

V ě s t n í k

**MINISTERSTVA ZDRAVOTNICTVÍ
ČESKÉ REPUBLIKY**

Částka 7

Vydáno:

Kč

OBSAH

ZPRÁVY A SDĚLENÍ

1. Analytické metody kontroly složení kosmetických prostředků

ZPRÁVY A SDĚLENÍ

ANALYTICKÉ METODY KONTROLY SLOŽENÍ KOSMETICKÝCH PROSTŘEDKŮ

Č.j. HEM-300-30.5.01-14876

Ref.: Ing. Ludmila Bezpalcová, MUDr. Dagmar Jírová

Ministerstvo zdravotnictví na základě § 80 odst. 2 zákona č. 258/2000 Sb., o ochraně veřejného zdraví a o změně některých souvisejících zákonů, stanoví

analytické metody kontroly složení kosmetických prostředků⁽¹⁾

Obsah

Směrnice komise 80/1335/EHS

- odběr vzorků kosmetických prostředků,
- příprava vzorků v laboratoři,
- kvalitativní a kvantitativní stanovení volného hydroxidu sodného a draselného,
- kvantitativní a kvalitativní stanovení kyseliny šťavelové a jejích alkalických solí v prostředcích určených pro péči o vlasy,
- kvantitativní stanovení chloroformu v zubních pastách,
- kvantitativní stanovení zinku,
- kvalitativní a kvantitativní stanovení 4-hydroxybenzensulfonové kyseliny,

Směrnice komise 82/434/EHS

- kvalitativní stanovení oxidačních činidel a kvantitativní stanovení peroxidu vodíku v prostředcích určených pro péči o vlasy,
- kvalitativní a semikvantitativní stanovení určitých oxidačních barviv v barvách na vlasy,
- kvalitativní a kvantitativní stanovení dusitanů,
- kvantitativní stanovení resorcinolu v šamponech a vlasových lotionech,
- kvantitativní stanovení methanolu vzhledem k ethanolu nebo propan-2-olu,

Doplňek 90/207/EHS ke Směrnici komise 82/1335/EHS

- kvalitativní a kvantitativní stanovení volného formaldehydu,

Směrnice komise 83/514/EHS

- kvantitativní stanovení dichlormethanu a 1,1,1-trichlorethanu,
- kvalitativní a kvantitativní stanovení chinolin-8-olu a bis(chinolin-8-ol)-sulfátu,
- kvantitativní stanovení amoniaku,
- kvalitativní a kvantitativní stanovení nitromethanu,
- kvalitativní a kvantitativní stanovení kyseliny thioglykolové (sulfanyloctové) v prostředcích k trvalé ondulaci, k rovnání vlasů a v prostředcích k depilaci,
- kvalitativní a kvantitativní stanovení hexachlorofenu (INN),
- kvantitativní stanovení tosylchloramidu sodného (INN),

¹ Tyto metody jsou převzaty ze směrnice EU č. 80/1335/EHS a jejích doplňků.

- kvantitativní stanovení celkového obsahu fluoru v zubní pastě,
- kvalitativní a kvantitativní stanovení organických sloučenin rtuti,
- kvantitativní stanovení alkalických sulfidů a sulfidů kovů alkalických zemin,

Směrnice komise 85/490/EHS

- kvalitativní a kvantitativní stanovení 2,3-dihydroxypropyl-4-aminobenzoátu,
- kvantitativní stanovení chlorbutanolu,
- kvalitativní a kvantitativní stanovení chininu,
- kvalitativní a kvantitativní stanovení anorganických siřičitanů a hydrogensířičitanů,
- kvalitativní a kvantitativní stanovení chlorečnanů alkalických kovů,
- kvalitativní a kvantitativní stanovení jodičnanu sodného,

Směrnice komise 93/73/EHS

- kvalitativní a kvantitativní stanovení dusičnanu stříbrného,
- kvalitativní a kvantitativní stanovení sulfidu seleničitého v šamponech proti lupům,
- kvantitativní stanovení rozpustného barya a rozpustného stroncia, v pigmentech ve formě solí nebo komplexů,
- kvalitativní a kvantitativní stanovení benzylalkoholu,
- kvalitativní stanovení zirkonia a kvantitativní stanovení obsahu zirkonia, hliníku a chloru v neaerosolových antiperspirantech,
- kvalitativní a kvantitativní stanovení hexamidinu, dibromhexamidinu, dibrompropamidinu a chlorhexidinu,

Směrnice komise 95/32/EHS

- kvalitativní a kvantitativní stanovení kyseliny benzoové, kyseliny 4-hydroxybenzoové, kyseliny sorbové, kyseliny salicylové a kyseliny propionové v kosmetických prostředcích,
- kvalitativní a kvantitativní stanovení hydrochinonu, hydrochinon-monomethyletheru, hydrochinon-monoethyletheru a hydrochinon-monobenzyletheru v kosmetických prostředcích,

Směrnice komise 96/45/EHS

- kvalitativní a kvantitativní stanovení 2-fenoxyethan-1-olu, 1-fenoxypropan-2-olu, methyl-, ethyl-, propyl-, butyl- a benzyl-4-hydroxybenzoátu v kosmetických prostředcích,

ODBĚR VZORKŮ KOSMETICKÝCH PROSTŘEDKŮ

(Směrnice komise 80/1335/EHS z 22. prosince 1980)

1. ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ

Postup odběru vzorků kosmetických prostředků je popsán s ohledem na jejich analýzy v různých laboratořích.

2. DEFINICE

2.1 *Základní vzorek:*

jednotkové množství odebrané ze šarže nabízené k prodeji.

2.2 *Celkový vzorek:*

suma všech základních vzorků odebraných ze šarže téhož čísla.

- 2.3 *Laboratorní vzorek:*
reprezentativní část celkového vzorku, která má být analyzována v jednotlivých laboratořích.
- 2.4 *Zkušební vzorek:*
reprezentativní část laboratorního vzorku nezbytná pro analýzu.
- 2.5 *Obal:*
předmět, který obsahuje výrobek a který je s výrobkem v neustálém přímém styku.
3. POSTUP ODBĚRU VZORKŮ
- 3.1 Kosmetické prostředky musí být odebírány v původních obalech a musí být doručeny do laboratoře, aniž byly otevřeny.
- 3.2 Pokud jde o kosmetické prostředky, které jsou uváděny na trh ve velkém balení nebo které jsou prodávány v jiných než původních obalech od výrobce, měly by být vydány vhodné pokyny pro jejich odběr v místě použití nebo prodeje.
- 3.3 Počet základních vzorků nezbytných pro přípravu laboratorního vzorku musí být určen analytickou metodou a počtem analýz, které mají být provedeny každou laboratoří.
4. IDENTIFIKACE VZORKU
- 4.1 Vzorky se na místě odběru zapečetí a označí v souladu s pravidly platnými v dotyčném členském státu.
- 4.2 Každý odebraný základní vzorek se označí následujícími informacemi:
- název kosmetického prostředku,
 - datum, čas a místo odběru vzorku,
 - jméno osoby odpovědné za odběr vzorku,
 - název inspektorátu.
- 4.3 Protokol o odběru vzorků musí být vypracován v souladu s pravidly platnými v dotyčném členském státu.
5. UCHOVÁVÁNÍ VZORKŮ
- 5.1 Základní vzorky musí být uchovávány v souladu s případnými pokyny výrobce uvedenými na etiketě.
- 5.2 Nejsou-li uvedeny jiné podmínky, musí být laboratorní vzorky uchovávány v temnu při teplotě 10 až 25 °C.
- 5.3 Základní vzorky nesmí být do zahájení analýzy otevřeny.

PŘÍPRAVA VZORKŮ V LABORATOŘI

(Směrnice komise 80/1335/EHS z 22. prosince 1980)

1. OBECNĚ
- 1.1 Je-li to možné, měla by být analýza provedena s každým základním vzorkem. Je-li základní vzorek příliš malý, měl by být použit minimální počet základních vzorků. Před odběrem zkušebního vzorku by měly být nejdříve důkladně smíchány.

- 1.2 Obal se otevře v inertní atmosféře, vyžaduje-li to analytická metoda, a co nejrychleji se odebere požadovaný počet zkušebních vzorků. Poté by měla být neprodleně provedena analýza. Jestliže musí být vzorek zachován, měl by být obal opět v inertní atmosféře uzavřen.
- 1.3 Kosmetické prostředky mohou být v tekuté nebo tuhé formě nebo v polotuhé formě. Jestliže dojde k oddělení fází původně homogenního výrobku, měl by být výrobek před odběrem zkušebního vzorku opět zhomogenizován.
- 1.4 Je-li kosmetický prostředek uváděn do prodeje zvláštním způsobem, v jehož důsledku nelze postupovat podle těchto pokynů, a nejsou-li dány vhodné metody zkoušení, může být přijat vlastní postup, za předpokladu, že bude písemně uveden jako součást protokolu o analýze.
2. KAPALINY
- 2.1 V této formě se mohou vyskytovat výrobky, jako jsou olejové, lihové a vodné roztoky, toaletní vody, lotiony nebo mléka, a mohou být baleny ve flakonech, lahvičkách, ampulích nebo tubách.
- 2.2 **Odběr zkušebního vzorku:**
- před otevřením se obal prudce protřepe;
 - obal se otevře;
 - několik mililitrů tekutiny se převede do zkumavky k vizuálnímu vyšetření jejich vlastností pro účely odběru zkušebního vzorku;
 - obal se opět uzavře, nebo
 - se odeberou požadované zkušební vzorky;
 - obal se pečlivě uzavře.
3. POLOTUHÉ LÁTKY
- 3.1 V této formě se mohou vyskytovat výrobky, jako jsou pasty, krémy, emulze a gely a mohou být baleny v tubách, v plastových lahvičkách nebo kelímcích.
- 3.2 **Odběr zkušebního vzorku:**
- 3.2.1 Obaly s úzkým hrdlem: Odstraní se alespoň první centimetr prostředku. Vytlačí se zkušební vzorek a obal se ihned uzavře.
- 3.2.2 Obaly se širokým hrdlem: Rovnoměrně se seškrábne horní vrstva. Odebere se zkušební vzorek a obal se ihned uzavře.
4. TUHÉ LÁTKY
- 4.1 V této formě se mohou vyskytovat výrobky, jako jsou sypké pudry, kompaktní pudry, tyčinky a mohou být baleny v široké škále obalů.
- 4.2 Odběr zkušebního vzorku:
- 4.2.1 Sypké pudry: Před odzátkováním nebo otevřením se obal prudce protřepe. Obal se otevře a odebere se zkušební vzorek.
- 4.2.2 Kompaktní pudry nebo tyčinky: Rovnoměrně se seškrábne horní vrstva. Ze spodní vrstvy se odebere zkušební vzorek.
5. PROSTŘEDKY V OBALECH NA AEROSOLY („aerosolové rozprašovače“)
- 5.1 Tyto výrobky jsou definovány v článku 2 směrnice Rady 75/324/EHS ze dne 20. května 1975⁽²⁾.

² Úř. věst. č. L 147, 9. 6. 1975, s. 40.

5.2 Zkušební vzorek:

Po důkladném protřepání se pomocí vhodné spojky (viz obrázek 1: ve specifických případech může být v analytické metodě požadováno použití jiné spojky) převede reprezentativní množství obsahu aerosolového rozprašovače do skleněné lahve potažené vrstvou z plastu (obrázek 4) a opatřené aerosolovým ventilem, avšak bez výtlačné trubičky. Při převádění do lahve směřuje ventil dolů. Při převádění je obsah dobře viditelný. Existují čtyři možnosti:

- 5.2.1 Aerosolový prostředek ve formě homogenního roztoku, který lze přímo analyzovat.
- 5.2.2 Aerosolový prostředek sestává ze dvou kapalných fází. Každá z fází může být analyzována po oddělení spodní fáze do druhé lahve. V tomto případě směřuje dolů ventil první lahve. V takovém případě bývá spodní fáze vodná a neobsahuje hnací plyn (např. butan/vodu).
- 5.2.3 Aerosolové prostředky obsahující suspenzi pudru. Kapalnou fázi lze analyzovat po oddělení pudru.
- 5.2.4 Prostředky ve formě pěny nebo krému: Do lahve se nejdříve přesně naváží 5 až 10 g 2-methoxyethanolu. Tato látka zabrání pění při odplynění, a tak je možné vypudit hnací plyny, aniž by došlo ke ztrátě kapaliny.

5.3 Pomůcky

Spojka (obrázek 1) je vyrobena z duralu nebo mosazi. Je konstruována tak, aby prostřednictvím polyethylenového adaptéru vyhovovala různým systémům ventilů. Na obrázku je uveden příklad; lze použít jiné spojky (viz obrázky 2 a 3).

Láhev (obrázek 4) je vyrobena z bílého skla a z vnějšku je potažena ochrannou vrstvou průhledného plastu. Má objem 50 až 100 ml. Je opatřena aerosolovým ventilem bez výtlačné trubičky.

5.4 Postup

Aby bylo možné převést dostatečné množství vzorku, musí být z lahve vypuzen vzduch. Za tímto účelem se do lahve zavede přes spojku asi 10 ml dichlordifluormethanu nebo butanu (podle aerosolového prostředku, který má být zkoumán) a poté se provede odplynění až do zmizení kapalných fází, přičemž láhev s ventilem směřuje vzhůru. Spojka se sejme. Láhev se zváží („a“ gramů). Aerosolový rozprašovač, z něhož má být odebrán vzorek, se prudce protřepe. Spojka se připojí na ventil obalu s aerosolem, který má být odebrán, (obal je orientován ventilem vzhůru), ke spojce se připojí láhev (hrdlem dolů) a zatlačí se na ni. Láhev se naplní asi ze dvou třetin. Jestliže převádění ustane kvůli vyrovnání tlaků, může být obnoveno zchlazením lahve. Spojka se sejme, naplněná láhev se zváží („b“ gramů) a stanoví se hmotnost převedeného vzorku aerosolu m_1 ($m_1 = b - a$).

Takto získaný vzorek lze použít:

- 1. k obvyklé chemické analýze,
- 2. k analýze těkavých složek plynovou chromatografií.

5.4.1 Chemická analýza

S lahví udržovanou ventilem vzhůru se postupuje dále následujícím způsobem:

- z lahve se vypudí plyn; jestliže přitom dochází k pění, použije se láhev, do které bylo stříkačkou přes spojku předem zavedeno přesně zvážené množství 2-methoxyethanolu (5 až 10 g);
- na vodní lázni při 40 °C se třepáním odstraní těkavé složky, aniž by došlo ke ztrátám vzorku;

- láhev se znovu zváží („c“ gramů), aby se stanovila hmotnost zbytku m_2 ($m_2 = c - a$); (Poznámka: při výpočtu hmotnosti zbytku se odečte hmotnost případného použitého množství 2-methoxyethanolu);
- sejmutím ventilu se láhev otevře;
- zbytek se kvantitativně rozpustí ve známém množství vhodného rozpouštědla;
- s alikvotním podílem se provede požadovaná analýza.

Vzorce pro výpočet:

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

kde:

- m_1 = hmotnost aerosolu odebraného do lahve,
- m_2 = hmotnost zbytku po zahřívání při 40 °C,
- r = obsah jednotlivé látky ve zbytku m_2 , vyjádřený v procentech (stanovený vhodnou metodou),
- R = obsah jednotlivé látky v odebraném aerosolu, vyjádřený v procentech,
- Q = celková hmotnost jednotlivé látky v aerosolovém rozprašovači,
- P = čistá hmotnost původního aerosolového rozprašovače (základní vzorek).

5.4.2 *Analýza těkavých složek plynovou chromatografií*

5.4.2.1 Princip

Pomocí stříkačky pro plynovou chromatografii se z lahve odebere dostatečné množství vzorku. Obsah stříkačky se nastříkne do plynového chromatografu.

5.4.2.2 Pomůcky

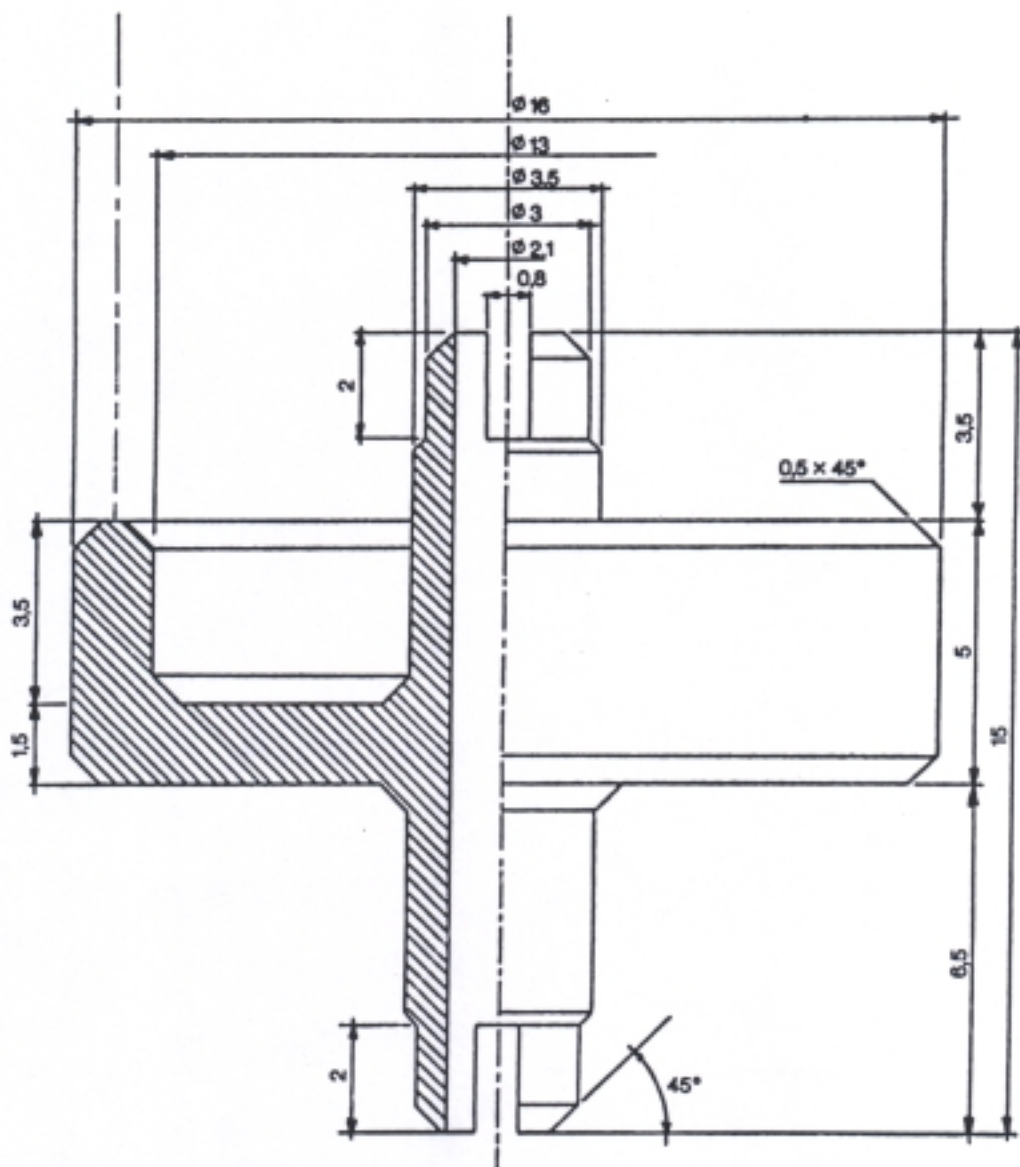
Přesná stříkačka pro plynovou chromatografii řady A2 na 25 μ l až 50 μ l (obrázek 5) nebo rovnocenná stříkačka. Tato stříkačka je vybavená posuvným ventilem na konci jehly. Stříkačka je spojená s lahví spojkou nasazenou na lahvi a polyethylenovou trubičkou nasazenou na injekční stříkačce (délka 8 mm, vnitřní průměr 2,5 mm).

5.4.2.3 Postup

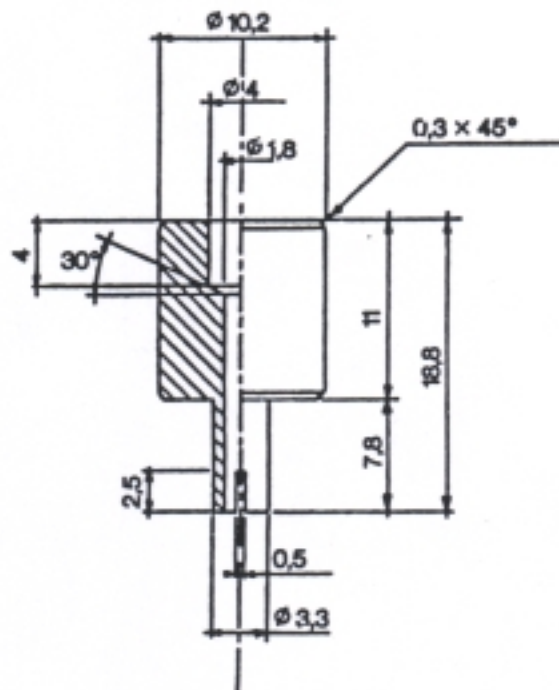
Po převedení dostatečného množství aerosolového výrobku do lahve se způsobem popsaným v bodě 5.4.2.2 připevní k lahvi kónický konec stříkačky. Otevře se ventil a nasaje se dostatečné množství kapaliny. Několikrát posunutím pístu se odstraní bublinky plynu (stříkačka se podle potřeby ochladí). Když je ve stříkačce dostatečné množství kapaliny bez bublin, ventil se uzavře a stříkačka se odpojí od lahve. Nasadí se jehla, stříkačka se vloží do vstřikovacího zařízení plynového chromatografu, otevře se ventil a provede se nástřik.

5.4.2.4 Vnitřní standard

Pokud se požaduje použití vnitřního standardu, zavede se do lahve (obyčejnou skleněnou stříkačkou za použití spojky).



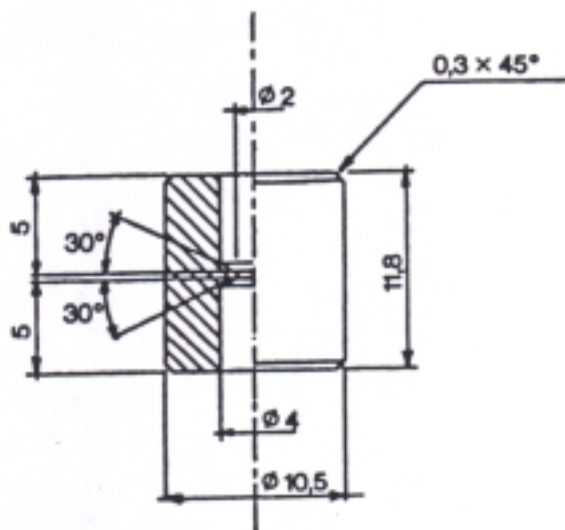
Obrázek 1
Spojka P1



Obrázek 2

Spojka M2

pro převod mezi zasunovacím a objímácím ventilem



Obrázek 3

Spojka M1

pro převod mezi dvěma zasunovacími ventily



Obrázek 4
Láhev
o objemu 50 až 100 ml



Obrázek 5
Stříkačka pro plynovou
chromatografii

KVALITATIVNÍ A KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ VOLNÉHO HYDROXIDU SODNÉHO A DRASELNÉHO

(Směrnice komise 80/1335/EHS z 22. prosince 1980)

1. ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ

V metodě je uveden postup identifikace kosmetických prostředků obsahujících významné množství volného hydroxidu sodného a/nebo draselného a postup kvantitativního stanovení volného hydroxidu sodného a/nebo draselného v prostředcích pro narovnání vlasů a v odstraňovačích nehtové kůžičky.

2. DEFINICE

Množství volného hydroxidu sodného a draselného je dáno množstvím odměrného roztoku kyseliny potřebného k neutralizaci prostředku za předepsaných podmínek, přičemž výsledné množství se vyjádří jako volný hydroxid sodný v % (m/m).

3. PRINCIP

Vzorek se rozpustí nebo disperguje ve vodě a titruje se odměrným roztokem kyseliny. Souběžně s přidáváním kyseliny se zaznamenává hodnota pH; u jednoduchých roztoků hydroxidu sodného nebo draselného je bod ekvivalence dán maximální rychlostí změny zaznamenané hodnoty pH.

Jednoduchá titrační křivka může být zkrešlena za přítomnosti

- a) čpavku a jiných slabých organických zásad, které samy vykazují poměrně plochou titrační křivku. Čpavek se v této metodě odstraní odpařením za sníženého tlaku při pokojové teplotě;
- b) solí slabých kyselin, které mohou způsobit, že titrační křivka vykazuje několik inflexních bodů. V takových případech odpovídá neutralizaci hydroxylových iontů pocházejících z volného hydroxidu sodného nebo draselného pouze první část křivky až k prvnímu inflexnímu bodu.

V metodě je uveden alternativní postup titrace v alkoholu pro případy, kdy dochází k intenzivní interferenci se solemi slabých anorganických kyselin.

I když existuje teoretická možnost, že by vysoké pH mohlo být způsobeno jinými rozpustnými silnými zásadami, např. hydroxidem lithným či kvartérními amoniiovými hydroxidy, je jejich přítomnost v těchto typech kosmetických prostředků velmi nepravděpodobná.

4. KVALITATIVNÍ STANOVENÍ

4.1 Reakční činidla

- 4.1.1 Standardní alkalický pufrací roztok, pH 9,18 při 25 °C: 0,05M roztok dekahydrátu tetraboritanu sodného.

4.2 Přístroje a pomůcky

- 4.2.1 Obvyklé laboratorní sklo
- 4.2.2 pH-metr
- 4.2.3 Skleněná membránová elektroda
- 4.2.4 Standardní kalomelová referentní elektroda

4.3 Postup

pH-metr s elektrodami se kalibruje pomocí standardního alkalického pufrčního roztoku. Připraví se 10% vodný roztok nebo vodná disperze výrobku, který má být analyzován, a zfiltruje se. Změří se pH. Je-li pH 12 nebo vyšší, musí být provedeno kvantitativní stanovení.

5. KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ

5.1 Titrace ve vodném prostředí

5.1.1 Reakční činidlo

5.1.1.1 Odměrný roztok kyseliny chlorovodíkové, 0,1N

5.1.2 Přístroje a pomůcky

5.1.2.1 Obvyklé laboratorní sklo

5.1.2.2 pH-metr, nejlépe se zapisovačem

5.1.2.3 Skleněná membránová elektroda

5.1.2.4 Standardní kalomelová referentní elektroda

5.1.3 Postup

Do kádinky na 150 ml se přesně naváží zkušební vzorek o hmotnosti 0,5 až 1,0 g. Je-li přítomen čpavek, přidá se několik varných kamínků, kádinka se vloží do vakuového exsikátoru a evakuuje se pomocí vodní vývěvy, dokud je patrný zápach čpavku (asi tři hodiny).

Přidá se 100 ml vody, zbytek v kádince se rozpustí nebo disperguje a titruje se 0,1N odměrným roztokem kyseliny chlorovodíkové (5.1.1.1) přičemž se zaznamenává změna pH (5.1.2.2).

5.1.4 Výpočet

Na titrační křivce se určí inflexní body. Jestliže první inflexní bod leží při hodnotě pH nižší než 7, není ve vzorku přítomen volný hydroxid sodný nebo draselný.

Vykazuje-li titrační křivka dva nebo více inflexních bodů, je pro stanovení významný jen první z nich.

Zaznamená se objem titračního roztoku až k dosažení prvního inflexního bodu.

Je-li V objem titračního roztoku v ml a M hmotnost zkušební vzorku v gramech, vypočte se obsah hydroxidu sodného a/nebo draselného ve vzorku vyjádřený jako hydroxid sodný v procentech (m/m) pomocí vzorce

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

Může nastat situace, kdy přes náznaky přítomnosti nezanedbatelného množství hydroxidu sodného a/nebo draselného nevykazuje titrační křivka zřetelný inflexní bod. V takovém případě je třeba stanovení opakovat v isopropanolu.

5.2 Titrace v isopropanolu

5.2.1 Reakční činidla

5.2.1.1 Isopropanol

5.2.1.2 Vodný odměrný roztok kyseliny chlorovodíkové, 1,0N

5.2.1.3 0,1N roztok kyseliny chlorovodíkové v isopropanolu připravený bezprostředně před použitím zředěním 1,0N vodného roztoku kyseliny chlorovodíkové isopropanolem

5.2.2 *Přístroje a pomůcky*

5.2.2.1 Obvyklé laboratorní sklo

5.2.2.2 pH-metr, nejlépe se zapisovačem

5.2.2.3 Skleněná membránová elektroda

5.2.2.4 Standardní kalomelová referenční elektroda

5.2.3 *Postup*

Do kádinky na 150 ml se přesně naváží zkušební vzorek o hmotnosti 0,5 až 1,0 g. Je-li přítomen čpavek, přidá se několik varných kamínků, kádinka se vloží do vakuového exsikátoru a evakuuje se pomocí vodní vývěvy, dokud je patrný zápach čpavku (asi tři hodiny).

Přidá se 100 ml isopropanolu, zbytek v kádince se rozpustí nebo disperguje a titruje se 0,1N odměrným roztokem kyseliny chlorovodíkové v isopropanolu (5.2.1.3), přičemž se zaznamenává změna pH (5.2.2.2).

5.2.4 *Výpočet*

Jako v bodě 5.1.4. První inflexní bod leží přibližně u měřené hodnoty pH 9.

5.3 **Opakovatelnost**⁽³⁾

Pro výrobky obsahující asi 5 % (m/m) hydroxidu sodného nebo draselného, vyjádřeno jako hydroxid sodný, nesmí rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení na stejném vzorku překročit absolutní hodnotu 0,25 %.

KVANTITATIVNÍ A KVALITATIVNÍ STANOVENÍ KYSELINY ŠŤAVELOVÉ A JEJÍCH ALKALICKÝCH SOLÍ V PROSTŘEDCÍCH URČENÝCH PRO PÉČI O VLASY

(Směrnice komise 80/1335/EHS z 22. prosince 1980)

1. ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ

Níže popsaná metoda je vhodná ke kvantitativnímu a kvalitativnímu stanovení kyseliny šťavelové a jejích alkalických solí v prostředcích pro péči o vlasy. Lze ji použít u bezbarvých vodných nebo alkoholových roztoků a lotionů, které obsahují asi 5 % kyseliny šťavelové nebo ekvivalentní množství alkalického šťavelanu.

2. DEFINICE

Obsah kyseliny šťavelové a/nebo jejích alkalických solí stanovený touto metodou se vyjádří v hmotnostních procentech (m/m) volné kyseliny šťavelové ve vzorku.

3. PRINCIP

Po odstranění všech přítomných anionických povrchově aktivních látek pomocí hydrochloridu *p*-toluidinu se kyselina šťavelová a/nebo alkalické šťavelany vysráží jako šťavelan vápenatý a roztok se zfiltruje. Sraženina se rozpustí v kyselině sírové a titruje se manganistanem draselným.

4. REAKČNÍ ČINIDLA

Všechna použitá reakční činidla musí být čistoty p.a.

³ Viz ČSN ISO 5725.

- 4.1 Roztok octanu amonného, 5 % (m/m)
- 4.2 Roztok chloridu vápenatého, 10 % (m/m)
- 4.3 Ethanol, 95 % (V/V)
- 4.4 Chlorid uhličitý
- 4.5 Diethylether
- 4.6 Roztok *p*-toluidin-hydrochloridu, 6,8 % (m/m)
- 4.7 Roztok manganistanu draselného, 0,1N
- 4.8 Kyselina sírová, 20 % (m/m)
- 4.9 Kyselina chlorovodíková, 10 % (m/m)
- 4.10 Octan sodný, trihydrát
- 4.11 Ledová kyselina octová
- 4.12 Kyselina sírová (1:1)
- 4.13 Nasycený roztok hydroxidu barnatého

5. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

- 5.1 Dělicí nálevky na 500 ml
- 5.2 Kádinky na 50 a 600 ml
- 5.3 Skleněné filtrační kelímky, G4
- 5.4 Odměrné válce na 25 a 100 ml
- 5.5 Pipety na 10 ml
- 5.6 Odsávačky na 500 ml
- 5.7 Vodní vývěva
- 5.8 Teploměr se stupnicí od 0 do 100 °C
- 5.9 Magnetická míchačka s vyhřívanou deskou
- 5.10 Magnetické míchadélko potažené teflonem
- 5.11 Byreta na 25 ml
- 5.12 Erlenmeyerovy baňky na 250 ml

6. POSTUP

- 6.1 Do kádinky na 50 ml se naváží 6 až 7 g vzorku, pH se nastaví na hodnotu 3 zředěnou kyselinou chlorovodíkovou (4.9) a roztok se převede do dělicí nálevky 100 mililitry destilované vody. Postupně se přidá 25 ml ethanolu (4.3), 25 ml roztoku *p*-toluidin-hydrochloridu (4.6) a 25 až 30 ml chloridu uhličitého (4.4) a obsah se prudce protřepe.
- 6.2 Po oddělení fází se spodní (organická) vrstva odpustí, extrakce se opakuje po přidání reakčních činidel uvedených v bodě 6.1 a organická vrstva se znovu odpustí.
- 6.3 Vodná vrstva se převede do kádinky na 600 ml a případný chlorid uhličitý se odstraní povařením roztoku.
- 6.4 Přidá se 50 ml roztoku octanu amonného (4.1), roztok se přivede k varu (5.9) a za varu se do něj vmíchá 10 ml horkého roztoku chloridu vápenatého (4.2); sraženina se nechá usadit.

- 6.5 Úplnost vysrážení se ověří přidáním několika kapek roztoku chloridu vápenatého (4.2), roztok se nechá vychladnout na pokojovou teplotu a poté se do něj vmíchá 200 ml ethanolu (4.3); (5.10); nechá se 30 minut stát.
- 6.6 Supernatant se odfiltruje přes skleněný filtrační kelímek (5.3), sraženina se převede do filtračního kelímku pomocí malého množství horké vody (50 až 60 °C) a promyje se studenou vodou.
- 6.7 Sraženina se pětkrát promyje malým množstvím ethanolu (4.3), pětkrát malým množstvím diethyletheru (4.5) a rozpustí se v 50 ml horké kyseliny sírové (4.8), která se nechá protéci filtračním kelímek za podtlaku.
- 6.8 Roztok se kvantitativně převede do Erlenmeyerovy baňky (5.11) a titruje se roztokem manganistanu draselného (4.7) do slabě růžového zbarvení.

7. VÝPOČET

Obsah kyseliny šťavelové ve vzorku vyjádřený v hmotnostních procentech se vypočte ze vzorce

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

kde

A = spotřeba 0,1N roztoku manganistanu draselného podle bodu 6.8,

E = navážka vzorku v gramech (6.1),

4,50179 = přepočítávací faktor pro kyselinu šťavelovou.

8. OPAKOVATELNOST⁽³⁾

Pro výrobky obsahující asi 5 % (m/m) kyseliny šťavelové nesmí rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení na stejném vzorku překročit absolutní hodnotu 0,15 %.

9. KVALITATIVNÍ STANOVENÍ

9.1 Princip

Kyselina šťavelová a/nebo šťavelany se vysrážejí jako šťavelan vápenatý a rozpustí v kyselině sírové. Do roztoku se přidá malé množství roztoku manganistanu draselného, který se odbarví za vzniku oxidu uhličitého. Projde-li vzniklý oxid uhličitý roztokem hydroxidu barnatého, vytvoří se bílá sraženina (mléčný zákal) uhličitanu barnatého.

9.2 Postup

- 9.2.1 Část vzorku, který má být analyzován, se podrobí postupu popsanému v bodech 6.1 až 6.3; odstraní se tak případně přítomné detergenty.
- 9.2.2 K přibližně 10 ml roztoku podle bodu 9.2.1 se přidá na špičku špachtle octanu sodného (4.10) a roztok se okyselí několika kapkami ledové kyseliny octové (4.11).
- 9.2.3 Přidá se 10% roztok chloridu vápenatého (4.2) a roztok se zfiltruje. Sraženina šťavelanu vápenatého se rozpustí ve 2 ml kyseliny sírové (1:1) (4.12).
- 9.2.4 Roztok se převede do zkumavky a po kapkách přidá se asi 0,5 ml 0,1N roztoku manganistanu draselného (4.7). Za přítomnosti šťavelanu se roztok odbarví, nejprve pomalu a potom rychle.

³ Viz ČSN ISO 5725.

- 9.2.5 Ihned po přidání roztoku manganistanu draselného se zkumavka uzavře zátkou s trubičkou, obsah se mírně zahřeje a vzniklý oxid uhličitý se jímá do nasyceného roztoku hydroxidu barnatého (4.13). Vznik mléčného zákalu uhličitanu barnatého během tří až pěti minut indikuje přítomnost kyseliny šťavelové.

KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ CHLOROFORMU V ZUBNÍ PASTĚ

(Směrnice komise 80/1335/EHS z 22. prosince 1980)

1. ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ

Metoda se používá pro kvantitativní stanovení chloroformu v zubní pastě plynovou chromatografií. Je vhodná pro stanovení chloroformu o koncentraci 5 % nebo nižší. V současné době platí zákaz používání chloroformu v kosmetických prostředcích.

2. DEFINICE

Obsah chloroformu ve vzorku stanovený touto metodou se vyjádří v hmotnostních procentech vztažených na hmotnost výrobku.

3. PRINCIP

Zubní pasta se suspenduje ve směsi dimethylformamid/methanol, ke které se přidá známé množství acetonitrilu jako vnitřní standard. Po odstředění se část kapalné fáze analyzuje plynovou chromatografií a vypočte se obsah chloroformu.

4. REAKČNÍ ČINIDLA

Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a.

4.1 Porapak Q, Chromosorb 101 nebo ekvivalent, 80 až 100 mesh

4.2 Acetonitril

4.3 Chloroform

4.4 Dimethylformamid

4.5 Methanol

4.6. Roztok vnitřního standardu

5 ml dimethylformamidu (4.4) se pipetuje do odměrné baňky na 50 ml, přidá se asi 300 mg přesně zváženého množství acetonitrilu (M mg), doplní se po rysku dimethylformamidem a promíchá.

4.7 Roztok ke stanovení faktoru relativní odezvy

Přesně 5 ml roztoku vnitřního standardu (4.6) se pipetuje do odměrné baňky na 10 ml a přidá se asi 300 mg přesně zváženého množství chloroformu (M_1 mg). Doplní se po rysku dimethylformamidem a promíchá.

5. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

5.1 Analytické váhy

5.2 Plynový chromatograf s plamenovým ionizačním detektorem

5.3 Mikrostříkačka na 5 až 10 μ l, dělená po 0,1 μ l

5.4 Nedělené pipety na 1, 4 a 5 ml

- 5.5 Odměrné baňky na 10 a 50 ml
- 5.6 Zkumavky na asi 20 ml se šroubovým uzávěrem, Sovirel Francie č. 20 nebo ekvivalentní. Šroubový uzávěr má vnitřní těsnící plochu potaženou teflonem.
- 5.7 Odstředivka
6. POSTUP
- 6.1 **Doporučené chromatografické podmínky**
- 6.1.1 Materiál kolony: sklo
délka: 150 cm
vnitřní průměr: 4 mm
vnější průměr: 6 mm
- 6.1.2 Kolona se naplní Porapakem Q, Chromosorbem 101 nebo ekvivalentní náplní, 80 až 100 mesh (4.1).
- 6.1.3 Detektor: plamenový ionizační, citlivost se nastaví tak, aby při nástřiku 3 μ l roztoku 4.7 činila výška píku acetonitrilu asi tři čtvrtiny celé škály zapisovače.
- 6.1.4 *Plyny:*
Nosný plyn: dusík, průtok 65 ml/min.
Pomocný plyn: vodík, vzduch nebo kyslík
Průtok plynů do detektoru se nastaví tak, aby průtok vzduchu nebo kyslíku byl pěti- až desetinásobkem průtoku vodíku.
- 6.1.5 *Teplota:*
nástřik 210 °C
detektor 210 °C
kolona 175 °C
- 6.1.6 *Rychlost posuvu papíru:*
asi 100 cm za hodinu.
- 6.2 **Příprava vzorku**
Vzorek k analýze se odebere z dosud neotevřené tuby. Vytlačí se jedna třetina obsahu, tuba se uzavře, obsah se důkladně promíchá a odebere se zkušební vzorek.
- 6.3 **Kvantitativní stanovení**
- 6.3.1 Do zkumavky se šroubovým uzávěrem (5.6) se naváží s přesností na 10 mg 6 až 7 gramů zubní pasty (M_0 gramů) podle bodu 6.2 a přidají se tři malé skleněné kuličky.
- 6.3.2 Do zkumavky se odpipetuje přesně 5 ml roztoku vnitřního standardu (4.6), 4 ml dimethylformamidu (4.4) a 1 ml methanolu (4.5), zkumavka se uzavře a obsah se promíchá.
- 6.3.3 Uzavřená zkumavka se vloží na půl hodiny do třepačky a poté se 15 minut odstředuje při otáčkách, při nichž dojde ke zřetelnému oddělení fází.
Poznámka: Občas dojde k tomu, že po odstředění je kapalná fáze stále zakalená. Určitého zlepšení lze dosáhnout přidáním 1 až 2 gramů chloridu sodného ke kapalné fázi a novým odstředěním po usazení.
- 6.3.4 3 μ l tohoto roztoku (6.3.3) se nastříknou za podmínek popsanych v bodě 6.1. Postup se opakuje. Za výše uvedených podmínek mohou být vodítkem tyto retenční časy:

methanol	přibližně 1 minuta,
acetonitril	přibližně 2,5 minuty,
chloroform	přibližně 6 minut,
dimethylformamid	> 15 minut.

6.3.5 Stanovení faktoru relativní odezvy

Pro stanovení tohoto faktoru se nastříknou 3 µl roztoku podle bodu 4.7. Postup se opakuje. Faktor relativní odezvy se stanovuje každý den.

7. VÝPOČET

7.1 Výpočet relativní odezvy

7.1.1 Změří se výška píků acetonitrilu a chloroformu a jejich šířka v polovině výšky a jejich plocha se vypočte podle vzorce: výška × šířka v polovině výšky.

7.1.2 Stanoví se plocha píků acetonitrilu a chloroformu v chromatogramu zaznamenaném za podmínek podle bodu 6.3.5 a vypočte se relativní odezva f_s z následujícího vzorce:

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

kde

f_s = faktor relativní odezvy pro chloroform,

A_s = plocha píku chloroformu (6.3.5),

A_i = plocha píku acetonitrilu (6.3.5),

M_s = množství chloroformu v mg na 10 ml roztoku podle bodu 6.3.5 (= M_1),

M_i = množství acetonitrilu v mg na 10 ml roztoku podle bodu 6.3.5 (= $1/10M$).

Vypočte se průměr z naměřených hodnot.

7.2 Výpočet obsahu chloroformu

7.2.1 Postupem podle bodu 7.1.1 se vypočte plocha píků chloroformu a acetonitrilu v chromatogramu zaznamenaném postupem uvedeným v bodě 6.3.4.

7.2.2 Obsah chloroformu v zubní pastě se vypočte pomocí následujícího vzorce:

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

kde

$\%X$ = obsah chloroformu v zubní pastě vyjádřený v hmotnostních procentech,

A_s = plocha píku chloroformu (6.3.4),

A_i = plocha píku acetonitrilu (6.3.4),

M_{SX} = hmotnost vzorku podle bodu 6.3.1 v mg (= $1000 \cdot M_0$),

M_i = množství acetonitrilu v mg na 10 ml roztoku podle bodu 6.3.2 (= $1/10M$).

Vypočte se průměr zjištěných hodnot a výsledek se vyjádří s přesností na 0,1 %.

8. OPAKOVATELNOST⁽³⁾

Pro výrobky obsahující asi 3 % (m/m) chloroformu nesmí rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení na stejném vzorku překročit absolutní hodnotu 0,3 %.

KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ ZINKU

(Směrnice komise 80/1335/EHS z 22. prosince 1980)

1. ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ

Metoda je vhodná pro stanovení zinku přítomného v kosmetických prostředcích ve formě chloridu, síranu nebo 4-hydroxybenzensulfonátu zinečnatého, nebo jako kombinace těchto solí.

2. DEFINICE

Obsah zinku ve vzorku se stanoví gravimetricky jako bis(2-methyl-8-oxochinolinát) zinečnatý a vyjádří se v hmotnostních procentech zinku ve vzorku.

3. PRINCIP

Zinek přítomný v roztoku se vysráží v kyselém prostředí jako bis(2-methyl-8-oxochinolinát) zinečnatý. Po filtraci se sraženina usuší a zváží.

4. REAKČNÍ ČINIDLA

Všechna použitá reakční činidla musí být čistoty p.a.

4.1 Koncentrovaný čpavek, 25 % (m/m); $d_4^{20} = 0,91$ g/ml

4.2 Ledová kyselina octová

4.3 Octan amonný

4.4 2-methylchinolin-8-ol

4.5 Roztok čpavku, 6 % (m/V)

240 g koncentrovaného roztoku čpavku (4.1) se převede do odměrné baňky na 1000 ml, doplní se po rysku destilovanou vodou a promíchá.

4.6 Roztok octanu amonného, 0,2M

15,4 g octanu amonného (4.3) se rozpustí v destilované vodě, v odměrné baňce na 1000 ml se doplní po rysku a promíchá.

4.7 Roztok 2-methylchinolin-8-olu

5 g 2-methylchinolin-8-olu se rozpustí ve 12 ml ledové kyseliny octové, převede se destilovanou vodou do odměrné baňky na 100 ml. Doplní se po rysku destilovanou vodou a promíchá.

5. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

5.1 Odměrné baňky na 100 a 1000 ml

5.2 Kádinky na 400 ml

5.3 Odměrné válce na 50 a 150 ml

³ Viz ČSN ISO 5725

- 5.4 Dělené pipety na 10 ml
- 5.5 Skleněné filtrační kelímky G-4
- 5.6 Odsávačky na 500 ml
- 5.7 Vodní vývěva
- 5.8 Teploměr se stupnicí od 0 do 100 °C
- 5.9 Exsikátor se vhodným sušicím prostředkem a indikátorem vlhkosti, např. se silikagelem nebo rovnocenným sušicím prostředkem
- 5.10 Sušárna nastavená na teplotu 150 ± 2 °C
- 5.11 pH-metr
- 5.12 Topná deska
- 5.13 Filtrační papír Whatman č.4 nebo ekvivalentní

6. POSTUP

- 6.1 Do kádinky na 400 ml se naváží 5 až 10 g (M gramů) analyzovaného vzorku, který obsahuje asi 50 až 100 mg zinku, přidá se 50 ml destilované vody a promíchá.
 - 6.1.1 Směs se podle potřeby zfiltruje pomocí vývěvy a filtrát se zachytí.
 - 6.1.2 Extrakce se opakuje s dalšími 90 ml destilované vody. Zfiltruje se a filtráty se spojí.
- 6.2 Na každých 10 mg zinku přítomného v roztoku (6.1) se přidají 2 ml roztoku 2-methylchinolin-8-olu (4.7) a promíchá se.
- 6.3 Směs se zředí 150 ml destilované vody, ohřeje na 60 °C (5.12) a za stálého míchání se přidá 45 ml roztoku 0,2M octanu amonného (4.6).
- 6.4 pH roztoku se za stálého míchání upraví na 5,7 až 5,9 přidáním 6 % roztoku čpavku (4.5); pH roztoku se měří pH-metrem.
- 6.5 Roztok se ponechá 30 minut stát. Poté se zfiltruje pomocí vodní vývěvy přes filtrační kelímek G-4, předem usušený (150 °C) a po vychladnutí zvážený (M_0 gramů); sraženina se promyje 150 ml destilované vody ohřáté na 95 °C.
- 6.6 Kelímek se vloží do sušárny vyhřáté na 150 °C a suší se jednu hodinu.
- 6.7 Kelímek se vyjme ze sušárny, vloží se do exsikátoru (5.9) a po vychladnutí na pokojovou teplotu se zváží (M_1 gramů).

7. VÝPOČET

Obsah zinku ve vzorku vyjádřený v hmotnostních procentech (% m/m) se vypočte pomocí vzorce:

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

kde

M = hmotnost vzorku odebraného podle bodu 6.1 v gramech,

M_0 = hmotnost prázdného suchého filtračního kelímku (6.5) v gramech,

M_1 = hmotnost filtračního kelímku se sraženinou (6.7) v gramech.

8. OPAKOVATELNOST⁽³⁾

Pro výrobky obsahující asi 1 % (m/m) zinku nesmí rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení na stejném vzorku překročit absolutní hodnotu 0,1 %.

KVALITATIVNÍ A KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ KYSELINY 4-HYDROXYBENZENSULFONOVÉ

(Směrnice komise 80/1335/EHS z 22. prosince 1980)

1. ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ

Metoda je vhodná pro důkaz a stanovení kyseliny 4-hydroxybenzensulfonové v kosmetických prostředcích, např. v aerosolech a v pleťových lotionech.

2. DEFINICE

Obsah kyseliny 4-hydroxybenzensulfonové ve výrobku stanovený touto metodou se vyjádří v hmotnostních procentech jako bezvodý 4-hydroxybenzensulfonát zinečnatý.

3. PRINCIP

Zkušební vzorek se zahustí za sníženého tlaku, rozpustí se ve vodě a přečistí extrakcí chloroformem. Kyselina 4-hydroxybenzensulfonová se stanoví jodometricky v alikvotním podílu zfiltrovaného vodného roztoku.

4. REAKČNÍ ČINIDLA

Všechna použitá reakční činidla musí být čistoty p.a.

4.1 Koncentrovaná kyselina chlorovodíková, 36 % (m/m), ($d_4^{20} = 1,18$ g/ml)

4.2 Chloroform

4.3 Butan-1-ol

4.4 Ledová kyselina octová

4.5 Jodid draselný

4.6 Bromid draselný

4.7 Uhličitan sodný

4.8 Kyselina sulfanilová

4.9 Dusitan sodný

4.10 Roztok bromičnanu draselného, 0,1N

4.11 Roztok thiosíranu sodného, 0,1N

4.12 Vodný roztok škrobu, 1 % (m/V)

4.13 Vodný roztok uhličitanu sodného, 2 % (m/V)

4.14 Vodný roztok dusitanu sodného, 4,5 % (m/V)

4.15 Roztok dithizonu v chloroformu, 0,05 % (m/V)

³ Viz ČSN ISO 5725

4.16 Vyvíjecí rozpouštědlo: butan-1-ol / ledová kyselina octová / voda (4:1:5 V/V/V); po smíchání v dělicí nálevce se spodní vrstva odstraní.

4.17 Paulyho činidlo

4,5 g kyseliny sulfanilové (4.8) se rozpustí ve 45 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové (4.1) za zahřívání a roztok se zředí vodou na 500 ml. 10 ml roztoku se ochladí v misce s ledovou vodou a za míchání se přidá 10 ml chladného roztoku dusitanu sodného (4.14). Roztok se ponechá stát 15 minut při 0 °C (za této teploty je roztok stabilní po jeden až tři dny) a bezprostředně před nanesením (7.5) se přidá 20 ml roztoku uhličitanu sodného (4.13).

4.18 Hotové celulózové desky pro chromatografii na tenké vrstvě; velikost 20×20 cm, tloušťka vrstvy sorbentu 0,25 mm.

5. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

5.1 Baňky na 100 ml s kulatým dnem a se zabroušenou zátkou

5.2 Dělicí nálevka na 100 ml

5.3 Zabroušená Erlenmeyerova baňka na 250 ml

5.4 Byreta na 25 ml

5.5 Nedělené pipety na 1, 2 a 10 ml

5.6 Dělená pipeta na 5 ml

5.7 Mikrostříkačka na 10 µl dělená po 0,1 µl

5.8 Teploměr se stupnicí od 0 do 100 °C

5.9 Vodní lázeň s vyhříváním

5.10 Sušárna s nucenou ventilací nastavená na teplotu 80 °C

5.11 Obvyklé vybavení pro chromatografii na tenké vrstvě

6. PŘÍPRAVA VZORKU

V níže popsané metodě pro kvalitativní a kvantitativní stanovení kyseliny hydroxybenzensulfonové v aerosolech lze využít zbytku získaného poté, co se z aerosolové nádoby odpustí rozpouštědla a hnací plyny, které se za normálního tlaku odpaří.

7. KVALITATIVNÍ STANOVENÍ

7.1 Pomocí mikrostříkačky (5.7) se nanese 5 µl zbytku (6) nebo vzorku do šesti bodů počáteční linie ve vzdálenosti 1 cm od spodního okraje desky pro chromatografii na tenké vrstvě (4.18).

7.2 Deska se umístí do vyvíjecí komory obsahující vyvíjecí rozpouštědlo (4.16) a vyvíjí se, dokud čelo rozpouštědla nedosáhne 15 cm od startovací linie.

7.3 Deska se vyjme z lázně a suší se při 80 °C, dokud nezmizí zápach kyseliny octové. Deska se potříká roztokem uhličitanu sodného (4.13) a suší se na vzduchu.

7.4 Jedna polovina desky se zakryje skleněnou deskou a nezakrytá část se postříká 0,05% roztokem dithizonu (4.15). Vznik purpurově červených skvrn na chromatogramu indikuje přítomnost zinečnatých iontů.

7.5 Posříkaná část desky se přikryje skleněnou deskou a zbývající část se skropí Paulyho činidlem (4.17). Přítomnost kyseliny 4-hydroxybenzensulfonové je indikována vznikem žlutohnědé skvrny s hodnotou R_f kolem 0,26, zatímco žlutá skvrna s hodnotou R_f asi 0,45 na chromatogramu indikuje přítomnost kyseliny 3-hydroxybenzensulfonové.

8. KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ

- 8.1 Do baňky na 100 ml s kulatým dnem se naváží 10 g vzorku nebo zbytku (6) a odpaří se téměř do sucha ve vakuu v rotační odparce umístěné na vodní lázni při 40 °C.
- 8.2 Do lahve se odpipetuje 10,0 ml vody (V_1 ml) a odparek (8.1) se zahřátím rozpustí.
- 8.3 Roztok se kvantitativně převede do dělicí nálevky (5.2) a extrahuje se dvakrát vždy 20 ml chloroformu (4.2). Po každé extrakci se chloroformová fáze odstraní.
- 8.4 Vodný roztok se zfiltruje přes skládaný filtr. Podle očekávaného obsahu kyseliny hydroxybenzensulfonové se 1,0 nebo 2,0 ml (V_2 ml) filtrátu napipetují do Erlenmeyerovy baňky na 250 ml (5.3) a zředí se na 75 ml vodou.
- 8.5 Přidá se 2,5 ml 36% kyseliny chlorovodíkové (4.1) a 2,5 g bromidu draselného (4.6), roztok se promíchá a zahřeje na vodní lázni na 50 °C.
- 8.6 Z byrety se připouští 0,1N roztok bromičnanu draselného (4.10), dokud se roztok při 50 °C nezbarví žlutě.
- 8.7 Přidají se další 3 ml roztoku bromičnanu draselného (4.10), baňka se uzavře a nechá stát 10 minut na vodní lázni při 50 °C.
Jestliže se během 10 minut roztok odbarví, přidají se další 2,0 ml roztoku bromičnanu draselného (4.10), baňka se uzavře a zahřívá 10 minut na vodní lázni při 50 °C. Zaznamená se celkové množství přidaného roztoku bromičnanu draselného (a).
- 8.8 Roztok se ochladí na pokojovou teplotu, přidají se 2 g jodidu draselného (4.5) a roztok se zamíchá.
- 8.9 Uvolněný jod se titruje 0,1N roztokem thiosíranu sodného (4.11). Ke konci titrace se přidá několik kapek roztoku škrobu (4.12) jako indikátoru. Zaznamená se spotřebovaný objem roztoku thiosíranu (b).

9. VÝPOČET

Obsah hydroxybenzensulfonátu zinečnatého ve vzorku nebo zbytku (6) vyjádřený v hmotnostních procentech (% m/m) se vypočte ze vzorce:

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

kde

a = celkové množství přidaného 0,1N roztoku bromičnanu draselného (8.7) v mililitrech,

b = celkové množství 0,1N roztoku thiosíranu sodného spotřebovaného při zpětné titraci (8.9),

m = množství analyzovaného vzorku nebo zbytku (8.1) v miligramech,

V_1 = objem roztoku získaného podle bodu (8.2) v mililitrech,

V_2 = objem rozpuštěného zbytku po odpaření použitého k analýze (8.4) v mililitrech.

Poznámka: Při analýze aerosolů musí být výsledek stanovení v hmotnostních procentech % (m/m) zbytku (6) přepočten na původní výrobek. Za tímto účelem viz pravidla odběru aerosolů.

10. OPAKOVATELNOST⁽³⁾

Pro výrobky obsahující asi 5 % (m/m) hydroxybenzensulfonátu zinečnatého nesmí rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení na stejném vzorku překročit absolutní hodnotu 0,5 %.

11. INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Podle vyhlášky Ministerstva zdravotnictví č. 26/2001 Sb., o hygienických požadavcích na kosmetické prostředky, o náležitostech žádosti o neuvedení ingredience na obalu kosmetického prostředku a o požadavcích na vzdělání a praxi fyzické osoby odpovědné za výrobu kosmetického prostředku (o kosmetických prostředcích) je nejvyšší povolená koncentrace 4-hydroxybenzensulfonátu zinečnatého v pleťových lotionech a v deodorantech 6 % (m/m). To znamená, že vedle obsahu kyseliny hydroxybenzensulfonové musí být stanoven i obsah zinku. Vynásobením vypočteného obsahu hydroxybenzensulfonátu zinečnatého (9) faktorem 0,1588 se získá minimální obsah zinku v % (m/m), který musí být teoreticky přítomen ve výrobku s ohledem na stanovený obsah kyseliny hydroxybenzensulfonové. Skutečný, gravimetricky stanovený obsah zinku (viz příslušné předpisy) však může být vyšší, neboť kosmetické prostředky mohou obsahovat také chlorid zinečnatý a síran zinečnatý.

KVALITATIVNÍ STANOVENÍ OXIDAČNÍCH ČINIDEL A KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ PEROXIDU VODÍKU V PROSTŘEDCÍCH URČENÝCH PRO PÉČI O VLASY

(Směrnice komise 82/434/EHS ze 14. května 1982)

ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ

Jodometrické stanovení peroxidu vodíku v kosmetice je možné pouze za nepřítomnosti jiných oxidačních činidel, vytvářejících jod z jodidů. Z tohoto důvodu je před jodometrickým stanovením peroxidu vodíku nutné zjistit a identifikovat jakákoli jiná přítomná oxidační činidla. Toto kvalitativní stanovení se dělí do dvou fází; první zahrnuje peroxodisírany, bromičnany a peroxid vodíku, druhá peroxid barnatý.

A. KVALITATIVNÍ STANOVENÍ PEROXODISÍRANŮ, BROMIČNANŮ A PEROXIDU VODÍKU

1. PRINCIP

Peroxodisíran sodný, peroxodisíran draselný a peroxodisíran amonný, bromičnan draselný, bromičnan sodný a peroxid vodíku – bez ohledu na to, zda pochází či nepochází z peroxidu barnatého – se identifikují pomocí sestupné papírové chromatografie, při které se používá dvou vyvíjecích rozpouštědel.

2. REAKČNÍ ČINIDLA

Všechna použitá reakční činidla musí být čistoty p.a.

2.1 0,5% (m/V) vodné referenční roztoky následujících sloučenin:

2.1.1 Peroxodisíran sodný

³ Viz ČSN ISO 5725

- 2.1.2 Peroxodisíran draselný
- 2.1.3 Peroxodisíran amonný
- 2.1.4 Bromičnan draselný
- 2.1.5 Bromičnan sodný
- 2.1.6 Peroxid vodíku
- 2.2 Vytvájecí rozpouštědlo A, 80% (V/V) ethanol
- 2.3 Vytvájecí rozpouštědlo B, benzen – methanol – 3-methyl-butan-1-ol – voda (34 : 38 : 18 : 10, V/V/V/V)
- 2.4 Detekční činidlo A, 10% (m/V) vodný roztok jodidu draselného
- 2.5 Detekční činidlo B, 1% (m/V) vodný roztok škrobu
- 2.6 Detekční činidlo C, 10% (m/m) kyselina chlorovodíková
- 2.7 Kyselina chlorovodíková, 4N
- 3. PŘÍSTROJE A POMŮCKY
 - 3.1 Chromatografický papír (papír Whatman č. 3 nebo č. 4 nebo jejich ekvivalenty)
 - 3.2 Mikropipeta na 1 µl
 - 3.3 Odměrné baňky na 100 ml
 - 3.4 Skládání filtry
 - 3.5 Zařízení pro sestupnou papírovou chromatografii
- 4. PŘÍPRAVA VZORKU
 - 4.1 **Prostředky rozpustné ve vodě**

Od každého vzorku se připraví dva roztoky rozpuštěním 1 g a 5 g prostředku ve 100 ml vody. 1 µl každého z těchto roztoků se použije pro provedení papírové chromatografie popsané v oddíle 5.
 - 4.2 **Prostředky částečně rozpustné ve vodě**

Naváží se 1 g a 5 g vzorku a rozptýlí se v 50 ml vody, v obou případech se doplní vodou na 100 ml a promíchají se. Obě suspenze se přefiltrují přes skládaný filtr (3.4) a z každého z filtrátů se použije 1 µl pro provedení papírové chromatografie popsané v oddíle 5.

 - 4.2.2 Ještě jednou se připraví dvě suspenze vzorků rozptýlením 1 g a 5 g v 50 ml vody, okyselí se zředěnou kyselinou chlorovodíkovou (2.7), doplní se vodou na 100 ml a promíchají se. Disperze se přefiltrují přes skládaný filtr (3.4) a 1 µl každého z těchto roztoků se použije pro provedení papírové chromatografie popsané v oddíle 5.
 - 4.3 **Krémy**

5 g a 20 g každého prostředku se rozptýlí ve 100 ml vody a disperze se použijí pro provedení papírové chromatografie popsané v oddíle 5.
- 5. METODA
 - 5.1 Přiměřené množství rozpouštědel A (2.2) a B (2.3) se umístí do dvou oddělených chromatografických komor, aby se provedla sestupná papírová chromatografie. Chromatografické komory se sytí párami rozpouštědla alespoň 24 hodin.
 - 5.2 1 µl roztoku vzorku a všech referenčních roztoků připravených podle oddílu 4 a bodu 2.1 se nanese na startovní body proužku chromatografického papíru (Whatman

- č. 3 nebo ekvivalentní) 40 cm dlouhého a 20 cm širokého (3.1) nebo jiných vhodných rozměrů a rozpouštědlo se nechá odpařit na vzduchu.
- 5.3 Chromatografický proužek (5.2) se umístí do chromatografické komory tanku naplněné vyvíjecím rozpouštědlem A (5.1) a vyvíjí se, dokud čelo rozpouštědla nepostoupí o 35 cm (asi 15 hodin).
- 5.4 Postup popsaný v bodech 5.2 a 5.3 se opakuje za použití chromatografického papíru (Whatman č. 4 nebo ekvivalentní) (3.1) a vyvíjecího roztoku B. Chromatografie probíhá, dokud čelo rozpouštědla nepostoupí o 35 cm (asi pět hodin).
- 5.5 Po ukončení vyvíjení se chromatogramy vyjmou a usuší se na vzduchu.
- 5.6 Skvrny se objeví po následném postříkání:
- 5.6.1 detekčním činidlem A a krátce poté detekčním činidlem B (2.5). Skvrny peroxidisíranů se na chromatogramu objeví nejdříve a budou je následovat skvrny peroxidu vodíku. Skvrny se označí tužkou;
- 5.6.2 detekčním činidlem C (2.6) na chromatogramech získaných podle bodu 5.6.1; přítomnost bromičnanů se projeví šedavě modrými skvrnami na chromatogramu.
- 5.7 Za výše zmíněných podmínek vztahujících se k vyvíjecím rozpouštědlům A (2.2) a B (2.3) jsou hodnoty R_f referenčních látek (2.1) přibližně následující:

	Vyvíjecí rozpouštědlo A (2.2)	Vyvíjecí rozpouštědlo B (2.3)
Peroxodisíran sodný	0,40	0,10
Peroxodisíran draselný	0,40	0,02 + 0,05
Peroxodisíran amonný	0,50	0,10 + 0,20
Bromičnan sodný	0,40	0,20
Bromičnan draselný	0,40	0,10 + 0,20
Peroxid vodíku	0,80	0,80

B. KVALITATIVNÍ STANOVENÍ PEROXIDU BARNATÉHO

1. PRINCIP

Peroxid barnatý se identifikuje na základě tvorby peroxidu vodíku po okyselení vzorku (A.4.2) a na základě přítomnosti barnatých iontů:

- v nepřítomnosti peroxidisíranů (A) přidávkem zředěné kyseliny sírové do části kyselého roztoku vzorku (B.4.1), čímž vznikne bílá sraženina síranu barnatého. Přítomnost barnatých iontů ve vzorku (B.4.1) se opět potvrdí papírovou chromatografií způsobem popsaným níže (B.5),
- ve vzorcích, ve kterých jsou peroxid barnatý a peroxidisírany přítomny současně (B.4.2), vyloužením zbytku z roztoku (B.4.2) v alkalickém prostředí; po rozpuštění taveniny (B.4.2.3) v kyselině chlorovodíkové se přítomnost barnatých iontů potvrdí papírovou chromatografií a/nebo vysrážením síranu barnatého.

2. REAKČNÍ ČINIDLA

2.1 Methanol

2.2 Koncentrovaná kyselina chlorovodíková, 36% (m/m)

2.3 Kyselina chlorovodíková, 6N

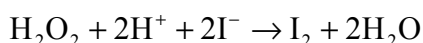
- 2.4 Kyselina sírová, 4N
- 2.5 Disodná sůl kyseliny rhodizonové
- 2.6 Chlorid barnatý ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- 2.7 Bezvodý uhličitan sodný
- 2.8 Vodný roztok chloridu barnatého, 1% (m/V)
- 2.9 Vyvíjecí rozpouštědlo skládající se z methanolu, koncentrované kyseliny chlorovodíkové (koncentrace 36 %) a vody (80 : 10 : 10 ,V/V/V)
- 2.10 Detekční činidlo, 0,1% (m/V) vodný roztok disodné soli kyseliny rhodizonové, připravuje se bezprostředně před použitím
3. **PŘÍSTROJE A POMŮCKY**
 - 3.1 Mikropipeta na 5 μl
 - 3.2 Platinové kelímky
 - 3.3 Odměrné baňky na 100 ml
 - 3.4 Chromatografický papír Schleicher a Schull 2043 b nebo ekvivalentní. Papír se vyčistí tak, že se přes noc nechá vyvíjet v komoře pro sestupnou chromatografii (A.3.5), obsahující vyvíjecí rozpouštědlo, a poté se usuší.
 - 3.5 Skládání filtrační papír
 - 3.6 Obvyklé zařízení pro provádění vzestupné papírové chromatografie
4. **PŘÍPRAVA VZORKU**
 - 4.1 **Prostředky, ve kterých nejsou přítomny peroxidisírany**
 - 4.1.1 2 g prostředku se rozptýlí v 50 ml vody a pH suspenze se upraví přibližně na hodnotu 1 kyselinou chlorovodíkovou (B.2.3).
 - 4.1.2 Suspenze se pomocí vody převede do odměrné baňky na 100 ml, doplní se po rysku vodou a promíchá se. Tato suspenze se použije pro analýzu papírovou chromatografií popsanou v oddíle 5 a pro kvalitativní stanovení barya vysrážením síranu.
 - 4.2 **Prostředky, ve kterých jsou přítomny peroxidisírany**
 - 4.2.1 2 g prostředku se rozptýlí ve 100 ml vody a přefiltruje se.
 - 4.2.2 K vysušenému zbytku se přidá množství uhličitanu sodného odpovídající sedmi až desetinásobku hmotnosti zbytku (B.2.7), promíchá se a směs se půl hodiny taví v platinovém kelímku (B.3.2).
 - 4.2.3 Ochladí se na pokojovou teplotu, tavenina se rozpustí v 50 ml vody a přefiltruje se (B.3.5).
 - 4.2.4 Zbytek z taveniny se rozpustí v kyselině chlorovodíkové (B.2.3) a doplní se vodou na 100 ml. Tento roztok se použije pro analýzu papírovou chromatografií popsanou v oddíle 5 a pro kvalitativní stanovení barya vysrážením síranu.
5. **METODA**
 - 5.1 Přiměřené množství vyvíjecího rozpouštědla (B.2.9) se umístí do komory pro vzestupnou chromatografii a komora se sytí alespoň 15 hodin.
 - 5.2 Na kus chromatografického papíru – předem upraveného tak, jak je popsáno v bodě B.3.4 – se nanese do tří startovních bodů 5 μl každého z roztoků připravených podle bodů B.4.1.2 a B.4.2.4 a referenční roztok B.2.8.

- 5.3 Vzorek a referenční skvrny se vysuší na vzduchu. Chromatogram se vyvíjí, dokud čelo rozpouštědla nepostoupí o 30 cm.
- 5.4 Chromatogram se vyjme z komory a usuší na vzduchu.
- 5.5 Skvrny na chromatogramu se objeví po postříkání papíru detekčním činidlem B.2.10. V přítomnosti barya se na chromatogramu objeví červené skvrny s hodnotou Rf asi 0,10.

C. KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ PEROXIDU VODÍKU

1. PRINCIP

Jodometrické stanovení peroxidu vodíku je založeno na následující reakci:



Tato konverze probíhá pomalu, může však být urychlena přidáním molybdenanu amonného. Vzniklý jod se stanoví titračně thiosíranem sodným a je mírou obsahu peroxidu vodíku.

2. DEFINICE

Obsah peroxidu vodíku změřený níže popsaným způsobem se vyjádří v hmotnostních procentech výrobku (% m/m).

3. REAKČNÍ ČINIDLA

Všechna reakční činidla musí být čistoty p. a.

- 3.1 Kyselina sírová, 2N
- 3.2 Jodid draselný
- 3.3 Molybdenan amonný
- 3.4 Thiosíran sodný, 0,1N
- 3.5 Roztok jodidu draselného, 10% (m/V), připravuje se bezprostředně před použitím
- 3.6 Roztok molybdenanu amonného, 20% (m/V)
- 3.7 Roztok škrobu, 1% (m/V)

4. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

- 4.1 Kádinky na 100 ml
- 4.2 Byreta na 50 ml
- 4.3 Odměrné baňky na 250 ml
- 4.4 Odměrné válce na 25 a 100 ml
- 4.5 Nedělené pipety na 10 ml
- 4.5 Erlenmeyerovy baňky na 250 ml

5. POSTUP

- 5.1 Do 100 ml kádinky se naváží 10 g (m gramů) výrobku, obsahujícího asi 0,6 g peroxidu vodíku. Obsah se pomocí vody převede do odměrné baňky na 250 ml, doplní se po rysku vodou a promíchá se.
- 5.2 10 ml roztoku vzorku (5.1) se odpipetuje do Erlenmeyerovy baňky na 250 ml (4.6) a postupně se přidá 100 ml 2N kyseliny sírové (3.1), 20 ml roztoku jodidu draselného (3.5) a tři kapky roztoku molybdenanu amonného (3.6).

- 5.3 Vzniklý jod se okamžitě titruje 0,1N roztokem thiosíranu sodného (3.4) a těsně před dosažením bodu ekvivalence se přidá několik mililitrů roztoku škrobu (3.7) jako indikátoru. Zaznamená se spotřeba 0,1N roztoku thiosíranu sodného (3.4) v mililitrech (V).
- 5.4 Způsobem popsaným v bodech 5.2 a 5.3 se provede slepý pokus, přičemž se nahradí 10 ml roztoku vzorku 10 ml vody. Zaznamená se spotřeba 0,1N roztoku thiosíranu sodného na slepý pokus (V_0 v ml).

6. VÝPOČET

Obsah peroxidu vodíku ve výrobku vyjádřený v hmotnostních procentech (% m/m) se vypočte pomocí následujícího vzorce:

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

ve kterém:

m = množství analyzovaného výrobku (5.1) v gramech,

V_0 = spotřeba 0,1N roztoku thiosíranu sodného na slepý pokus (5.4) v mililitrech,

V = spotřeba 0,1N roztoku thiosíranu sodného při titraci roztoku vzorku (5.3) v mililitrech.

7. OPAKOVATELNOST⁽³⁾

Pro výrobky obsahující asi 6 % (m/m) peroxidu vodíku nesmí rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení na stejném vzorku překročit absolutní hodnotu 0,2 %.

KVALITATIVNÍ A SEMIKVANTITATIVNÍ STANOVENÍ URČITÝCH OXIDAČNÍCH BARVIV V BARVÁCH NA VLASY

(Směrnice komise 82/434/EHS ze 14. května 1982)

1. ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ

Tato metoda je vhodná pro kvalitativní a semikvantitativní stanovení následujících látek v barvách na vlasy ve formě krému nebo kapaliny:

Látky	Symbol
<i>Fenylendiaminy</i>	
<i>o</i> -fenylendiamin	(OPD)
<i>m</i> -fenylendiamin	(MPD)
<i>p</i> -fenylendiamin	(PPD)

³ Viz ČSN ISO 5725

Látky	Symbol
<i>Methylfenylendiaminy</i>	
4-methyl-1,2-fenylendiamin (toluen-3,4-diamin)	(OTD)
4-methyl-1,3-fenylendiamin (toluen-2,4-diamin)	(MTD)
2-methyl-1,4-fenylendiamin (toluen-2,5-diamin)	(PTD)
<i>Diaminofenoly</i>	
2,4-diaminofenol	(DAP)
<i>Hydrochinon</i>	
Benzen-1,4-diol	(H)
<i>α-naftol</i>	(α -N)
<i>Pyrogallol</i>	
1,2,3-trihydroxybenzen	(P)
<i>Resorcinol</i>	
1,3-dihydroxybenzen	(R)

2. PRINCIP

Oxidační barviva se extrahují z barev ve formě krému nebo kapaliny při pH 10 96% ethanolom a identifikují se chromatografií na tenké vrstvě, a to jedno- nebo dvourozměrnou.

K semikvantitativnímu stanovení těchto látek se chromatogram vzorků porovná pomocí čtyř vyvíjecích systémů s chromatogramy referenčních látek vyvíjenými současně a za co nejpodobnějších podmínek.

3. REAKČNÍ ČINIDLA

Všechna reakční činidla musí být čistoty p. a.

- 3.1 Ethanol, bezvodý
- 3.2 Aceton
- 3.3 Ethanol, 96 % (V/V)
- 3.4 Roztok amoniaku, 25 % ($d_4^{20} = 0,91 \text{ g/ml}$)
- 3.5 L (+) - askorbová kyselina
- 3.6 Chloroform
- 3.7 Cyklohexan
- 3.8 Dusík, technický
- 3.9 Toluen
- 3.10 Benzen
- 3.11 n-butanol
- 3.12 Butan-2-ol
- 3.13 Kyselina fosforová, 50% roztok (V/V)
- 3.14 Diazotační činidlo. Buď:

- 3-nitro-1-benzendiazonium-chlorbenzensulfonát (ve formě stabilní soli), jako např. v červení 2 JN – Francolor,
 - 2-chlor-4-nitro-1-benzendiazonium-naftalenbenzoát (ve formě stabilní soli), jako např. v činidle NNCD – referenční č. 74 150 FLUKA,
- nebo ekvivalentní.

- 3.15 Dusičnan stříbrný
- 3.16 *p*-dimethylaminobenzaldehyd
- 3.17 2,5-dimethylfenol
- 3.18 Chlorid železitý, hexahydrát
- 3.19 Kyselina chlorovodíková, 10% roztok (m/V)
- 3.20 Referenční látky

Referenční látky jsou sloučeniny uvedené v oddíle 1 „Rozsah a oblast použití“. V případě aminosloučenin musí být referenční sloučenina buď ve formě hydrochloridu (mono nebo di), nebo jako volná báze.

- 3.21 Referenční roztoky 0,5 % (m/V)

Připraví se 0,5% roztoky (m/V) referenčních látek uvedených v bodě 3.20.

Naváží se 50 ± 1 mg referenční látky do odměrné baňky na 10 ml.

Přidá se 5 ml 96% ethanolu (3.3) a 250 ml kyseliny askorbové (3.5).

Roztok se alkalizuje přidáním roztoku amoniaku (3.4) na hodnotu pH 10 (zjišťuje se indikátorovým papírkem).

Doplní se na 10 ml 96 % ethanolem (3.3) a promíchá.

Roztoky je možno uchovávat po dobu jednoho týdne v chladu a temnu.

V některých případech může po přidání askorbové kyseliny a roztoku amoniaku vzniknout sraženina. Před dalším postupem je třeba ji nechat usadit.

- 3.22 Vyvíjecí rozpouštědla
- 3.22.1 Aceton – chloroform – toluen (35 : 25 : 40, V/V/V)
- 3.22.2 Chloroform – cyklohexan – absolutní ethanol – 25% roztok amoniaku (80 : 10 : 10 : 1, V/V/V/V)
- 3.22.3 Benzen – butan-2-ol – voda (50 : 25 : 25 , V/V/V). Důkladně se protřepe a po dekantaci při pokojové teplotě (20 až 25 °C) se k vyvíjení použije horní fáze.
- 3.22.4 *n*-butanol – chloroform – činidlo M (7 : 70 : 23, V/V/V). Fáze se pečlivě dekantují při pokojové teplotě (20 až 25 °C) a použije se spodní fáze.

Příprava činidla M

Roztok amoniaku, 25 % (V/V)	24 objemových jednotek
Kyselina fosforná, 50 % (3.13)	1 objemová jednotka
Voda	75 objemových jednotek

Poznámka:

Vyvíjecí rozpouštědla obsahující amoniak je třeba bezprostředně před použitím dobře protřepat.

- 3.23 Detekční činidla

3.23.1 *Diazotační činidlo*

Připraví se 5% (m/V) vodný roztok zvoleného činidla (3.14). Tento roztok se musí připravit bezprostředně před použitím.

3.23.2 *Ehrlichovo činidlo*

2 g *p*-dimethylaminobenzaldehydu (3.16) se rozpustí ve 100 ml 10% vodného roztoku kyseliny chlorovodíkové (m/V) (3.19).

3.23.3 *2,5-dimethylfenol – hexahydrát chloridu železitého*

Roztok 1: Rozpustí se 1 g dimethylfenolu (3.17) ve 100 ml 96% ethanolu (3.3).

Roztok 2: Rozpustí se 4 g hexahydrátu chloridu železitého (3.18) ve 100 ml 96% ethanolu (3.3).

Při vyvolání chromatogramu se těmito roztoky provádí postřik samostatně, nejprve roztokem 1, poté roztokem 2.

3.23.4 *Amoniakální dusičnan stříbrný*

25% amoniak (3.4) se přidá k 5% (m/V) vodnému roztoku dusičnanu stříbrného (3.15), až se sraženina právě rozpustí. Toto reakční činidlo se připravuje bezprostředně před použitím. Nelze jej uchovávat.

4. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

4.1 Obvyklé laboratorní vybavení pro chromatografii na tenké vrstvě

4.1.1 Plastový nebo skleněný kryt konstruovaný tak, aby chromatografickou desku během nanášení skvrn a sušení mohl obtékat dusík. Toto opatření je nezbytné vzhledem k náchylnosti určitých barviv k oxidaci.

4.1.2 Mikrostříkačka na 10 µl, dělená po 0,2 µl, s jehlou s rovným koncem, nebo lépe dávkovač na 50 µl uchycený v držáku tak, aby deska mohla být udržována pod atmosférou dusíku.

4.1.3 Hotové silikagelové desky, tloušťka 0,25 mm, rozměry 20 × 20 cm (Macherey and Nagel, Silica G-HR, na plastové podložce, nebo ekvivalentní).

4.2 Odstředivka, 4000 ot./min.

4.3 Centrifugační zkumavky na 10 ml se šroubovými uzávěry potaženými PTFE nebo ekvivalentní.

5. POSTUP

5.1 **Příprava vzorků k analýze**

První 2 až 3 cm krému vytlačeného z tuby se odstraní.

Do centrifugační zkumavky (4.3) předem propláchnuté dusíkem se převede: 300 mg kyseliny askorbové se 3 g krému nebo 3 g homogenizované kapaliny.

Přidává se po kapkách 25 % amoniak (3.4) až pH dosáhne hodnoty 10. Doplní se na 10 ml 96 % ethanol (3.3).

Homogenizuje se pod atmosférou dusíku (3.8), zazátkuje se a centrifuguje se po 10 minut při 4000 ot./min.

Použije se supernatant.

5.2 **Chromatografie**

5.2.1 *Nanášení na desku*

Pod atmosférou dusíku (3.8) se na chromatografickou desku (4.1.3) nanese po 1 μ l každé shora uvedené referenční látky v devíti bodech vzdálených od sebe 1,5 cm podél linie vzdálené asi 1,5 cm od okraje desky.

Referenční látky se nanášejí v tomto uspořádání:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
R	P	H	PPD	DAP	PTD	OPD	OTD	MPD	MTD	α -N

Dále se v bodech 10 a 11 nanese vždy 2 μ l zkoumaných roztoků získaných podle bodu 5.1.

Deska se uchovává pod atmosférou dusíku (3.8) až do okamžiku, kdy je zahájeno vyvíjení chromatogramu.

5.2.2 Vyvíjení

Deska se vloží do komory předem propláchnuté dusíkem (3.8) a nasycené jedním ze čtyř rozpouštědel (3.22) a nechá se vyvíjet při pokojové teplotě (20 až 25 °C) ve tmě, dokud čelo rozpouštědla nedosáhne vzdálenosti asi 15 cm od startovací linie.

Deska se vyjme a usuší pod atmosférou dusíku (3.8) při pokojové teplotě.

5.2.3 Vyvolání

Deska se postříká jedním ze čtyř roztoků uvedených v bodě 3.23.

5.2.4 Kvalitativní stanovení

Porovnejí se hodnoty R_f a barvy skvrn vzorku a chromatografovaných referenčních látek.

V tabulce I jsou uvedeny příklady hodnot R_f a barev skvrn pro jednotlivé látky v závislosti na použitém rozpouštědle a indikátoru.

Nejistý důkaz je někdy možno potvrdit tak, že se přidá roztok odpovídající referenční látky k extraktu vzorku.

5.2.5 Semikvantitativní odhad

Intenzita skvrn jednotlivých látek identifikovaných v bodě 5.2.4 se porovnává vizuálně s odpovídajícím rozsahem koncentrací referenčních látek.

Při nadměrně vysoké koncentraci jedné nebo více látek nalezených ve vzorku se extrakt vzorku zředí a měření se opakuje.

TABULKA I

Hodnoty R_f a barvy získané bezprostředně po vyvolání

Referenční látka (3.20)	Vyvíjecí rozpouštědla				Vyvolávací roztoky			
	Hodnoty R_f				Výsledné barvy			
	(3.22.1)	(3.22.2)	(3.22.3)	(3.22.4)	Diazo (3.23.1)	Ehrlich (3.23.2)	Dimethyl-fenol (3.23.3)	AgNO ₃ (3.23.4)
OPD	0,62	0,60	0,30	0,57	světle hnědá	—	—	světle hnědá
MPD	0,40	0,60	0,47	0,48	fialově hnědá (*)	žlutá	světle hnědá	světle hnědá
PPD	0,20	0,50	0,30	0,48	hnědá	jasně červená (*)	fialová	šedá

Referenční látka (3.20)	Vyvíjecí rozpouštědla				Vyvolávací roztoky			
	Hodnoty R _f				Výsledné barvy			
	(3.22.1)	(3.22.2)	(3.22.3)	(3.22.4)	Diazo (3.23.1)	Ehrlich (3.23.2)	Dimethyl- fenol (3.23.3)	AgNO ₃ (3.23.4)
OTD	0,60	0,60	0,53	0,60	hnědá (*)	světle oranžová	světle hnědá	šedavě hnědá
MTD	0,40	0,67	0,45	0,60	červenavě hnědá (*)	žlutá	hnědá	černá
PTD	0,33	0,65	0,37	0,70	hnědá	oranžová	fialová (*)	šedá
DAP	0,07	—	0	0,05	hnědá (*)	oranžová	fialová	hnědá
H	0,50	0,35	0,80	0,20	—	oranžová	fialová	černá (*)
α-N	0,90	0,80	0,90	0,75	oranžově hnědá	—	fialová (*)	černá
P	0,37	—	0,67	0,05	hnědá	velmi světle fialová	velmi světle hnědá	hnědá (*)
R	0,50	0,37	0,80	0,17	oranžová (*)	světle fialová	velmi světle hnědá	světle hnědá

Poznámka

- OPD se ukazuje pouze slabě; musí se použít rozpouštědlo (3.22.3), aby se jasně odlišil od OTD.
- (*) Označuje nejlépe vyvolané barvy.

6. ZKOUŠKA DVOUROZMĚRNOU CHROMATOGRAFIÍ NA TENKÉ VRSTVĚ

Tato metoda dvourozměrné chromatografie vyžaduje použití dalších standardů a reakčních činidel.

6.1 Další referenční roztoky a látky

- 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-fenylendiamin (2-NPPD)
- 6.1.6 4-nitro-1,2-fenylendiamin (4-NOPD)

Připraví se 0,5 % (m/V) roztoky všech dalších referenčních látek způsobem popsaným v bodě 3.21.

6.2 Další vyvíjecí rozpouštědlo

- 6.2.1 Ethylacetát – cyklohexan – 25 % roztok amoniaku (65 : 30 : 0,5 , V/V/V)

6.3 Další detekční systém

Do vyvíjecí komory pro chromatografii na tenké vrstvě se vloží skleněná nádobka, přidají se asi 2 g krystalického jodu a komora se uzavře odpovídajícím víkem.

6.4 Chromatografie

6.4.1 Podle obrázku 6 se na desce pro chromatografii na tenké vrstvě (4.1.3) vyznačí na straně s adsorbentem dvě linky.

6.4.2 V dusíkové atmosféře (4.1.1) se nanese 1 až 4 μl extraktu (5.1) do základního bodu 1 (obr. 6), který leží asi 2 cm od obou okrajů. Množství extraktu závisí na intenzitě skvrn na chromatogramech podle bodu 5.2.

6.4.3 Mezi body 2 a 3 (obr. 6) se nanese oxidační barviva identifikovaná nebo pokládána za identifikovaná podle bodu 5.2 (vzdálenost mezi body je 1,5 cm). Nanáší se 2 μl každého referenčního roztoku – kromě DAP, který je nutno nanést v objemu 6 μl . Nanášení se provádí v atmosféře dusíku (6.4.2).

6.4.4 Postup podle bodu 6.4.3 se opakuje v základních bodech 4 a 5 (obr. 6) a deska se uchovává pod dusíkem až do zahájení vyvolávání chromatogramu (vzdálenost mezi body je 1,5 cm).

6.4.5 Chromatografická komora se propláchne dusíkem (3.8) a umístí se do ní vhodné množství vyvíjecího rozpouštědla 3.22.2. Deska (6.4.4) se vloží do komory a vyvíjí se ve tmě v prvním vyvíjecím směru (obr. 6).

Vyvíjí se, dokud čelo rozpouštědla nedosáhne linie vyznačené na desce (přibližně 13 cm).

6.4.6 Deska se z komory vyjme a umístí do jiné chromatografické komory, předem propláchnuté dusíkem, aby se vyvíjecí rozpouštědlo odpařovalo alespoň 60 minut.

6.4.7 Pomocí dělené zkumavky se do komory předem propláchnuté dusíkem (3.8) vnese vhodné množství vyvíjecího rozpouštědla (6.2), do komory se vloží deska otočená o 90° (6.4.6) a chromatogram se vyvíjí ve druhém směru (opět ve tmě), dokud čelo rozpouštědla nedosáhne linie vyznačené na straně s adsorbentem. Deska se vyjme z komory a rozpouštědlo se nechá odpařit na vzduchu.

6.4.8 Deska se na 10 minut umístí do chromatografické komory obsahující páry jodu (6.3) a dvourozměrný chromatogram se interpretuje s využitím hodnot R_f a barev současně chromatografovaných referenčních látek (barvy skvrn jsou uvedeny v tabulce II).

Poznámka

Nejlepšího vybarvení skvrn se dosáhne tehdy, ponechá-li se po vyvíjení chromatogramu v atmosféře po dobu půl hodiny.

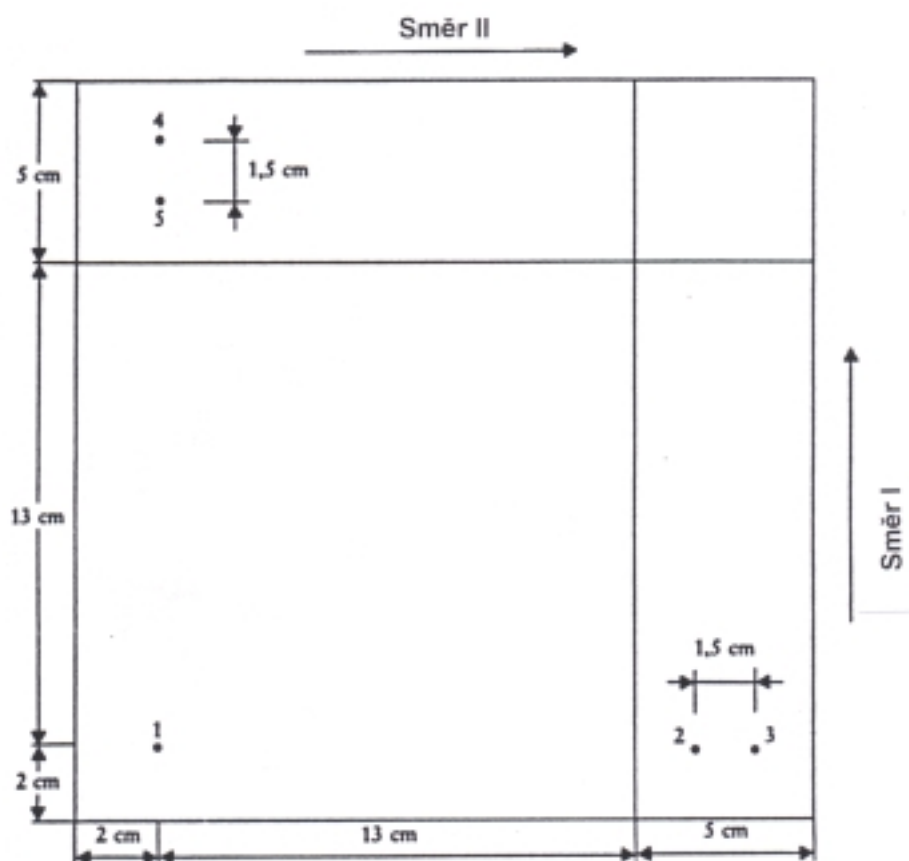
6.4.9 Přítomnost oxidačních barviv nalezených podle bodu 6.4.8 je možno definitivně potvrdit opakováním postupu popsaného v bodech 6.4.1 až 6.4.8, kdy se v základním bodě 1 přes množství extraktu podle bodu 6.4.2 nanese 1 μl referenčních látek identifikovaných v bodě 6.4.8. Neobjeví-li se oproti chromatogramu získaného podle bodu 6.4.8 žádná jiná skvrna, je interpretace chromatogramu podle bodu 6.4.8 správná.

TABULKA II

Barvy referenčních látek po chromatografii a vyvíjení parami jodu

Referenční látky	Barvy po vyvíjení parami jodu
R	běžová
P	hnědá

Referenční látky	Barvy po vyvíjení parami jodu
α -N	fialová
β -N	světle hnědá
H	fialově hnědá
MPD	žlutavě hnědá
PPD	fialově hnědá
MTD	tmavě hnědá
PTD	žlutavě hnědá
DAP	tmavě hnědá
OAP	oranžová
MAP	žlutavě hnědá
PAP	fialově hnědá
2-NPPD	hnědá
4-NOPD	oranžová



Obrázek 6

KVALITATIVNÍ A KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ DUSITANŮ

(Směrnice komise 82/434/EHS ze 14. května 1982)

A. KVALITATIVNÍ STANOVENÍ

1. ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ

Tato metoda je vhodná ke kvalitativnímu stanovení dusitanů v kosmetických prostředcích, zejména v krémech a pastách.

2. PRINCIP

Přítomnost dusitanu indikuje vznik zbarvených derivátů s 2-aminobenzaldehyd-fenylhydrazonem (Nitrin®).

3. REAKČNÍ ČINIDLA

Všechna reakční činidla musí být čistoty p. a.

3.1 Zředěná kyselina sírová: 2 ml koncentrované kyseliny sírové ($d_4^{20} = 1,84$ g/ml) se zředí 11 ml destilované vody.

3.2 Zředěná kyselina chlorovodíková: 1 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové ($d_4^{20} = 1,19$ g/ml) se zředí 11 ml destilované vody.

3.3 Methanol

3.4 Roztok 2-aminobenzaldehyd-fenylhydrazonu (reakční činidlo Nitrin®) v methanolu

Naváží se 2,0 g Nitrinu® a převede se kvantitativně do odměrné baňky na 100 ml. Po kapkách se přidají 4 ml zředěné kyseliny chlorovodíkové (3.2) a protřepe se. Doplní se po rysku methanolem a míchá, dokud se roztok úplně nevyčeří. Roztok se uchovává v hnědé skleněné lahvi (4.3).

4. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

4.1 Kádinky na 50 ml

4.2 Odměrná baňka na 100 ml

4.3 Hnědá skleněná láhev na 125 ml

4.4 Skleněná deska, 10 × 10 cm

4.5 Špachtle z plastu

4.6 Filtrační papír, 10 × 10 cm

5. POSTUP

5.1 Část analyzovaného vzorku se rovnoměrně rozetře na skleněnou desku (4.4) tak, aby byl povrch pokryt vrstvou nejvýše 1 cm silnou.

5.2 List filtračního papíru (4.6) se nasákne destilovanou vodou. Položí se na vzorek a přitiskne špachtlí z plastu (4.5).

5.3 Počká se asi jednu minutu a do středu filtračního papíru se nanesou:

- 2 kapky zředěné kyseliny sírové (3.1),
- poté dvě kapky roztoku Nitrinu® (3.4).

5.4 Po pěti až 10 sekundách se filtrační papír odstraní a prohlédne se proti dennímu světlu. Červenofialové zbarvení indikuje přítomnost dusitanů.

Je-li obsah dusitanů nízký, změní se červenofialové zbarvení během pěti až 15 sekund na žluté. Je-li přítomno velké množství dusitanů, dojde k této barevné změně až po jedné nebo dvou minutách.

6. POZNÁMKA

Intenzita červenofialového zbarvení a doba, která uplyne před změnou na žlutou, naznačují obsah dusitanů ve vzorku.

B. KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ

1. ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ

Metoda popisuje kvantitativní stanovení dusitanů v kosmetických prostředcích.

2. DEFINICE

Obsah dusitanů ve vzorku, stanovený touto metodou, se vyjadřuje v hmotnostních procentech dusitanu sodného.

3. PRINCIP

Po zředění vzorku vodou a vyčeření se nechá proběhnout reakce přítomných dusitanů se sulfanilamidem a *N*-1-naftylethylendiaminem a absorbance vzniklého zbarvení se měří při 538 nm.

4. REAKČNÍ ČINIDLA

Všechna reakční činidla musí být čistoty p. a.

4.1 Čeridla: tato činidla nelze používat déle než jeden týden po přípravě.

4.1.1 Carrezovo činidlo I:

106 g kyanoželeznanu draselného $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ se rozpustí v destilované vodě a zředí vodou na 1000 ml.

4.1.2 Carrezovo činidlo II:

219,5 g octanu zinečnatého $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ a 30 ml ledové kyseliny octové se rozpustí v destilované vodě a zředí vodou na 1000 ml.

4.2 Roztok dusitanu sodného:

0,500 g dusitanu sodného se rozpustí v destilované vodě v odměrné baňce na 1000 ml a doplní se vodou po rysku. 10,0 ml tohoto zásobního standardního roztoku se zředí na 500 ml; 1 ml výsledného roztoku = 10 mikrogramů $NaNO_2$.

4.3 Roztok hydroxidu sodného, 1N

4.4 Roztok sulfanilamid–hydrochloridu, 0,2%:

2,0 g sulfanilamidu se za zahřívání rozpustí v 800 ml vody. Po ochlazení se za míchání přidá 100 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Zředí se vodou na 1000 ml.

4.5 Kyselina chlorovodíková, 5N

4.6 *N*-1-naftyllové činidlo:

Tento roztok se musí připravit v den použití. Rozpustí se 0,1 g dihydrochloridu *N*-naftylethylendiaminu ve vodě a zředí se vodou na 100 ml.

5. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

5.1 Analytické váhy

- 5.2 Odměrné baňky na 100, 250, 500 a 1000 ml
- 5.3 Nedělené nebo dělené pipety
- 5.4 Odměrné válce na 100 ml
- 5.5 Skládany filtrační papír, bez dusitanů, průměr 15 cm
- 5.6 Vodní lázeň
- 5.7 Spektrofotometr a kyvety s optickou drahou 1 cm
- 5.8 pH-metr
- 5.9 Mikrobureta na 10 ml
- 5.10 Kádinky na 250 ml

6. POSTUP

- 6.1 S přesností na 0,1 mg se naváží asi 0,5 g (m gramů) homogenizovaného vzorku, kvantitativně se převede horkou destilovanou vodou do kádinky na 250 ml (5.10) a doplní horkou destilovanou vodou asi na 150 ml. Kádinka (5.10) se na půl hodiny vloží do vodní lázně (5.6) vyhřáté na 80 °C. Během této doby se obsah občas protřepe.
- 6.2 Ochladí se na pokojovou teplotu a postupně se za míchání přidají 2 ml Carrezova činidla I (4.1.1) a 2 ml Carrezova činidla II (4.1.2).
- 6.3 Přidává se 1N roztok hydroxidu sodného (4.3), dokud se pH neupraví na 8,3. (Použije se pH-metr (5.8)). Obsah se kvantitativně převede do odměrné baňky na 250 ml (5.2) a doplní destilovanou vodou po rysku.
- 6.4 Obsah se promíchá a zfiltruje přes skládaný papírový filtr (5.5).
- 6.5 Do odměrné baňky na 100 ml (5.2) se odpipetuje (5.3) odpovídající alikvotní část (V mililitrů) čirého filtrátu, avšak ne více než 25 ml, a doplní se destilovanou vodou na objem 60 ml.
- 6.6 Po promíchání se přidá 10,0 ml roztoku sulfanilamid-hydrochloridu (4.4) a poté 6,0 ml 5N kyseliny chlorovodíkové (4.5). Promíchá se a ponechá stát pět minut. Přidají se 2,0 ml *N*-1-naftylového činidla (4.6), promíchá se a ponechá stát tři minuty. Zředí se vodou po rysku a promíchá.
- 6.7 Připraví se slepý pokus opakováním operací popsaných v bodech 6.5 a 6.6 bez přídavku *N*-1-naftylového činidla (4.6).
- 6.8 Změří se (5.7) absorbance roztoku připraveného podle bodu 6.6 při 538 nm proti roztoku ze slepého pokusu (6.7).
- 6.9 Z kalibračního grafu (6.10) se odečte obsah dusitanu sodného v mikrogramech na 100 ml roztoku (m_1 mikrogramů), odpovídající absorbanci změřené podle bodu 6.8.
- 6.10 S využitím roztoku dusitanu sodného o koncentraci 10 µg na ml (4.2) se sestrojí kalibrační graf pro koncentrace 0, 20, 40, 60, 80 a 100 µg dusitanu sodného ve 100 ml.

7. VÝPOČET

Obsah dusitanu sodného ve vzorku vyjádřený v hmotnostních procentech se vypočte pomocí následujícího vzorce:

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

kde:

m = hmotnost vzorku odebraného pro analýzu v gramech (6.1),

m_1 = obsah dusitanu sodného v mikrogramech zjištěný podle bodu 6.9,

V = počet mililitrů filtrátu použitého pro měření (6.5).

8. OPAKOVATELNOST⁽³⁾

Pro výrobky obsahující asi 0,2 % (m/m) dusitanu sodného nesmí rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení na stejném vzorku překročit absolutní hodnotu 0,005 %.

KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ RESORCINOLU V ŠAMPONECH A VLASOVÝCH LOTIONECH

(Směrnice komise 82/434/EHS ze 14. května 1982)

1. ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ

V této metodě je specifikováno kvantitativní stanovení resorcinolu v šamponech a vlasových lotionech plynovou chromatografií. Metoda je vhodná pro koncentrace od 0,1 až do 2,0 hmotnostních procent vzorku.

2. DEFINICE

Obsah resorcinolu stanovený ve vzorku touto metodou se vyjadřuje v hmotnostních procentech.

3. PRINCIP

Resorcinol a 3,5-dihydroxytoluen (5-methylresorcinol), přidávaný jako vnitřní standard, se ze vzorku oddělí chromatografií na tenké vrstvě. Obě sloučeniny se izolují seškrabáním jejich skvrn z horní vrstvy desky a extrakcí methanolem. Nakonec se vyextrahované sloučeniny vysuší, podrobí silylaci a stanoví se plynovou chromatografií.

4. REAKČNÍ ČINIDLA

Všechna reakční činidla musí být čistoty p. a.

4.1 Kyselina chlorovodíková, 25% (m/m)

4.2 Methanol

4.3 Ethanol, 96 % (V/V)

4.4 Hotové silikagelové TLC desky (plastové nebo hliníkové) s fluorescenčním indikátorem. Desky se deaktivují následujícím postupem: normální silikagelová deska se nastříká vodou, dokud se povrch neleskne. Nastříkané desky se nechají schnout při pokojové teplotě jednu až tři hodiny.

Poznámka

Bez deaktivace může docházet ke ztrátám resorcinolu v důsledku ireverzibilní adsorpce na silikagelu.

³ Viz ČSN ISO 5725

- 4.5 Vyvíjecí rozpouštědlo: aceton – chloroform – kyselina octová (20 : 75 : 5 , V/V/V).
- 4.6 Standardní roztok resorcinolu: rozpustí se 400 mg resorcinolu ve 100 ml 96% ethanolu (4.3) (1 ml odpovídá 4000 µg resorcinolu).
- 4.7 Roztok vnitřního standardu: rozpustí se 400 mg 3,5-dihydroxytoluenu (DHT) ve 100 ml 96% ethanolu (4.3) (1 ml odpovídá 4000 µg DHT).
- 4.8 Směs standardů: v odměrné baňce na 100 ml se smíchá 10 ml roztoku 4.6 a 10 ml roztoku 4.7, doplní se po rysku 96% ethanolom (4.3) a promíchá (1 ml roztoku odpovídá 400 µg resorcinolu a 400 µg DHT).
- 4.9 Silylační činidla:
 - 4.9.1 *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA)
 - 4.9.2 Hexamethyldisilazan (HMDS)
 - 4.9.3 Trimethylchlorsilan (TMCS)
5. PŘÍSTROJE A POMŮCKY
 - 5.1 Obvyklé vybavení pro chromatografii na tenké vrstvě a plynovou chromatografii
 - 5.2 Skleněné laboratorní nádoby
6. POSTUP
 - 6.1 **Příprava vzorku**
 - 6.1.1 Do kádinky na 150 ml se přesně naváží zkušební vzorek (m gramů) prostředku, který obsahuje asi 20 až 50 mg resorcinolu.
 - 6.1.2 Okyselí se kyselinou chlorovodíkovou (4.1) do kyselé reakce (je potřeba přibližně 2 až 4 ml), přidá se 10 ml (40 mg DHT) roztoku vnitřního standardu (4.7) a promíchá se. Ethanolom (4.3) se převede do odměrné baňky na 100 ml, doplní se ethanolom po rysku a promíchá.
 - 6.1.3 250 µl roztoku (6.1.2) se nanese na deaktivovanou desku se silikagelem (4.4) jako nepřerušovaná linie o délce přibližně 8 cm. Je třeba dbát na to, aby linie byla co nejužší.
 - 6.1.4 Na stejnou desku se stejným způsobem (6.1.3) nanese 250 µl směsi standardů (4.8).
 - 6.1.5 Do dvou bodů startovací linie se nanese po 5 µl roztoků 4.6 a 4.7 k usnadnění lokalizace skvrn po vyvolání.
 - 6.1.6 Deska se vyvíjí v nenasycené komoře naplněné vyvíjecím rozpouštědlem (4.5), dokud čelo rozpouštědla nedosáhne vzdálenosti 12 cm od startovací linie; obvykle to trvá asi 45 minut. Deska se usuší na vzduchu a zóna resorcinolu/DHT se lokalizuje pod krátkovlnným UV světlem (254 nm). Obě tyto sloučeniny mají přibližně stejnou hodnotu R_f. Poloha pásů se vyznačí tužkou ve vzdálenosti 2 mm od vnějšího tmavého rozhraní pásů. Tyto zóny se z desky odstraní a adsorbenty každého pásu se shromáždí v lahvi na 10 ml.
 - 6.1.7 Adsorbent obsahující vzorek a adsorbent obsahující směs standardů se extrahují následujícím způsobem:

Přidají se 2 ml methanolu (4.2) a extrahuje se jednu hodinu za neustálého míchání. Směs se zfiltruje a extrakce se opakuje po dobu dalších 15 minut se 2 ml methanolu.
 - 6.1.8 Extrakty se spojí a rozpouštědlo se nechá přes noc odpařit ve vakuovém exsikatoru naplněném vhodným sušicím prostředkem. Nezhřívát.
 - 6.1.9 Odparky (6.1.8) se silylují způsobem popsaným v bodě 6.1.9.1 nebo 6.1.9.2.

6.1.9.1 Mikrostříkačkou se přidá 200 µl BSTFA (4.9.1) a směs se nechá v uzavřené nádobě 12 hodin při pokojové teplotě.

6.1.9.2 Mikrostříkačkou se postupně přidá 200 µl HMDS (4.9.2) a 100 µl TMCS (4.9.3), směs se zahřívá v uzavřené nádobě 30 minut na 60 °C. Směs se ochladí.

6.2 Plynová chromatografie

6.2.1 Chromatografické podmínky

Kolona musí poskytovat rozlišení R rovné nebo lepší než 1,5, kde:

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

kde:

r_1 a r_2 = retenční časy dvou píků v minutách,

w_1 a w_2 = šířky píků v polovině výšky píků v mm,

d' = rychlost posuvu papíru v mm za minutu.

Následující kolona a podmínky pro plynovou chromatografii se ukázaly jako vhodné:

Materiál kolony: nerezová ocel

Délka 200 cm

Vnitřní průměr: \approx 3 mm

Náplň: 10% OV-17 na Chromosorbu WAW, 100 až 120 mesh

Plamenový ionizační detektor

Teplotní režim:

Kolona: 185 °C (izotermální)

Detektor: 250 °C

Nástřík: 250 °C

Nosný plyn: dusík

Průtok: 45 ml/min

Průtoky vodíku a vzduchu se nastaví podle pokynů výrobce.

6.2.2 Do plynového chromatografu se nástříkne 1 až 3 µl roztoků připravených podle bodu 6.1.9. Pro každý roztok (6.1.9) se provede pět nástříků, změří se plochy píků, vypočte se průměr a poměr ploch píků: S = plocha píku resorcinolu/plocha píku DHT.

7. VÝPOČET

Koncentrace resorcinolu ve vzorku, vyjádřená v hmotnostních procentech (% m/m), je dána vztahem:

$$\% \text{ resorcinolu} = \frac{4}{M} \times \frac{S_{\text{vzorku}}}{S_{\text{standardní směsi}}}$$

kde:

M = hmotnost zkušební vzorku v gramech (6.1.1),

S_{vzorku} = průměrná plocha píku (6.2.2) pro roztok vzorku,

$S_{\text{standardní směsi}}$ = průměrná plocha píku (6.2.2) pro směs standardů.

8. OPAKOVATELNOST⁽³⁾

Pro výrobky obsahující asi 0,5 % (m/m) resorcinolu nesmí rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení na stejném vzorku překročit absolutní hodnotu 0,025 %.

KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ METHANOLU VZHLEDEM K ETHANOLU NEBO PROPAN-2-OLU

(Směrnice komise 82/434/EHS ze 14. května 1982)

1. ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ

V metodě je popsána analýza methanolu ve všech typech kosmetických prostředků (včetně aerosolů) plynovou chromatografií.

Metodou je možno stanovit relativní hladiny od 0 do 10 %.

2. DEFINICE

Obsah methanolu, stanovený podle této metody, se vyjadřuje v hmotnostních procentech methanolu vzhledem k ethanolu nebo propan-2-olu.

3. PRINCIP

Stanovení se provádí plynovou chromatografií.

4. REAKČNÍ ČINIDLA

Všechna reakční činidla musí být čistoty p. a.

4.1 Methanol

4.2 Absolutní ethanol

4.3 Propan-2-ol

4.4 Chloroform zbavený alkoholů promytím vodou

5. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

5.1 Plynový chromatograf:

s tepelně vodivostním detektorem (katarometr) pro aerosolové vzorky,

s plamenovým ionizačním detektorem pro jiné než aerosolové vzorky.

5.2 Odměrné baňky na 100 ml

5.3 Pipety na 2 ml, 20 ml a 0 až 1 ml

5.4 Mikrostříkačky na 0 až 100 µl a 0 až 5 µl

a (pouze pro aerosolové vzorky) speciální plynotěsná injekční stříkačka s posuvným ventilem (viz obrázek 5, kapitola „Příprava vzorků v laboratoři“).

6. POSTUP

6.1 Příprava vzorku

6.1.1 Vzorky z prostředků v obalech na aerosoly se odebírají postupem podle kapitoly „Příprava vzorků v laboratoři“ a poté se analyzují plynovou chromatografií za podmínek popsanych v bodě 6.2.1.

³ Viz ČSN ISO 5725

6.1.2 Vzorky jiných než aerosolových prostředků, odebíraných postupem podle výše uvedené kapitoly „Příprava vzorků v laboratoři“, se zředí vodou na koncentraci 1 až 2 % ethanolu či propan-2-olu a poté se analyzují plynovou chromatografií za podmínek popsanych v bodě 6.2.2.

6.2 Plynová chromatografie

6.2.1 Pro aerosolové vzorky se použije tepelně vodivostní detektor (katarometr).

6.2.1.1 Náplní kolony je 10 % Hallcomid M18 na Chromosorbu WAW, 100 až 200 mesh.

6.2.1.2 Kolona musí poskytovat rozlišení R rovné nebo lepší než 1,5, kde:

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

kde:

r_1 a r_2 = retenční časy dvou píků v minutách,

w_1 a w_2 = šířky píků v polovině výšky píků v mm,

d' = rychlost posuvu papíru v mm za minutu.

6.2.1.3 Tohoto rozlišení je možno dosáhnout za následujících podmínek:

Materiál kolony: nerezová ocel

Délka: 3,5 metru

Průměr: 3 mm

Proud můstkem katarometru: 150 mA

Nosný plyn: helium

Tlak: 2,5 bar

Průtok: 45 ml/min

Teplotní režim:

Nástřík: 150 °C

Detektor: 150 °C

Kolona: 65 °C

Měření plochy píků je možno vylepšit elektronickou integrací.

6.2.2 Jiné než aerosolové vzorky:

6.2.2.1 Náplní kolony je Chromosorb 105 nebo Porapak QS; použije se plamenový ionizační detektor.

6.2.2.2 Kolona musí dávat rozlišení R rovné nebo lepší než 1,5, kde:

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

r_1 a r_2 = retenční časy dvou píků v minutách

w_1 a w_2 = šířky píků v polovině výšky píků v mm,

d' = rychlost posuvu záznamu v mm za minutu.

6.2.2.3 Tohoto rozlišení je možno dosáhnout za následujících podmínek:

Materiál kolony: nerezová ocel
 Délka: 2 metry
 Průměr: 3 mm
 Citlivost elektrometru: 8×10^{-10} A
 Plyny:
 Nosný plyn: dusík
 Tlak: 2,1 bar
 Průtok: 40 ml/min
 Pomocný plyn: vodík
 Tlak: 1,5 bar
 Průtok: 20 ml/min
 Teplotní režim:
 Nástřík: 150 °C
 Detektor: 230 °C
 Kolona: 120 až 130 °C

7. KALIBRAČNÍ GRAF

- 7.1 Pro plynovou chromatografii podle bodu 6.2.1 (náplň kolony Hallcomid M18) se použijí následující standardní směsi. Tyto směsi se připraví odměřením pomocí pipet, ale přesné množství se stanoví zvážením pipety nebo baňky po každém přidání.

Relativní koncentrace (% m/m):	Methanol (ml)	Ethanol nebo propan-2-ol (ml)	Doplněno chloroformem na objem
Přibližně 2,5 %	0,5	20	100 (ml)
Přibližně 5,0 %	1,0	20	100 (ml)
Přibližně 7,5 %	1,5	20	100 (ml)
Přibližně 10,0 %	2,0	20	100 (ml)

Do chromatografu se nastříkují 2 až 3 μ l za podmínek uvedených v bodě 6.2.1.

Pro každou směs se vypočtou poměry ploch píků (methanol/ethanol) nebo (methanol/propan-2-ol). Sestrojí se kalibrační graf vynesáním

na osu x: množství methanolu vzhledem k ethanolu nebo propan-2-olu v %

na osu y: poměr ploch píků (methanol/ethanol) nebo (methanol/propan-2-ol).

- 7.2 Pro plynovou chromatografii podle bodu 6.2.2 (náplň kolony Porapak QS nebo Chromosorb 105) se použijí následující standardní směsi. Tyto směsi se připraví odměřením pomocí pipet, ale přesné množství se stanoví zvážením pipety nebo baňky po každém přidání.

Relativní koncentrace (% m/m):	Methanol (μl)	Ethanol nebo propan-2-ol (ml)	Doplňeno vodou na objem
Přibližně 2,5 %	50	2	100 (ml)
Přibližně 5,0 %	100	2	100 (ml)
Přibližně 7,5 %	150	2	100 (ml)
Přibližně 10,0 %	200	2	100 (ml)

Do chromatografu se nastříkují 2 až 3 μl za podmínek uvedených v bodě 6.2.2.

Pro každou směs se vypočtou poměry ploch píků (methanol/ethanol) nebo (methanol/propan-2-ol) a sestrojí se kalibrační graf vynesemím

na osu x: množství methanolu vzhledem k ethanolu nebo propan-2-olu v %

na osu y: poměr ploch píků (methanol/ethanol) nebo (methanol/propan-2-ol).

7.3 Kalibrační graf musí být přímkový.

8. OPAKOVATELNOST⁽³⁾

Pro výrobky obsahující relativně asi 5 % (m/m) methanolu vzhledem k ethanolu nebo propan-2-olu nesmí rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení na stejném vzorku překročit absolutní hodnotu 0,25 %.

KVALITATIVNÍ A KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ VOLNÉHO FORMALDEHYDU

(Směrnice komise 90/207/EHS ze 4. duben 1990)

1. ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ

Tato metoda popisuje kvalitativní stanovení a dva způsoby kvantitativního stanovení v závislosti na tom, zda jsou či nejsou přítomny donory formaldehydu. Je použitelná pro všechny kosmetické prostředky a skládá se ze tří částí:

1.1 **Kvalitativní stanovení**

1.2 **Obecné kolorimetrické stanovení pomocí pentan-2,4-dionu (acetylaceton)**

Tato metoda se používá v případě, je-li použit formaldehyd samotný nebo s konzervanty, které nejsou donory formaldehydu.

V opačném případě, a pokud výsledek přesáhne nejvyšší povolenou koncentraci, musí být použita následující metoda pro potvrzení.

1.3 **Kvantitativní stanovení za přítomnosti donorů formaldehydu**

Při použití výše uvedené metody (1.2) se při derivatizaci donory formaldehydu štěpí, což vede k příliš vysokým výsledkům (vázaný formaldehyd a formaldehyd

³ Viz ČSN ISO 5725

v polymerní formě). Nejdříve se oddělí volný formaldehyd (vázaný nebo v polymerní formě) kapalinovou chromatografií.

2. DEFINICE

Obsah volného formaldehydu ve vzorku stanovený touto metodou se vyjádří v hmotnostních procentech.

3. KVALITATIVNÍ STANOVENÍ

3.1 Podstata metody

Volný a vázaný formaldehyd dává v prostředí kyseliny sírové za přítomnosti Schiffova činidla zbarvení růžové nebo do lila.

3.2 Reakční činidla

Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a. a použije se demineralizovaná voda.

3.2.1 Fuchsin

3.2.2 Siřičitan sodný heptahydrát

3.2.3 Koncentrovaná kyselina chlorovodíková ($d_4^{20} = 1,19 \text{ g/ml}$)

3.2.4 Kyselina sírová, asi 1M

3.2.5 Schiffovo činidlo:

Do kádinky se naváží 100 mg fuchsinu (3.2.1) a rozpustí se v 75 ml vody o teplotě 80 °C. Po ochlazení se přidá 2,5 g siřičitanu sodného heptahydrátu (3.2.2) a 1,5 ml kyseliny chlorovodíkové (3.2.3). Objem se doplní do 100 ml.

Použitelnost do dvou týdnů.

3.3 Postup

3.3.1 Do kádinky na 10 ml se naváží 2 g vzorku.

3.3.2 Přidají se dvě kapky kyseliny sírové (3.2.4) a 2 ml Schiffova činidla (3.2.5). Toto činidlo musí být při použití naprosto bezbarvé.

Obsah se protřepe a nechá stát 5 minut.

3.3.3 Objeví-li se do pěti minut růžové zbarvení nebo barva lila, je přítomen formaldehyd v množství vyšším než 0,01 % a musí být stanoven volný a vázaný formaldehyd podle bodu 4. a v případě potřeby podle bodu 5.

4. OBECNÉ KOLORIMETRICKÉ STANOVENÍ FORMALDEHYDU POMOCÍ PENTAN-2,4-DIONU

4.1 Princip

Formaldehyd reaguje s pentan-2,4-dionem v přítomnosti octanu amonného za tvorby 3,5-diacetyl-1,4-dihydrolutidinu. Ten se extrahuje butan-1-olem a absorbance extraktu se měří při 410 nm.

4.2 Reakční činidla

Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a. a použije se demineralizovaná voda.

4.2.1 Bezvodý octan amonný

4.2.2 Koncentrovaná kyselina octová, ($d_4^{20} = 1,05 \text{ g/ml}$)

4.2.3 Pentan-2,4-dion, čerstvě predestilovaný za sníženého tlaku 25 mm Hg při 25 °C – nesmí vykazovat žádnou absorpci při 410 nm

- 4.2.4 Butan-1-ol
- 4.2.5 Kyselina chlorovodíková, 1M
- 4.2.6 Kyselina chlorovodíková, asi 0,1M
- 4.2.7 Hydroxid sodný, 1M
- 4.2.8 Roztok škrobu, čerstvě připravený (1 g/50 ml vody) podle European Pharmacopoeia, 2. vydání 1980, část I-VI-1-1
- 4.2.9 37% až 40% (m/V) roztok formaldehydu
- 4.2.10 Odměrný roztok jodu, 0,05M
- 4.2.11 Odměrný roztok thiosíranu sodného, 0,1M
- 4.2.12 *Činidlo obsahující pentan-2,4-dion:*
V odměrné baňce na 1000 ml se rozpustí:
- 150 g octanu amonného (4.2.1),
- 2 ml pentan-2,4-dionu (4.2.3),
- ml kyseliny octové (4.2.2).
Doplní se na 1000 ml vodou (pH roztoku asi 6,4).
Toto činidlo musí být připraveno čerstvě.
- 4.2.13 Činidlo (4.2.12) bez přídavku pentan-2,4-dionu
- 4.2.14 *Standardní roztok formaldehydu: zásobní roztok*
5 g roztoku formaldehydu (4.2.9) se převede do odměrné baňky na 1000 ml a doplní se vodou na 1000 ml.
Koncentrace tohoto roztoku se stanoví takto:
Odebere se 10,00 ml; přidá se 25,00 ml odměrného roztoku jodu (4.2.10) a 10,00 ml roztoku hydroxidu sodného (4.2.7).
Nechá se stát pět minut.
Okyselí se 11,00 ml HCl (4.2.5) a přebytek jodu se titruje odměrným roztokem thiosíranu sodného (4.2.11), jako indikátor se použije roztok škrobu (4.2.8).
Spotřeba 1 ml 0,05M odměrného roztoku jodu (4.2.10) odpovídá 1,5 mg formaldehydu.
- 4.2.15 *Standardní roztok formaldehydu: zředěný roztok*
Zásobní roztok formaldehydu se zředí vodou nejprve v poměru 1/20 a poté v poměru 1/100. 1 ml výsledného roztoku obsahuje asi 1 µg formaldehydu.
Přesný obsah se vypočte.
- 4.3 **Přístroje a pomůcky**
- 4.3.1 Obvyklé laboratorní vybavení
- 4.3.2 Filtr pro separaci fází, Whatman 1 PS (nebo ekvivalentní)
- 4.3.3 Odstředivka
- 4.3.4 Vodní lázeň nastavená na teplotu 60 °C
- 4.3.5 Spektrofotometr
- 4.3.6 Skleněné kyvety s délkou optické dráhy 1 cm

4.4 Postup

4.4.1 Roztok vzorku

Do odměrné baňky na 100 ml se s přesností na 0,001 g naváží množství zkušebního vzorku (v gramech) odpovídající očekávanému obsahu formaldehydu asi 150 µg. Doplní se po rysku vodou a zamíchá se (roztok S). (Je nutno ověřit, zda je hodnota pH asi 6; v opačném případě se přidá roztok kyseliny chlorovodíkové (4.2.6).)

Do Erlenmeyerovy baňky na 50 ml se odměří

- 10,00 ml roztoku S,
- 5,00 ml činidla obsahujícího pentan-2,4-dion (4.2.12),
- doplní se demineralizovanou vodou na konečný objem 30 ml.

4.4.2 Referenční roztok

Možný rušivý vliv základního zbarvení zkušebního vzorku se odstraní použitím tohoto referenčního roztoku:

Do Erlenmeyerovy baňky na 50 ml se přidá

- 10,00 ml roztoku S,
- 5,00 ml činidla (4.2.13),
- demineralizovaná voda na konečný objem 30 ml.

4.4.3 Roztok pro slepý pokus

Do Erlenmeyerovy baňky na 50 ml se přidá:

- 5,00 ml činidla obsahujícího pentan-2,4-dion (4.2.13),
- demineralizovaná voda na konečný objem 30 ml.

4.4.4 Stanovení

4.4.4.1 Směsi připravené podle bodů 4.4.1, 4.4.2 a 4.4.3 se protřepou. Erlenmeyerovy baňky se přesně na 10 minut vloží do vodní lázně vyhřáté na 60 °C. Nechají se vychladnout dvě minuty v lázni s ledovou vodou.

4.4.4.2 Obsah se převede do dělicí nálevky na 50 ml obsahující 10,00 ml butan-1-olu (4.2.4). Každá baňka se vypláchne 3 až 5 ml vody. Směs se přesně 30 sekund důkladně třepe. Fáze se nechají oddělit.

4.4.4.3 Obsah se přefiltruje do měřicích kyvet (4.3.2) přes filtr pro separaci fází. Fáze lze rovněž odstředit (při 3000 ot./min po dobu 5 minut).

4.4.4.4 Při 410 nm se změří absorpance (A_1) extraktu roztoku vzorku (4.4.1) proti extraktu referenčního roztoku (4.4.2).

4.4.4.5 Obdobně se změří absorpance (A_2) extraktu roztoku slepého pokusu (4.4.3) proti butan-1-olu.

Poznámka: Všechny tyto operace musí být provedeny do 25 minut od okamžiku, kdy byly Erlenmeyerovy baňky vloženy do lázně vyhřáté na 60 °C.

4.4.5 Kalibrační křivka

4.4.5.1 Do Erlenmeyerovy baňky na 50 ml se přidá:

- 5,00 ml zředěného standardního roztoku podle bodu 4.2.15,
- 5,00 ml činidla obsahujícího pentan-2,4-dion (4.2.12),
- demineralizovaná voda na celkový objem 30 ml.

- 4.4.5.2 Postupuje se tak, jak je popsáno v bodě 4.4.4, a měří se absorbance proti butan-1-olu (4.2.4).
- 4.4.5.3 Postup se opakuje s 10, 15, 20 a 25 ml zředěného standardního roztoku (4.2.15).
- 4.4.5.4 Nulová hodnota (odpovídající zabarvení reakčních činidel) se získá postupem podle bodu 4.4.4.5.
- 4.4.5.5 Po odečtení nulové hodnoty od každé hodnoty absorbance získané podle bodů 4.4.5.1 a 4.4.5.3 se sestrojí kalibrační křivka. Beerův zákon platí až do 30 µg formaldehydu.

4.5 Výpočty

- 4.5.1 Od hodnoty A_1 se odečte hodnota A_2 a z kalibračního křivky (4.4.5.5) se odečte množství C formaldehydu v roztoku vzorku (4.4.1) v µg.
- 4.5.2 Obsah formaldehydu ve vzorku (% m/m) se vypočte pomocí vzorce :

$$\text{obsah formaldehydu v \% (m/m)} = \frac{C}{10^3 \cdot m}$$

kde

m = hmotnost zkušební vzorku v gramech.

4.6 Opakovatelnost⁽³⁾

Pro výrobky obsahující asi 0,2 % (m/m) formaldehydu nesmí rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení na stejném vzorku překročit absolutní hodnotu 0,005 % pro kolorimetrickou metodu s pentan-2,4-dionem.

Vede-li kolorimetrické stanovení volného formaldehydu k výsledkům vyšším než je nejvyšší přípustná koncentrace podle vyhlášky Ministerstva zdravotnictví č. 26/2001 Sb., o hygienických požadavcích na kosmetické prostředky, o náležitostech žádosti o neuvedení ingredience na obalu kosmetického prostředku a o požadavcích na vzdělání a praxi fyzické osoby odpovědné za výrobu kosmetického prostředku (o kosmetických prostředcích), tj.

- a) 0,05 % až 0,2 % ve výrobku, u něhož není obsah formaldehydu uveden na etiketě,
 b) více než 0,2 % ve výrobku s uvedením obsahu formaldehydu, nebo bez něho,
 musí být použito postupu podle bodu 5.

5. KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ ZA PŘÍTOMNOSTI DONORŮ FORMALDEHYDU

5.1 Princip

Oddělený formaldehyd se převede na žlutý derivát lutidinu reakcí s pentan-2,4-dionem v reaktoru za kolonou a absorbance vzniklého derivátu se měří při 420 nm.

5.2 Reakční činidla

Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a. a použije se demineralizovaná voda.

- 5.2.1 Voda čistoty pro HPLC nebo voda ekvivalentní kvality
- 5.2.2 Bezvodý octan amonný
- 5.2.3 Koncentrovaná kyselina octová

³ Viz ČSN ISO 5725

- 5.2.4 Pentan-2,4-dion (uchovává se při 4 °C)
- 5.2.5 Bezvodý hydrogenfosforečnan disodný
- 5.2.6 Kyselina trihydrogenfosforečná, 85% ($d_4^{20} = 1,7 \text{ g/ml}$)
- 5.2.7 Methanol čistoty pro HPLC
- 5.2.8 Dichlormethan
- 5.2.9 Formaldehyd, 37% až 40% (m/V)
- 5.2.10 Hydroxid sodný, 1M
- 5.2.11 Kyselina chlorovodíková, 1M
- 5.2.12 Kyselina chlorovodíková, 0,002M
- 5.2.13 Roztok škrobu čerstvě připravený podle European Pharmacopoeia (viz 4.2.8)
- 5.2.14 Odměrný roztok jodu, 0,05M
- 5.2.15 Odměrný roztok thiosíranu sodného, 0,1M
- 5.2.16 *Mobilní fáze:*
 Vodný roztok hydrogenfosforečnanu disodného (5.2.5), 0,006M, upravený na pH 2,1 kyselinou trihydrogenfosforečnou (5.2.6)
- 5.2.17 *Činidlo do reaktoru za kolonou:*
 V odměrné baňce na 1000 ml se rozpustí :
 - 62,5 g octanu amonného (5.2.2),
 - 7,5 ml kyseliny octové (5.2.3),
 - 5 ml pentan-2,4-dionu (5.2.4).
 Objem se doplní po rysku vodou (5.2.1).
 Roztok se uchovává ve tmě.
 Skladovatelnost: nejvýše tři dny při 25 °C.
 Barva roztoku by se neměla měnit.
- 5.2.18 *Standardní roztok formaldehydu: zásobní roztok*
 10 g roztoku formaldehydu (5.2.9) se převede do odměrné baňky na 1000 ml a doplní se vodou na 1000 ml.
 Koncentrace tohoto roztoku se stanoví takto:
 Odebere se 5,00 ml; přidá se 25,00 ml odměrného roztoku jodu (5.2.14) a 10,00 ml roztoku hydroxidu sodného (5.2.10).
 Nechá se stát pět minut.
 Okyselí se 11,00 ml HCl (5.2.11) a přebytek jodu se titruje odměrným roztokem thiosíranu sodného (5.2.15), jako indikátor se použije roztok škrobu (5.2.13).
 Spotřeba 1 ml odměrného roztoku jodu (5.2.14) odpovídá 1,5 mg formaldehydu.
- 5.2.19 *Standardní roztok formaldehydu: zředěný roztok*
 Zásobní roztok formaldehydu se zředí v poměru 1/100 mobilní fází (5.2.16). 1 ml výsledného roztoku obsahuje asi 37 µg formaldehydu. Přesný obsah se vypočte.
- 5.3 **Přístroje a pomůcky**
- 5.3.1 Obvyklé laboratorní vybavení

- 5.3.2 Bezpulzní čerpadlo pro HPLC
- 5.3.3 Nízkotlaké bezpulzní čerpadlo pro činidlo (případně druhé čerpadlo pro HPLC)
- 5.3.4 Nastříkovací ventil se smyčkou o objemu 10 μ l
- 5.3.5 Reaktor za kolonou obsahující následující prvky:
- jednolitrová tříhrdlá baňka,
 - jednolitrové topné hnízdo,
 - dvě kolony Vigreux o minimálně 10 patrech, vzduchem chlazené,
 - trubice z nerezové oceli (sloužící jako výměník tepla) 1,6 mm, vnitřní průměr 0,23 mm, délka 400 mm,
 - teflonová trubice 1,6 mm, vnitřní průměr 0,23 mm, délka 5 m (francouzské pletivo – viz příloha 1),
 - jeden díl ve tvaru T bez mrtvého objemu (Valco nebo ekvivalentní),
 - tři spojky bez mrtvého objemu,
- nebo:* jeden modul za kolonou Applied Biosystems PCRS 520 nebo ekvivalentní s reaktorem o objemu 1 ml.
- 5.3.6 Membránový filtr, velikost pórů 0,45 μ m
- 5.3.7 Patrona SEP-PAK® C₁₈ nebo ekvivalentní
- 5.3.8 *Hotové kolony:*
- Bischoff Hypersil RP 18 (typ NC číslo C 25.46 1805), (5 μ m, délka 250 mm, vnitřní průměr 4,6 mm),
 - nebo DuPont, Zorbax ODS (5 μ m, délka 250 mm, vnitřní průměr 4,6 mm),
 - nebo Phase SEP, spherisorb ODS 2 (5 μ m, délka 250 mm, vnitřní průměr 4,6 mm).
- 5.3.9 *Předkolona*
- Bischoff K₁ hypersil RP 18 (typ K1 G 6301 1805) (5 μ m, délka 10 mm) nebo ekvivalentní.
- 5.3.10 Kolona a předkolona se spojí systémem Ecotube (typ A 15020508 Bischoff) nebo ekvivalentním.
- 5.3.11 Aparatura (5.3.3) se sestaví podle blokového schématu v příloze 2.
- Spoje za nastříkovacím ventilem musí být co nejkratší. V tomto případě má trubka z nerezové oceli mezi výstupem z reaktoru a vstupem do detektoru ochladit směs před detekcí; teplota detektoru není známa, ale je konstantní.
- 5.3.12 Detektor pro viditelnou a UV oblast
- 5.3.13 Zapisovač
- 5.3.14 Odstředivka
- 5.3.15 Ultrazvuková lázeň
- 5.3.16 Vibrační míchadlo (Vortex nebo ekvivalentní)

5.4 Postup

5.4.1 Kalibrační křivka

Sestrojí se vynesáním výšek piků jako funkce koncentrace zředěných formaldehydových kalibračních roztoků.

Kalibrační roztoky se připraví zředěním standardního roztoku formaldehydu (5.2.19) mobilní fází (5.2.16):

- 1,00 ml roztoku (5.2.19) se zředí na 20,00 ml (asi 185 µg/100 ml)
- 2,00 ml roztoku (5.2.19) se zředí na 20,00 ml (asi 370 µg/100 ml)
- 5,00 ml roztoku (5.2.19) se zředí na 25,00 ml (asi 740 µg/100 ml)
- 5,00 ml roztoku (5.2.19) se zředí na 20,00 ml (asi 925 µg/100 ml).

Kalibrační roztoky se ponechají asi jednu hodinu stát při pokojové teplotě a musí být čerstvě připraveny. Kalibrační křivka je lineární pro koncentrace od 1,00 do 15,00 µg/ml.

5.4.2 Příprava vzorků

5.4.2.1 Emulze (krémy, make-up, oční stíny)

Do odměrné baňky na 100 ml s uzávěrem se s přesností na 0,001 g naváží zkušební vzorek (m gramů) odpovídající očekávanému obsahu 100 µg formaldehydu. Přidá se přesně 20,00 ml dichlormethanu (5.2.8) a 20,00 ml kyseliny chlorovodíkové (5.2.12). Promíchá se pomocí vibračního míchadla (5.3.16) a v ultrazvukové lázni (5.3.15). Fáze se oddělí odstředěním (dvě minuty při 3000 g). Mezitím se promyje patrona (5.3.7) 2 ml methanolu (5.2.7) a kondicionuje se 5 ml vody (5.2.1). Kondicionovanou patronou se nechají protéci 4 ml vodné fáze extraktu, první dva mililitry se odstraní a následující podíl se zachytí.

5.4.2.2 Pleťové lotiony, šampony

Do odměrné baňky na 100 ml s uzávěrem se s přesností na 0,001 g naváží zkušební vzorek (m gramů) odpovídající očekávanému obsahu 500 µg formaldehydu.

Doplní se po rysku mobilní fází (5.2.16).

Roztok se zfiltruje přes filtr (5.3.6) a nastříkne, nebo se nechá protéci patronou předem kondicionovanou podle bodu 5.4.2.1. Všechny roztoky musí být nastříknuty ihned po přípravě.

5.4.3 Chromatografické podmínky

- Průtok mobilní fáze: 1,0 ml/min,
- Průtok činidla: 0,5 ml/min,
- Celkový průtok na výstupu z detektoru: 1,5 ml/min,
- Objem nástřiku: 10 µl,
- Eluční teplota: u obtížných separací se kolona ponoří do ledové lázně a vyčká se do ustálení teploty (15 až 20 minut),
- Teplota reakce za kolonou: 100 °C,
- Detekce: při 420 nm.

Poznámka: Celý chromatografický systém a systém za kolonou je nutno po použití propláchnout vodou (5.2.1). Nepoužije-li se systém do dvou dnů, musí po tomto proplachu následovat ještě propláchnutí methanolem (5.2.7). Před novým kondicionováním se systémem nechá protéci voda, aby se zabránilo rekrystalizaci.

5.5 Výpočet

Emulze: (5.4.2.1):

Obsah formaldehydu v % (m/m):

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

Pleťové lotiony a šampony:

V tomto případě platí vzorec:

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

kde

m = hmotnost analyzovaného vzorku v gramech (5.4.2.1),

C = koncentrace formaldehydu v µg/100 ml odečtená z kalibrační křivky (5.4.1).

5.6 Opakovatelnost⁽³⁾

Pro výrobky obsahující asi 0,05 % (m/m) formaldehydu nesmí rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení na stejném vzorku překročit absolutní hodnotu 0,001 %.

Pro výrobky obsahující asi 0,2 % (m/m) formaldehydu nesmí rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení na stejném vzorku překročit absolutní hodnotu 0,005 %.

Příloha 1

POKYNY PRO ZHOTOVENÍ „FRANCOUZSKÉHO PLETIVA“

NEZBYTNÉ PŘÍSLUŠENSTVÍ

- Dřevěná navíjecí cívka:
vnější průměr 5 cm s otvorem o průměru 1,5 cm uprostřed. Cívka se opatří čtyřmi ocelovými hřebíky (podle obrázků 7 a 8). Vzdálenost mezi dvěma hřebíky musí být 1,8 cm a musí být ve vzdálenosti 0,5 cm od středového otvoru;
- jedna pevná zahnutá jehla (háček) k protahování teflonové kapiláry;
- 5 m teflonové kapiláry o průměru 1,6 mm, vnitřního průměru 0,3 mm.

POSTUP:

Před zhotovením „francouzského pletiva“ musí být teflonová kapilára protažena středovým otvorem od horního konce cívky k dolnímu konci (asi 10 cm kapiláry se nechá vyčnívat z dolního konce cívky, což umožní protáhnout řetízek během pletení); poté se kapilára ovine kolem čtyř hřebíků, jak je znázorněno na obrázku 9.

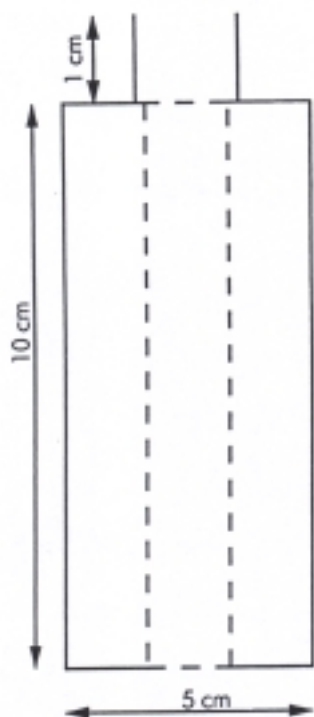
Horní a dolní část pletiva bude chráněna kovovými kroužky a stahovacími šrouby; při utahování je třeba dbát na to, aby se teflon nepoškodil. Kapilára se podruhé ovine kolem každého hřebíku a následujícím způsobem se vytvoří „steh“:

- spodní část kapiláry se háčkem přetáhne přes horní část kapiláry (obrázek 10). Toto se postupně opakuje u každého hřebíku (1, 2, 3 a 4 proti směru hodinových ručiček), dokud se nezhotoví 5 m nebo požadovaná délka pletiva.

³ Viz ČSN ISO 5725.

Je nutno ponechat asi 10 cm kapiláry k uzavření řetízku. Kapilára se provlékne každou ze čtyř smyček a lehce se utáhne tak, aby se řetízek uzavřel.

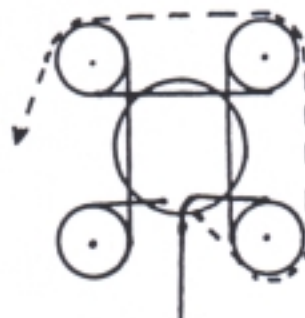
Poznámka: Francouzské pletivo pro reaktory za kolonou je komerčně dostupné (Supelco).



Obrázek 7
Schématické vyobrazení cívky

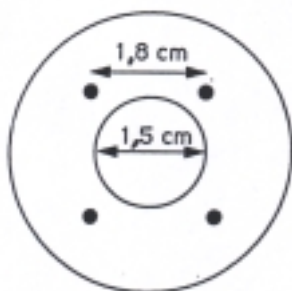


Obrázek 9
První řada



Obrázek 10
Druhá řada

„Steh“ se vytvoří tak, že se spodní kapilára (znázorněná plnou čarou) přetáhne přes druhou kapiláru (znázorněná čárkovaně)



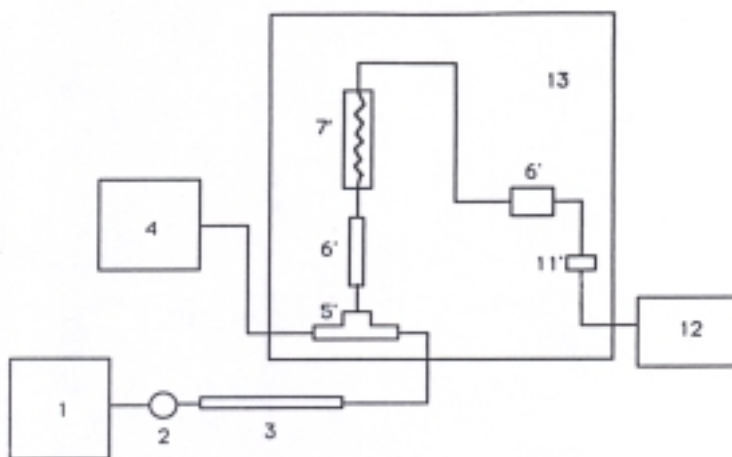
Obrázek 8



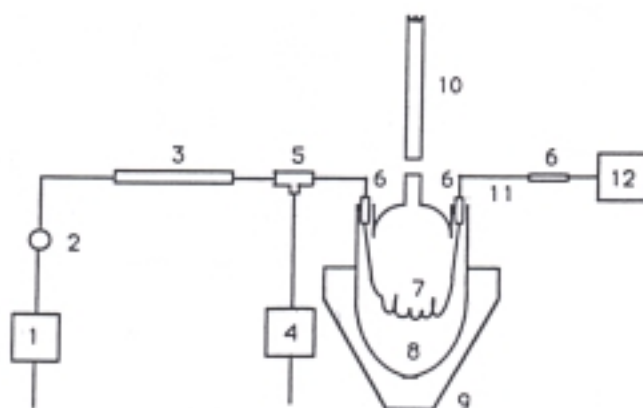
Obrázek 11

- 1 = čerpadlo pro HPLC
- 2 = nastřikovací ventil
- 3 = kolona s předkolonou
- 4 = čerpadlo pro činidla
- 5 = díl ve tvaru T bez mrtvého objemu
- 5' = díl ve tvaru T (Vortex)
- 6 - 6' = spojka bez mrtvého objemu
- 7 = „francouzské pletivo“
- 7' = reaktor
- 8 = tříhrdlá baňka s vroucí vodou
- 9 = topné hnízdo
- 10 = chladič
- 11 = výměník tepla z nerezové trubky
- 11' = výměník tepla
- 12 = detektor pro viditelnou a UV oblast
- 13 = modul za kolonou PCRS 520

5.3.5



5.3.6



Eluční činidlo

Činidlo

KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ DICHLORMETHANU A 1,1,1-TRICHLORETHANU

(Směrnice komise 83/514/EHS z 27. září 1983)

1. ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ
V této metodě je popsáno kvantitativní stanovení dichlormethanu (methylenchloridu) a 1,1,1-trichlorethanu (methylchloroformu) ve všech kosmetických prostředcích, které by mohly obsahovat tato rozpouštědla.
2. DEFINICE
Obsah dichlormethanu a 1,1,1-trichlorethanu ve vzorku stanovený touto metodou se vyjádří v hmotnostních procentech.
3. PRINCIP
Tato metoda využívá plynové chromatografie s chloroformem jako vnitřním standardem.
4. REAKČNÍ ČINIDLA
Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a.
 - 4.1 Chloroform (CHCl_3)
 - 4.2 Chlorid uhličitý (CCl_4)
 - 4.3 Dichlormethan (CH_2Cl_2)
 - 4.4 1,1,1-Trichlorethan (CH_3CCl_3)
 - 4.5 Aceton
 - 4.6 Dusík
5. PŘÍSTROJE A POMŮCKY
 - 5.1 Obvyklé laboratorní zařízení
 - 5.2 Plynový chromatograf vybavený tepelně vodivostním detektorem.
 - 5.3 Láhev na převedení vzorku na 50 až 100 ml (viz kapitola „Příprava vzorků v laboratoři“)
 - 5.4 Tlaková injekční stříkačka, na 25 nebo 50 μl (viz kapitola „Příprava vzorků v laboratoři“)
6. POSTUP
 - 6.1 Vzorek bez přetlaku: vzorek se přesně naváží do Erlenmeyerovy baňky se zátkou. Přidá se přesně zvážené množství chloroformu (4.1) jako vnitřní standard, odpovídající předpokládanému množství dichlormethanu a 1,1,1-trichlorethanu obsaženému ve vzorku. Důkladně se promíchá.
 - 6.2 Vzorek v obalu na aerosoly: Použije se postup odběru vzorků, popsáný v kapitole „Příprava vzorků v laboratoři“, avšak s následujícími úpravami:
 - 6.2.1 Po převedení vzorku do lahve (5.3) se dále do lahve přidá jako vnitřní standard objem chloroformu (4.1), odpovídající předpokládanému množství dichlormethanu a/nebo 1,1,1-trichlorethanu obsaženému ve vzorku. Důkladně se promíchá. Mrtvý objem ventilu se vypláchne 0,5 ml chloridu uhličitým (4.2). Po vysušení se z rozdílu přesně stanoví přidaná hmotnost vnitřního standardu.
 - 6.2.2 Po naplnění stříkačky vzorkem by se měla špička stříkačky vypláchnout dusíkem (4.6), aby v ní nezůstal před vstříknutím do chromatografu žádný zbytek vzorku.

- 6.2.3 Po odebrání každého vzorku by se měl povrch ventilu a spojky několikrát opláchnut acetonem (4.5) (v případě potřeby se použije injekční stříkačka) a poté důkladně vysušit dusíkem (4.6).
- 6.2.4 Při každé analýze se pro měření použijí dvě různé lahve pro převádění vzorku a pro každou láhev se provede pět měření.

7. CHROMATOGRAFICKÉ PODMÍNKY

7.1 Předkolona

Materiál kolony: nerezová ocel.

Délka: 300 mm.

Průměr: 3 nebo 6 mm.

Náplň: stejný materiál jako u analytické kolony.

7.2 Kolona

Stacionární fáze je připravena z Hallcomidu M 18 na chromosorb. Kolona musí poskytovat rozlišení „R“ rovné nebo lepší než 1,5, kde:

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

kde:

r_1 a r_2 = retenční časy dvou píků (v minutách),

W_1 a W_2 = šířky píků v polovině výšky píků (v milimetrech),

d' = rychlost posuvu papíru (v milimetrech za minutu).

7.3 Jako příklady jsou uvedeny kolony, které poskytují hledané výsledky:

<i>Kolona</i>	<i>I</i>	<i>II</i>
Materiál kolony:	nerezová ocel	nerezová ocel
Délka:	350 cm	400 cm
Průměr:	3 mm	6 mm
Náplň:		
chromosorb:	WAW	WAW-DMCS-HP
zrnitost:	100 až 120 mesh	60 až 80 mesh
Stacionární fáze:	Hallcomid M 18, 10 %	Hallcomid M 18, 20%

Teplotní podmínky se mohou měnit v závislosti na přístroji. V příkladech byly nastaveny takto:

<i>Kolona</i>	<i>I</i>	<i>II</i>
Teploty:		
kolona:	65 °C	75 °C
nástřík:	150 °C	125 °C
detektor:	150 °C	200 °C
Nosný plyn:		
průtok helia:	45 ml/min	60 ml/min
vstupní tlak:	2,5 bar	2,0 bar
Nástřík:	15 µl	15 µl

8. SMĚS PRO STANOVENÍ FAKTORŮ ODEZVY

Do Erlenmeyerovy baňky se zátkou se přesně naváží směs:

Dichlormethan (4.3), 30% (m/m),

1,1,1-trichlorethan (4.4), 35% (m/m),

Chloroform (4.1), 35% (m/m).

9. VÝPOČTY

9.1 *Výpočet koeficientu úměrnosti látky „p“ vzhledem k látce „a“ vybrané jako vnitřní standard*

Označí-li se první látka jako „p“, tak je

k_p = její koeficient úměrnosti,

m_p = její hmotnost ve směsi,

A_p = její plocha píku.

Označí-li se druhá látka jako „a“, tak je

k_a = její koeficient úměrnosti (=1),

M_a = její hmotnost ve směsi,

A_a = její plocha píku,

potom

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

Byly získány například následující koeficienty úměrnosti (pro chloroform: $k = 1$):

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

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

9.2 *Výpočet % (m/m) dichlormethanu a 1,1,1-trichlorethanu přítomného ve vzorku, který má být analyzován*

Označí-li se:

m_a = hmotnost použitého chloroformu (v g),

M_s = hmotnost vzorku k analýze (v g),

A_a = plocha píku chloroformu,

A_1 = plocha píku dichlormethanu,

A_2 = plocha píku 1,1,1-trichlorethanu,

potom

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

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

10. OPAKOVATELNOST³⁾

Pro výrobky obsahující asi 25 % (m/m) dichlormethanu a 1,1,1-trichlorethanu nesmí rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení na stejném vzorku překročit absolutní hodnotu 2,5 %.

KVALITATIVNÍ A KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ CHINOLIN-8-OLU A BIS(CHINOLIN-8-OL)-SULFÁTU

(Směrnice komise 83/514/EHS z 27. září 1983)

1. ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ

Tato metoda popisuje kvalitativní a kvantitativní stanovení chinolin-8-olu a jeho sulfátu.

2. DEFINICE

Obsah chinolin-8-olu a bis(chinolin-8-ol)-sulfátu ve vzorku stanovený touto metodou se vyjádří v hmotnostních procentech chinolin-8-olu.

3. PRINCIP

3.1 Kvalitativní stanovení

Ke kvalitativnímu stanovení se využívá chromatografie na tenké vrstvě.

3.2 Kvantitativní stanovení

Kvantitativní stanovení se provede pomocí spektrofotometrie komplexu vzniklého reakcí s Fehlingovým roztokem při 410 nm.

4. REAKČNÍ ČINIDLA

Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a.

4.1 Chinolin-8-ol

4.2 Benzen. Vzhledem k jeho toxicitě je třeba s benzenem pracovat opatrně.

4.3 Chloroform

4.4 Vodný roztok hydroxidu sodného, 50% roztok (m/m)

4.5 Síran měďnatý pentahydrát

4.6 Vinan draselno-sodný

4.7 Kyselina chlorovodíková, 1M

4.8 Kyselina sírová, 0,5M

4.9 Roztok hydroxidu sodného, 1M.

4.10 Ethanol

4.11 Butan-1-ol

4.12 Ledová kyselina octová

4.13 Kyselina chlorovodíková, 0,1M

³ Viz ČSN ISO 5725

- 4.14 „Celit 545“ nebo ekvivalent
- 4.15 *Standardní roztoky*
- 4.15.1 Do odměrné baňky na 100 ml se naváží 100 mg chinolin-8-olu (4.1). Rozpustí se v malém množství kyseliny sírové (4.8). Doplní se kyselinou sírovou (4.8) po rysku.
- 4.15.2 Do odměrné baňky na 100 ml se naváží 100 mg chinolin-8-olu. Rozpustí se v ethanolu (4.10). Doplní se po rysku ethanol (4.10) a promíchá.
- 4.16 *Fehlingův roztok*
- Roztok A*
- Do odměrné baňky na 100 ml se naváží 7 g síranu měďnatého pentahydrátu (4.5). Rozpustí se v malém množství vody. Doplní se po rysku vodou a promíchá.
- Roztok B*
- Do odměrné baňky na 100 ml se naváží 35 g vinanu draselného-sodného (4.6). Rozpustí se v 50 ml vody. Přidá se 20 ml hydroxidu sodného (4.4). Doplní se po rysku vodou a promíchá. Bezprostředně před použitím se do odměrné baňky na 100 ml odpipetuje 10 ml roztoku A a 10 ml roztoku B. Doplní se po rysku a promíchá.
- 4.17 *Vyvíjecí rozpouštědla pro chromatografii na tenké vrstvě*
- I : Butan-1-ol (4.11)/kyselina octová (4.12)/voda (80:20:20, V/V/V).
- II : Chloroform (4.13)/kyselina octová (4.12) (95:5, V/V).
- 4.18 2,6-dichlor-4-(chlorimino)cyklohexa-2,5-dienon, 1% (m/V) roztok v ethanolu (4.10)
- 4.19 Uhličitan sodný, 1% (m/V) roztok ve vodě
- 4.20 Ethanol (4.10), 30% (V/V) roztok ve vodě
- 4.21 Dinatrium-dihydrogen-ethylendiamintetraacetát, 5% (m/V) roztok ve vodě
- 4.22 *Pufrační roztok, pH 7*
- Do odměrné baňky na 1 litr se naváží 27 g bezvodého dihydrogenfosforečnanu draselného a 70 g hydrogenfosforečnanu didraselného trihydrátu. Doplní se vodou po rysku.
- 4.23 *Hotové desky pro chromatografii na tenké vrstvě*
- Hotové desky pro chromatografii na tenké vrstvě o tloušťce 0,25 mm (např. Merck Kieselgel 60 nebo ekvivalentní). Před použitím se deska postříká 10 ml činidla (4.21) a usuší se při 80 °C.
5. PŘÍSTROJE A POMŮCKY
- 5.1 Baňka se zábrusem na 100 ml s kulatým dnem
- 5.2 Odměrné baňky
- 5.3 Dělené pipety na 10 a 5 ml
- 5.4 Nedělené pipety na 20, 15, 10 a 5 ml
- 5.5 Dělicí nálevky na 100, 50 a 25 ml
- 5.6 Skládáný papírový filtr, průměr 90 mm
- 5.7 Rotační odparka
- 5.8 Zpětný chladič se zábrusem
- 5.9 Spektrofotometr

- 5.10 Optické kyvety s optickou dráhou o délce 10 mm
- 5.11 Míchačka s elektrickým vyhříváním
- 5.12 Skleněná chromatografická kolona o těchto rozměrech: 160 mm dlouhá s průměrem 8 mm, na spodním, zúženém konci se zátkou ze skelné vaty, a s nástavcem pro aplikaci tlaku na horním konci.
6. POSTUP
- 6.1 **Kvalitativní stanovení**
- 6.1.1 *Kapalné vzorky*
- 6.1.1.1 U části testovaného vzorku se upraví pH na 7,5 a 10 μ l se nanese na startovací linii předem upravené silikagelové desky pro chromatografii na tenké vrstvě (4.23).
- 6.1.1.2 Do dvou dalších bodů startovací linie se nanese 10 a 30 μ l standardního roztoku (4.15.2), poté se chromatogram vyvíjí v jednom z vyvíjecích rozpouštědel (4.17).
- 6.1.1.3 Když čelo postoupí o 150 mm, deska se suší při 110 °C (15 minut). Pod UV lampou (366 nm) skvrny chinolin-8-olu žlutě fluoreskují.
- 6.1.1.4 Deska se postříká roztokem uhličitanu sodného (4.19). Usuší se a postříká se roztokem 2,6-dichlor-4-(chlorimino)cyklohexa-2,5-dienonu (4.18). Skvrny chinolin-8-olu se zbarví modře.
- 6.1.2 *Pevné vzorky nebo krémy*
- 6.1.2.1 1 g vzorku se rozptýlí v 5 ml pufrčního roztoku (4.22). Potom se pomocí 10 ml chloroformu (4.3) převede do dělicí nálevky a protřepe se. Po oddělení vrstvy chloroformu se vodná vrstva ještě dvakrát extrahuje 10 ml chloroformu (4.3). Spojené a přefiltrované chloroformové extrakty se v baňce s kulatým dnem na 100 ml (5.1) odpaří téměř do sucha na rotační odparce (5.7). Odparek se rozpustí ve 2 ml chloroformu (4.3) a 10 a 30 μ l získaného roztoku se nanese na silikagelovou desku pro chromatografii na tenké vrstvě (4.23) podle postupu popsaného v bodě 6.1.1.1 a dále.
- 6.1.2.2 Na desku se nanese 10 a 30 μ l standardního roztoku (4.15.2) a pokračuje se podle postupu popsaného v bodech 6.1.1.2 až 6.1.1.4.
- 6.2 **Kvantitativní stanovení**
- 6.2.1 *Kapalné vzorky*
- 6.2.1.1 Do baňky s kulatým dnem se naváží 5 g vzorku. Přidá se 1 ml roztoku kyseliny sírové (4.8) a směs se odpaří téměř do sucha za sníženého tlaku při teplotě 50 °C.
- 6.2.1.2 Tento zbytek se rozpustí ve 20 ml teplé vody. Převede se do odměrné baňky na 100 ml. Vypláchne se třikrát 20 ml vody. Doplní se na 100 ml vodou a promíchá.
- 6.2.1.3 5 ml tohoto roztoku se odpipetuje do dělicí nálevky na 50 ml (5.5). Přidá se 10 ml Fehlingova roztoku (4.16). Měďnatý komplex chinolin-8-olu se třikrát extrahuje 8 ml chloroformu (4.3).
- 6.2.1.4 Chloroformové vrstvy se zfiltrují a shromáždí v odměrné baňce na 25 ml (5.2). Doplní se po rysku chloroformem (4.3) a protřepou se. Absorbance žlutého roztoku se měří při 410 nm proti chloroformu.
- 6.2.2 *Pevné vzorky a krémy*
- 6.2.2.1 Do baňky na 100 ml s kulatým dnem (4.1) se naváží 0,500 g vzorku. Přidá se 30 ml benzenu (4.2) a 20 ml kyseliny chlorovodíkové (4.7). Roztok se za míchání 30 minut vaří pod zpětným chladičem.

- 6.2.2.2 Obsah se převede do dělicí nálevky na 100 ml (5.5). Vypláchne se 5 ml 1N HCl (4.7). Vodná fáze se převede do baňky s kulatým dnem (5.1), benzenová fáze se promyje 5 ml kyseliny chlorovodíkové (4.7).
- 6.2.2.3 V případě emulzí, které brání dalšímu postupu, se smísí 0,500 g vzorku s 2 g Celitu 545 (4.14), čímž vznikne sypký prášek. Směs se v malých dávkách převede do skleněné chromatografické kolony (5.12).
- Po každém přidavku se náplň kolony stlačí. Jakmile se celý vzorek převede do kolony, eluuje se kyselinou chlorovodíkovou (4.13) takovým způsobem, aby se získalo 10 ml eluátu asi za 10 minut (pokud je to nutné, eluce může probíhat za mírného přetlaku dusíku). Během eluce je třeba zajistit, aby nad vrstvou náplně kolony bylo stále trochu kyseliny chlorovodíkové. Prvních 10 ml eluátu se podrobí dalšímu postupu popsanému v bodě 6.2.2.4.
- 6.2.2.4 Spojené vodné fáze (6.2.2.2) nebo eluát z kolony (6.2.2.3) se v rotační odparce za sníženého tlaku odpaří téměř do sucha.
- 6.2.2.5 Zbytek se rozpustí v 6 ml roztoku hydroxidu sodného (4.9). Přidá se 20 ml Fehlingova roztoku (4.16) a obsah se převede do dělicí nálevky na 50 ml (5.5). Baňka se vypláchne 8 ml chloroformu (4.3). Protřepe se a chloroformová fáze se zfiltruje do odměrné baňky na 50 ml (5.2).
- 6.2.2.6 Extrakce s 8 ml chloroformu (4.3) se třikrát opakuje. Chloroformové fáze se shromáždí v odměrné baňce na 50 ml. Doplní se po rysku chloroformem (4.3) a protřepe. Měří se absorbance žlutého roztoku při 410 nm proti chloroformu (4.3).

7. KALIBRAČNÍ KŘIVKA

Do čtyř baněk na 100 ml s kulatým dnem (5.1), z nichž každá obsahuje 3 ml 30% vodného roztoku ethanolu (4.20), se odpipetuje 5, 10, 15 a 20 ml standardního roztoku (4.15.1), což odpovídá 5, 10, 15 a 20 mg chinolin-8-olu. Pokračuje se tak, jak je popsáno v bodě 6.2.1.

8. VÝPOČET

8.1 *Kapalné vzorky*

$$\text{Obsah chinolin-8-olu (v \% (m/m))} = \frac{a}{m} \times 100$$

kde:

a = množství chinolin-8-olu odečtené z kalibrační křivky (7) v mg,

m = hmotnost (v mg) zkušební vzorku (6.2.1.1).

8.2 *Pevné vzorky nebo krémy*

$$\text{Obsah chinolin-8-olu (v \% (m/m))} = \frac{2 a}{m} \times 100$$

kde:

a = množství chinolin-8-olu odečtené z kalibrační křivky (7) v mg,

m = hmotnost (v mg) zkušební vzorku (6.2.1.1).

9. OPAKOVATELNOST⁽³⁾

Pro výrobky obsahující asi 0,3 % (m/m) chinolin-8-olu nesmí rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení na stejném vzorku překročit absolutní hodnotu 0,02 %.

³ Viz ČSN ISO 5725

KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ AMONIAKU

(Směrnice komise 83/514/EHS z 27. září 1983)

1. ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ

V této metodě je popsáno stanovení volného amoniaku v kosmetických prostředcích.

2. DEFINICE

Obsah amoniaku ve vzorku stanovený touto metodou se vyjádří v hmotnostních procentech amoniaku.

3. PRINCIP

Ke zkušebnímu vzorku kosmetického prostředku zředěného vodným roztokem methanolu se přidá roztok chloridu barnatého. Případná sraženina se odfiltruje nebo odstředí. Tímto postupem se zabrání ztrátám amoniaku, ke kterým dochází při destilaci s vodní parou u některých amonných solí, jako je uhličitan a hydrogenuhličitan a soli mastných kyselin, s výjimkou octanu amonného.

Z filtrátu nebo supernatantu se amoniak oddestiluje s vodní parou a stanoví se potenciometrickou nebo jinou titrací.

4. REAKČNÍ ČINIDLA

Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a.

4.1 Methanol

4.2 Chlorid barnatý dihydrát, 25 % roztok (m/V)

4.3 Kyselina trihydrogenboritá, 4 % roztok (m/V)

4.4 Kyselina sírová, 0,25M odměrný roztok

4.5 Kapalný odpěňovač

4.6 Hydroxid sodný, 0,5M odměrný roztok

4.7 Indikátor, podle potřeby: smísí se 5 ml 0,1% roztoku (m/V) methylové červeně v ethanolu s 2 ml 0,1% roztoku (m/V) methylenové modři ve vodě.

5. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

5.1 Obvyklé laboratorní vybavení

5.2 Odstředivka s uzavíratelnými kyvetami na 100 ml

5.3 Přístroj na destilaci s vodní parou

5.4 Potenciometr

5.5 Měrná skleněná elektroda a referentní kalomelová elektroda.

6. POSTUP

6.1 Do odměrné baňky na 100 ml se naváží vzorek o hmotnosti (m) odpovídající maximálně 150 mg amoniaku.

6.2 Přidá se 10 ml vody, 10 ml methanolu (4.1) a 10 ml roztoku chloridu barnatého (4.2). Doplní se na 100 ml methanolem (4.1).

- 6.3 Roztok se promíchá a nechá stát přes noc v lednici (5 °C).
- 6.4 Poté se chladný roztok zfiltruje nebo odstředí 10 minut v uzavřených kyvetách, aby se získal čirý filtrát nebo vrstva supernatantu.
- 6.5 40 ml tohoto čirého roztoku se odpipetuje do přístroje na destilaci s vodní parou (5.3) a eventuálně se přidá 0,5 ml kapalného odpěňovače (4.5).
- 6.6 Destiluje se a 200 ml destilátu jímá se do kádinky na 250 ml obsahující 10 ml odměrného roztoku kyseliny sírové (4.4) a 0,1 ml indikátoru (4.7).
- 6.7 Nadbytek kyseliny se zpětně titruje odměrným roztokem hydroxidu sodného (4.6).
- 6.8 *Poznámka:* Pro potenciometrické stanovení se jímá 200 ml destilátu do kádinky na 250 ml obsahující 25 ml roztoku trihydrogenborité kyseliny (4.3) a titruje se odměrným roztokem kyseliny sírové (4.4), zaznamená se neutralizační křivka.

7. VÝPOČTY

7.1 Výpočet v případě zpětné titrace

Označí-li se

V_1 = objem použitého roztoku hydroxidu sodného (4.6) (v ml),

M_1 = jeho titr (4.6),

M_2 = titrační faktor roztoku kyseliny sírové (4.4),

m = hmotnost odebraného zkušební vzorku (6.1) (v mg),

potom:

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

7.2 Výpočet v případě přímé potenciometrické titrace

Označí-li se

V_2 = objem použitého roztoku kyseliny sírové (4.4) (v ml),

M_2 = jeho titr (4.4),

m = hmotnost odebraného zkušební vzorku (6.1) (v mg),

potom:

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

8. OPAKOVATELNOST⁽³⁾

Pro výrobky obsahující asi 6 % (m/m) amoniaku nesmí rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení na stejném vzorku překročit absolutní hodnotu 0,6 %.

³ Viz ČSN ISO 5725

KVALITATIVNÍ A KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ NITROMETHANU

(Směrnice komise 83/514/EHS z 27. září 1983)

1. ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ

Tato metoda je vhodná pro kvalitativní a kvantitativní stanovení nitromethanu až do obsahu asi 0,3 % v kosmetických prostředcích v obalech na aerosoly.

2. DEFINICE

Obsah nitromethanu ve vzorku stanovený touto metodou se vyjadřuje v hmotnostních procentech nitromethanu, vztažených na celkový obsah aerosolového prostředku.

3. PODSTATA METODY

Nitromethan se kvalitativně stanoví na základě barevné reakce. Nitromethan se kvantitativně stanoví plynovou chromatografií po přidání vnitřního standardu.

4. KVALITATIVNÍ STANOVENÍ

4.1 *Reakční činidla*

Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a.

4.1.1 Hydroxid sodný, 0,5M roztok

4.1.2 *Folinovo činidlo*

Ve vodě se rozpustí 0,1 g 3,4-dihydro-3,4-dioxonaftalen-1-sulfonátu sodného a doplní se na 100 ml.

4.2 *Postup*

K 1 ml vzorku se přidá 10 ml roztoku 4.1.1 a 1 ml roztoku 4.1.2. Fialové zbarvení indikuje přítomnost nitromethanu.

5. KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ

5.1 *Reakční činidla*

Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a.

5.1.1 Chloroform (vnitřní standard 1)

5.1.2 2,3-dimethylheptan (vnitřní standard 2)

5.1.3 Ethanol, 95 %

5.1.4 Nitromethan

5.1.5 *Referenční roztok chloroformu*

Do vytárované odměrné baňky na 25 ml se přidá asi 650 mg chloroformu (5.1.1). Baňka a obsah se znovu přesně zváží. Doplní se na 25 ml 95% ethanolem (5.1.3). Zváží se a vypočtou se hmotnostní procenta chloroformu v tomto roztoku.

5.1.6 *Referenční roztok 2,4-dimethylheptanu*

Připraví se obdobně jako referenční roztok chloroformu, ale naváží se 270 mg 2,4-dimethylheptanu (5.1.2) do odměrné baňky na 25 ml.

5.2 *Přístroje a pomůcky*

5.2.1 Plynový chromatograf s plamenovým ionizačním detektorem

Pomůcky pro odběr vzorků aerosolů (láhev pro převedení vzorku, spojky, mikrostříkačky, atd.), jak jsou popsány v kapitole „Příprava vzorků v laboratoři“.

5.2.3 Obvyklé laboratorní vybavení

5.3 *Postup*

5.3.1 *Příprava vzorku*

Do vytárované lahve na převedení vzorku na 100 ml, propláchnuté nebo evakuované podle postupu popsaného v bodě 5.4 kapitoly „Příprava vzorků v laboratoři“, se přidá asi 5 ml jednoho z roztoků vnitřních standardů (5.1.5 nebo 5.1.6). Použije se 10 ml nebo 20 ml skleněná stříkačka bez jehly uzpůsobená k připojení ke spojce podle postupu popsaného v bodě 5 kapitoly „Příprava vzorků v laboratoři“. Znovu se zváží, aby se stanovilo přidané množství. Stejným postupem se do této lahve převede asi 50 g obsahu aerosolového prostředku. Znovu se zváží, aby se stanovilo množství převedeného vzorku. Dobře se promíchá.

Nastříkuje se asi 10 µl pomocí speciální mikrostríkačky (5.2.2). Provádí se pět nástřiků.

5.3.2 *Příprava standardu*

Do odměrné baňky na 50 ml se přesně naváží asi 500 mg nitromethanu (5.1.4) a buď 500 mg chloroformu (5.1.1), nebo 210 mg 2,4-dimethylheptanu (5.1.2). Doplní se na objem 95% ethanolem (5.1.3). Dobře se promíchá. 5 ml tohoto roztoku se převede do odměrné baňky na 20 ml. Doplní se na objem 95% ethanolem (5.1.3).

Nastříkuje se asi 10 µl pomocí speciální mikrostríkačky (5.2.2). Provádí se pět nástřiků.

5.3.3 *Podmínky plynové chromatografie*

5.3.3.1 Kolona

Skládá se ze dvou částí; první obsahuje jako náplň didecylftalát na Gas Chromu Q, druhá UCON 50 HB 280X na Gas Chromu Q. Přípravená kombinovaná kolona musí zaručit rozlišení „R“ rovné nebo lepší než 1,5, kde:

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

kde

r_1 a r_2 = retenční časy dvou píků v minutách,

W_1 a W_2 = šířka píků v polovině výšky píků (v milimetrech),

d' = rychlost posuvu papíru (v milimetrech za minutu).

Kolona A:

Materiál: nerezová ocel.

Délka: 1,5 m.

Průměr: 3 mm.

Náplň: 20% didecylftalát na Gas Chromu Q (100 až 120 mesh).

Kolona B:

Materiál: nerezová ocel.

Délka: 1,5 m.

Průměr: 3 mm.

Náplň: 20% UCON 50 HB 280X na Gas Chromu Q (100 až 120 mesh).

5.3.3.2 Detektor

Vhodné nastavení citlivosti elektrometru plamenového ionizačního detektoru je 8×10^{-10} A.

5.3.3.3 Teplotní podmínky

Jako vhodné se ukázaly následující podmínky:

Nástřík: 150 °C

Detektor: 150 °C

Kolona: mezi 50 a 80 °C, v závislosti na použitých kolonách a přístroji.

5.3.3.4 Plyny

Nosný plyn: dusík.

Tlak: 2,1 bar.

Průtok: 40 ml/min.

Plyny pro detektor: podle specifikací výrobce detektoru.

6. VÝPOČTY

6.1 *Koeficient úměrnosti nitromethanu vypočtený vzhledem k použitému vnitřnímu standardu*

Označí-li se nitromethan jako „n“,

příčemž

k_n = jeho koeficient úměrnosti,

m'_n = jeho hmotnost ve směsi (v gramech),

S'_n = plocha jeho píku,

a označí-li se vnitřní standard, chloroform nebo 2,4-dimethylheptan, jako „c“,

příčemž

m'_c = jeho hmotnost ve směsi (v gramech),

S'_c = plocha jeho píku,

potom:

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

(k_n je funkcí přístroje).

6.2 *Koncentrace nitromethanu ve vzorku*

Označí-li se nitromethan jako „n“,

příčemž

k_n = jeho koeficient úměrnosti,

S'_n = plocha jeho píku,

a označí-li se vnitřní standard, chloroform nebo 2,4-dimethylheptan, jako „c“,

příčemž

m_c = jeho hmotnost ve směsi (v gramech),

S_c = plocha jeho píku,

M = hmotnost převedeného aerosolového prostředku (v gramech),
potom % (m/m) nitromethanu ve vzorku je

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

7. OPAKOVATELNOST⁽³⁾

Pro výrobky obsahující asi 0,3 % (m/m) nitromethanu nesmí rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení na stejném vzorku překročit absolutní hodnotu 0,03 %.

KVALITATIVNÍ A KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ KYSELINY THIOGLYKOLOVÉ (SULFANYLOCTOVÉ) V PROSTŘEDCÍCH K TRVALÉ ONDULACI, K ROVNÁNÍ VLASŮ A V PROSTŘEDCÍCH K DEPILACI

(Směrnice komise 83/514/EHS z 27. září 1983)

1. ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ

V této metodě je popsáno kvalitativní a kvantitativní stanovení kyseliny thioglykolové v prostředcích k trvalé ondulaci, k rovnání vlasů a v prostředcích k depilaci.

2. DEFINICE

Obsah thioglykolové kyseliny ve vzorku stanovený touto metodou se vyjádří ve hmotnostních procentech kyseliny thioglykolové.

3. PRINCIP

Kvalitativní stanovení kyseliny thioglykolové se provede buď barevnou reakcí, nebo pomocí chromatografie na tenké vrstvě, a kvantitativní stanovení se provede jodometricky nebo plynovou chromatografií.

4. KVALITATIVNÍ STANOVENÍ

4.1 **Kvalitativní stanovení barevnou reakcí**

4.1.1 *Reakční činidla*

Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a.

4.1.1.1 Papírek s octanem olovnatým

4.1.1.2 Roztok kyseliny chlorovodíkové (jeden objemový díl koncentrované kyseliny chlorovodíkové plus jeden objemový díl vody)

4.1.2 *Postup*

4.1.2.1 Kvalitativní stanovení kyseliny thioglykolové pomocí barevné reakce s papírkem s octanem olovnatým

Kapka vzorku se umístí na papírek s octanem olovnatým (4.1.1.1). Pokud se objeví intenzivní žluté zbarvení, je kyselina thioglykolová pravděpodobně přítomna.

Citlivost: 0,5 %.

³ Viz ČSN ISO 5725

4.1.2.2 Kvalitativní stanovení anorganických sulfidů vznikem sirovodíku po okyselení

Do zkumavky se převede několik miligramů analyzovaného vzorku. Přidají se 2 ml destilované vody a 1 ml kyseliny chlorovodíkové (4.1.1.2). Uvolní se sirovodík, který lze rozpoznat podle zápachu, a na papírku s octanem olovnatým (4.1.1.1) vzniká černá sraženina sulfidu olovnatého.

Citlivost: 50 ppm.

4.1.2.3 Kvalitativní stanovení siřičitanů vznikem oxidu siřičitého po okyselení

Postupuje se podle bodu 4.1.2.2. Obsah se přivede k varu. Oxid siřičitý lze rozpoznat podle jeho zápachu a jeho schopnosti redukovat například manganisté ionty .

4.2 **Kvalitativní stanovení chromatografií na tenké vrstvě**

4.2.1 *Reakční činidla*

Není-li uvedeno jinak, všechna reakční činidla musí být čistoty p.a.

- 4.2.1.1 Kyselina thioglykolová, minimální čistota 98 %, stanovena jodometricky
- 4.2.1.2 2,2'-dithiodi(octová kyselina), minimální čistota 99 %, stanovena jodometricky
- 4.2.1.3 Kyselina 2-merkaptopropionová (thiomléčná kyselina), minimální čistota 95 %, stanovena jodometricky
- 4.2.1.4 Kyselina 3-merkaptopropionová, minimální čistota 98 %, stanovena jodometricky
- 4.2.1.5 3-merkaptopropan-1,2-diol (1-thioglycerol), minimální čistota 98 %, stanovena jodometricky
- 4.2.1.6 Hotové silikagelové desky pro chromatografii na tenké vrstvě o tloušťce 0,25 mm
- 4.2.1.7 Hotové desky pro chromatografii na tenké vrstvě s oxidem hlinitým, Merck F 254 E nebo ekvivalentní
- 4.2.1.8 Kyselina chlorovodíková, koncentrovaná, ($d_4^{20} = 1,19$ g/ml)
- 4.2.1.9 Ethyl-acetát
- 4.2.1.10 Chloroform
- 4.2.1.11 Diisopropylether
- 4.2.1.12 Chlorid uhličitý
- 4.2.1.13 Ledová kyselina octová
- 4.2.1.14 Jodid draselný, 1% roztok (m/V) ve vodě
- 4.2.1.15 Chlorid platičitý, 0,1% roztok (m/V) ve vodě
- 4.2.1.16 Vytvájecí rozpouštědla
 - 4.2.1.16.1 Ethyl-acetát (4.2.1.9), chloroform (4.2.1.10), diisopropylether (4.2.1.11), kyselina octová (4.2.1.13) (20 : 20 : 10 : 10, V/V/V/V)
 - 4.2.1.16.2 Chloroform (4.2.1.10), kyselina octová (4.2.1.13) (90 : 20, V/V)
- 4.2.1.17 Detekční činidla
 - 4.2.1.17.1 Bezprostředně před použitím se smísí stejné objemy roztoku 4.2.1.14 a roztoku 4.2.1.15.
 - 4.2.1.17.2 Roztok bromu, 5 % (m/V):

Rozpustí se 5 g bromu ve 100 ml chloridu uhličitého (4.2.1.12).

4.2.1.17.3 Roztok fluoresceinu, 0,1 % (m/V):

100 mg fluoresceinu se rozpustí ve 100 ml ethanolu.

4.2.1.17.4 Heptamolybdenan hexaamonný, 10% roztok (m/V) ve vodě.

4.2.1.18 Referenční roztoky

4.2.1.18.1 Kyselina thiglykolová (4.2.1.1), 0,4% roztok (m/V) ve vodě.

4.2.1.18.2 2,2'-dithiodi(octová kyselina) (4.2.1.2), 0,4% roztok (m/V) ve vodě.

4.2.1.18.3 Kyselina 2-merkaptopropionová (4.2.1.3), 0,4% roztok (m/V) ve vodě.

4.2.1.18.4 Kyselina 3-merkaptopropionová (4.2.1.4), 0,4% roztok (m/V) ve vodě.

4.2.1.18.5 3-merkaptopropan-1,2-diol (4.2.1.5), 0,4% roztok (m/V) ve vodě.

4.2.2 *Přístroje a pomůcky*

Obvyklé vybavení pro chromatografii na tenké vrstvě

4.2.3 *Postup*

4.2.3.1 Příprava vzorků

Vzorek se okyselí několika kapkami kyseliny chlorovodíkové (4.2.1.8) na pH 1 a v případě potřeby zfiltruje.

V některých případech může být účelné vzorek zředit. V tomto případě se okyselení kyselinou chlorovodíkovou provede před zředěním.

4.2.3.2 Vyvíjení

Na desku se nanese 1 μ l roztoku vzorku (4.2.3.1) a 1 μ l každého z pěti referenčních roztoků (4.2.1.18). Pečlivě se vysuší v mírném proudu dusíku a deska se vyvíjí rozpouštědly (4.2.1.16.1 nebo 4.2.1.16.2). Deska se usuší co nejrychleji pod dusíkem, aby nedošlo k oxidaci thiolů.

4.2.3.3 Detekce

Deska se postříká jedním ze tří činidel (4.2.1.17.1, 4.2.1.17.3 nebo 4.2.1.17.4). Pokud se deska postříká činidlem (4.2.1.17.3), vystaví se poté parám bromu (např. v nádobě obsahující malou kádinku činidla (4.2.1.17.2)), dokud se skvrny nezviditelní. Detekce postříkem činidlem (4.2.1.17.4) bude úspěšná jen tehdy, nepřekročí-li doba sušení desky 30 minut.

4.2.3.4 Interpretace

Hodnoty R_f a barvy referenčních roztoků se porovnají s roztoky vzorků. Průměrné hodnoty R_f uváděné dále jako hrubé vodítko slouží pouze pro srovnání. Závisí na:

- úrovní aktivace tenké vrstvy v době vyvíjení chromatogramu,
- teplotě ve vyvíjecí komoře.

Příklady hodnot R_f získaných na silikagelové vrstvě

	Vyvíjecí rozpouštědla	
	4.2.1.16.1	4.2.1.16.2
Kyselina thioglykolová	0,25	0,80
Kyselina 2-merkaptopropionová	0,40	0,95
2,2'-dithiodi(octová kyselina)	0,00	0,35
Kyselina 3-merkaptopropionová	0,45	0,95
3-merkaptopropan-1,2-diol	0,45	0,35

5. KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ ⁽⁴⁾

Stanovení musí vždy začínat jodometrií.

5.1 Jodometrie

5.1.1 Princip

Stanovení se provádí oxidací skupiny „-SH“ jodem v kyselém prostředí podle rovnice:



5.1.2 Reakční činidla

Jod, 0,05M odměrný roztok

5.1.3 Přístroje a pomůcky

Obvyklé laboratorní vybavení

5.1.4 Postup

Do Erlenmeyerovy baňky na 150 ml s uzávěrem, obsahující 50 ml destilované vody, se přesně naváží 0,5 až 1 g vzorku. Přidá se 5 ml kyseliny chlorovodíkové (4.1.1.2) (pH roztoku blíží se k 0) a titruje se roztokem jodu (5.1.2), dokud se neobjeví žluté zabarvení. Lze použít také indikátor (např. roztok škrobu nebo chlorid uhličitý).

5.1.5 Výpočet

Obsah kyseliny thioglykolové se vypočte podle vzorce:

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

kde:

m = hmotnost zkušební vzorku (v gramech),

n = objem spotřebovaného roztoku jodu (5.1.2).

5.1.6 Poznámky

Je-li vypočtený výsledek pro kyselinu thioglykolovou nejméně o 0,1 % nižší než nejvyšší povolená koncentrace, není další stanovení nutné. Jestliže se výsledek rovná nebo je vyšší než povolená maximální koncentrace a kvalitativní stanovení odhalilo

⁴ *Poznámka:* Stanovení kyseliny thioglykolové se provádí s dosud nepoužitým výrobkem z čerstvě otevřeného obalu, aby se zamezilo oxidaci.

přítomnost několika redukčních činidel, je nezbytné provést stanovení plynovou chromatografií.

5.2 **Plynová chromatografie**

5.2.1 *Princip*

Kyselina thioglykolová se oddělí od pomocných látek vysrážením roztokem octanu kademnatého. Po methylaci diazomethanem, který se buď připraví *in situ* nebo předem jako roztok v diethyletheru, se methylderivát kyseliny thioglykolové stanoví chromatografií plyn/kapalina s methyl-oktanoátem jako vnitřním standardem.

5.2.2 *Reakční činidla*

Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a.

5.2.2.1 Kyselina thioglykolová, 98 %

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

5.2.2.3 Methanol

5.2.2.4 Octan kademnatý, dihydrát, 10% roztok (m/V) ve vodě

5.2.2.5 Methyl-oktanoát, 2% roztok (m/V) v methanolu

5.2.2.6 Acetátový pufrací roztok (pH 5):

Octan sodný, trihydrát, 77 g.

Kyselina octová (ledová), 27,5 g.

Demineralizovaná voda do konečného objemu jeden litr.

5.2.2.7 Kyselina chlorovodíková, čerstvě připravený 3M roztok v methanolu (5.2.2.3)

5.2.2.8 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidin

5.2.2.9 Hydroxid sodný, 5M roztok

5.2.2.10 Jod, 0,05M odměrný roztok

5.2.2.11 Diethylether

5.2.2.12 Roztok diazomethanu připravený z *N*-methyl-*N*-nitrosotoluen-4-sulfonamidu (Fieser, Reagents for Organic Synthesis (Wiley), 1967)

Získaný roztok obsahuje asi 1,5 g diazomethanu ve 100 ml diethyletheru. Protože diazomethan je toxický a velmi nestabilní plyn, je třeba všechny operace provádět v dobře táhnoucí digestoři, a je třeba se vyvarovat použití zábrusové aparatury (pro tento účel jsou k dispozici speciální soupravy).

5.2.3 *Přístroje a pomůcky*

5.2.3.1 Obvyklé laboratorní vybavení

5.2.3.2 Aparatura pro přípravu diazomethanu pro methylaci *in situ* (viz Fales, H.M., Jaouni, T.M. a Babashak, J.F., Analyt. Chem. 1973, 45, 2302)

5.2.3.3 Přístroj pro přípravu diazomethanu předem (podle Fiesera)

5.2.4 *Příprava vzorku*

Do centrifugační kyvety na 50 ml se přesně naváží dostatek vzorku, aby obsahoval předpokládané množství 50 až 70 mg kyseliny thioglykolové. Okyselí se několika kapkami kyseliny chlorovodíkové (5.2.2.2), aby se dosáhlo pH asi 3.

Přidá se 5 ml demineralizované vody a 10 ml acetátového pufrčního roztoku (5.2.2.6).

Pomocí pH papírku se ověří, zda je hodnota pH asi 5. Poté se přidá 5 ml roztoku octanu kademnatého (5.2.2.4).

Vyčká se 10 minut a poté se odstředí nejméně 15 minut při 4000 g. Odstraní se supernatant, který může obsahovat nerozpustný tuk (v případě krémových prostředků). Tento tuk nelze zaměňovat s thioly, které se hromadí jako kompaktní hmota na dně nádoby. Ověří se, že se po přidání několika kapek roztoku octanu kademnatého (5.2.2.4) k supernatantu netvoří sraženina.

Jestliže předchozí kvalitativní stanovení neodhalilo přítomnost jiných redukčních činidel než thiolů, ověří se jodometricky, že množství thiolu přítomného v supernatantu nepřekračuje 6 až 8 % původního množství.

Do centrifugační zkumavky obsahující sraženinu se přidá 10 ml methanolu (5.2.2.3) a sraženina se jemně rozptýlí tyčinkou. Znovu se odstředí nejméně 15 minut při 4000 g. Supernatant se slije a ověří se, že neobsahuje thioly.

Sraženina se ještě jednou stejným postupem promyje.

Do téže centrifugační kyvety se přidá

- 2 ml roztoku methyl-oktanoátu (5.2.2.5),
- 5 ml kyseliny chlorovodíkové v methanolu (5.2.2.7).

Thioly se úplně rozpustí (může zbývat malé množství nerozpustného zbytku pomocných látek). Toto je roztok „S“.

Na alikvotním podílu tohoto roztoku se jodometricky ověří, že obsah thiolů činí alespoň 90 % hodnoty získané v bodě 5.1.

5.2.5 *Methylace*

Methylace se provádí buď pomocí přípravy *in situ* (5.2.5.1), nebo předem připraveným roztokem diazomethanu (5.2.5.2).

5.2.5.1 *Methylace in situ*

Do methylační aparatury (5.2.3.2) obsahující 1 ml etheru (5.2.2.11) se převede 50 µl roztoku „S“ a methyluje se postupem (5.2.3.2) s asi 300 mg 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidinu (5.2.2.8). Po 15 minutách (etherický roztok by měl být žlutý, což indikuje nadbytek diazomethanu) se roztok vzorku převede do nádoby na 2 ml opatřené vzduchotěsnou zátkou. Ponechá se v ledničce přes noc. Methylují se dva vzorky současně.

5.2.5.2 *Methylace předem připraveným roztokem diazomethanu*

Do nádoby na 5 ml opatřené zátkou se převede 1 ml roztoku diazomethanu (5.2.2.12) a poté 50 µl roztoku „S“. Ponechá se v ledničce přes noc.

5.2.6 *Příprava standardu*

Připraví se standardní roztok kyseliny thioglykolové (5.2.2.1) o známé koncentraci, obsahující asi 60 mg čisté kyseliny thioglykolové (5.2.2.1) ve 2 ml.

Toto je roztok „E“.

Vysrážení, zkouška a methylace se provedou tak, jak je popsáno v bodech 5.2.4 a 5.2.5.

5.2.7 Podmínky pro plynovou chromatografii

5.2.7.1 Kolona

Typ: nerezová ocel.

Délka: 2 m.

Průměr: 3 mm.

5.2.7.2 Náplň

20 % didecylftalát/Chromosorb WAW, 80 až 100 mesh.

5.2.7.3 Detektor

Plamenový ionizační. Vhodné nastavení citlivosti elektrometru plamenového ionizačního detektoru je 8×10^{-10} A.

5.2.7.4 Plyny

Nosný plyn: dusík.

tlak: 2,2 bar,

průtok: 35 ml/min.

Pomocný plyn: vodík.

tlak: 1,8 bar,

průtok: 15 ml/min.

Plyny pro detektor: podle specifikace výrobce přístroje.

5.2.7.5 Teplotní podmínky

Nástřík: 200 °C

Detektor: 200 °C

Kolona: 90 °C.

5.2.7.6 Rychlost posuvu papíru v zapisovači

5 mm/min.

5.2.7.7 Nastříkované množství

3 μ l. Provede se pět nástříků.

5.2.7.8 Chromatografické podmínky jsou uvedeny pouze jako vodítka. Umožní dosáhnout rozlišení „R“ rovné nebo lepší než 1,5, kde:

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

kde

r_1 a r_2 = retenční časy dvou píků (v minutách),

W_1 a W_2 = šířka píků v polovině výšky píků (v milimetrech),

d' = rychlost posuvu papíru (v milimetrech za minutu).

Doporučuje se zvyšovat na závěr chromatografického měření teplotu z 90 °C na 150 °C rychlostí 10 °C za minutu, aby se vyloučily látky, které by mohly rušit následující měření.

5.2.8 Výpočty

5.2.8.1 Koeficient úměrnosti pro kyselinu thioglykolovou

Počítá se vzhledem k methyloktanoátu na základě standardní směsi.

Označí-li se kyselina thioglykolová jako „t“,

příčemž

$k_t =$ její koeficient úměrnosti,

$m'_t =$ její hmotnost ve směsi (v miligramech),

$S'_t =$ plocha jejího píku,

a označí-li se methyloktanoát jako „c“,

příčemž

$m'_c =$ jeho hmotnost ve směsi (v miligramech),

$S'_c =$ plocha jeho píku,

potom

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

Tento koeficient se liší podle použitého přístroje.

5.2.8.2 Koncentrace kyseliny thioglykolové přítomné ve vzorku

Označí-li se kyselina thioglykolová jako „t“,

příčemž

$k_t =$ její koeficient úměrnosti,

$S_t =$ plocha jejího píku,

a označí-li se methyloktanoát jako „c“,

příčemž

$m_c =$ jeho hmotnost ve směsi (v miligramech),

$S_c =$ plocha jeho píku,

$M =$ hmotnost původního zkušební vzorku (v miligramech),

potom % (m/m) kyseliny thioglykolové přítomné ve vzorku je:

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

8. OPAKOVATELNOST⁽³⁾

Pro výrobky obsahující asi 8 % (m/m) kyseliny thioglykolové nesmí rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení na stejném vzorku překročit absolutní hodnotu 0,8 %.

³ Viz ČSN ISO 5725

KVALITATIVNÍ A KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ HEXACHLOROFENU (INN)

(Směrnice komise 83/514/EHS ze 27. září 1983)

A. KVALITATIVNÍ STANOVENÍ

1. ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ
Tato metoda je vhodná pro všechny kosmetické prostředky.
2. PRINCIP
Hexachlorofen ve vzorku se extrahuje ethylacetátem a kvalitativně se stanoví chromatografií na tenké vrstvě.
3. REAKČNÍ ČINIDLA
Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a.
 - 3.1 Kyselina sírová, 4M
 - 3.2 Celit AW
 - 3.3 Ethylacetát
 - 3.4 Vyuvíjecí rozpouštědlo: Benzen obsahující 1 % (V/V) ledové kyseliny octové.
 - 3.5 Detekční činidlo I:
Roztok rhodaminu B: Rozpustí se 100 mg rhodaminu B ve směsi 150 ml diethyletheru, 70 ml absolutního ethanolu a 16 ml vody.
 - 3.6 Detekční činidlo II:
Roztok 2,6-dibrom-4-(chlorimino)cyklohexa-2,5-dienonu:
400 mg 2,6-dibrom-4-(chlorimino)cyklohexa-2,5-dienonu se rozpustí ve 100 ml methanolu (připravuje se čerstvý každý den).
Roztok uhličitanu sodného: 10 g uhličitanu sodného se rozpustí ve 100 ml demineralizované vody.
 - 3.7 Referenční roztok:
Hexachlorofen, 0,05% roztok (m/V) v ethylacetátu
4. PŘÍSTROJE A POMŮCKY
 - 4.1 TLC desky Kieselgel 254, 200 × 200 mm (nebo ekvivalentní)
 - 4.2 Obvyklé vybavení pro TLC
 - 4.3 Lázeň pro temperaci chromatografické komory udržovaná na teplotě 26 °C
5. PŘÍPRAVA ZKUŠEBNÍHO VZORKU
 - 5.1 1 g homogenizovaného vzorku se důkladně promíchá s 1 g Celitu AW (3.2) a 1 ml kyseliny sírové (3.1).
 - 5.2 Suší se dvě hodiny při 100 °C.
 - 5.3 Nechá se vychladnout a vysušený zbytek se rozdrtí na jemný prášek.
 - 5.4 Dvakrát se extrahuje vždy 10 ml ethylacetátu (3.3), po každé extrakci se odstředí a ethylacetátové vrstvy se sloučí.
 - 5.5 Odpaří se při 60 °C.
 - 5.6 Odparek se rozpustí ve 2 ml ethylacetátu (3.3).

6. POSTUP
- 6.1 2 μ l roztoku zkušebního vzorku (5.6) a 2 μ l referenčního roztoku (3.7) se nanese na desku pro chromatografii na tenké vrstvě (4.1).
- 6.2 Komora (4.3) se nasýtí vyvíjecím rozpouštědlem (3.4).
- 6.3 Deska pro chromatografii na tenké vrstvě se vloží do komory a vyvíjí se do vzdálenosti čela 150 mm.
- 6.4 Deska pro chromatografii na tenké vrstvě deska se vyjme z komory a suší se v sušárně s nuceným oběhem vzduchu při teplotě asi 105 °C.
- 6.5 *Detekce*

Skvrny hexachlorofenu na desce pro chromatografii na tenké vrstvě se detekují způsobem popsáním v bodě 6.5.1 nebo 6.5.2.
- 6.5.1 Deska se rovnoměrně postříká detekčním činidlem I (3.5). Po 30 minutách se deska pozoruje v UV světle při 254 nm.
- 6.5.2 Deska se rovnoměrně postříká roztokem 2,6-dibrom-4-(chlorimino)cyklohexa-2,5-dienonu detekčního činidla II (3.6). Následně se deska postříká roztokem uhličitanu sodného (3.6). Deska se po 10 minutách sušení při pokojové teplotě pozoruje v denním světle.
7. INTERPRETACE
- 7.1 Detekční činidlo I (3.5):

Hexachlorofen se detekuje jako namodralá skvrna na žluto-oranžovém fluoreskujícím pozadí a má R_f přibližně 0,5.
- 7.2 Detekční činidlo II (3.6):

Hexachlorofen se detekuje jako blankytně modrá až tyrkysově zbarvená skvrna na bílém pozadí a má R_f přibližně 0,5.

B. KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ

1. ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ

Tato metoda se hodí pro všechny kosmetické prostředky.
2. DEFINICE

Obsah hexachlorofenu ve vzorku stanovený touto metodou se vyjádří v hmotnostních procentech hexachlorofenu.
3. PRINCIP

Hexachlorofen se stanovuje po přeměně na methylderivát plynovou chromatografií s detektorem elektronového záchyty.
4. REAKČNÍ ČINIDLA

Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a.
- 4.1 Ethylacetát
- 4.2 *N*-methyl-*N*-nitroso-*p*-toluensulfonamid (diazald)
- 4.3 Diethylether
- 4.4 Methanol
- 4.5 2-(2-ethoxyethoxy)ethanol (karbitol)

- 4.6 Kyselina mravenčí
- 4.7 Hydroxid draselný, 50% vodný roztok (m/m) (připravuje se čerstvý každý den)
- 4.8 Hexan pro spektroskopii
- 4.9 Bromchlorofen (standard č. 1)
- 4.10 4,4',6,6'-tetrachlor-2,2'-thiodifenol (standard č. 2)
- 4.11 2,4,4'-trichlor-2-hydroxydifenylether (standard č. 3)
- 4.12 Aceton
- 4.13 Kyselina sírová, 4M
- 4.14 Celit AW
- 4.15 Kyselina mravenčí v ethylacetátu, 10% roztok (V/V)
- 4.16 Hexachlorofen
- 5. PŘÍSTROJE A POMŮCKY
- 5.1 Obvyklé laboratorní sklo
- 5.2 Miniaparatura pro přípravu diazomethanu (Analyt. Chem. 1973, 45, 2302-2)
- 5.3 Plynový chromatograf vybavený detektorem elektronového záchytu se zdrojem ⁶³Ni
- 6. POSTUP
- 6.1 *Příprava standardního roztoku*
Standard se zvolí tak, aby neinterferoval se žádnou látkou obsaženou v analyzovaném výrobku jako pomocná látka. Obvykle je nejvhodnější standard č. 1 (4.9).
- 6.1.1 Do odměrné baňky na 100 ml se přesně naváží asi 50 mg standardu č. 1, 2 nebo 3 (4.9, 4.10 nebo 4.11) a 50 mg hexachlorofenu (4.16). Doplní se na objem ethylacetátem (4.1) (roztok A). 10 ml roztoku A se zředí ethylacetátem (4.1) na 100 ml (roztok B).
- 6.1.2 Do odměrné baňky na 100 ml se přesně naváží asi 50 mg standardu č. 1, 2 nebo 3 (4.9, 4.10 nebo 4.11). Doplní se na objem ethylacetátem (4.1) (roztok C).
- 6.2 *Příprava vzorku⁽⁵⁾*
Přesně se naváží 1 g homogenizovaného vzorku a důkladně se promíchá s 1 ml kyseliny sírové (4.13), 15 ml acetonu (4.12) a 8 g Celitu AW (4.14). Směs se 30 minut suší vzduchem na vodní lázni, poté se jeden a půl hodiny suší v sušárně s nuceným oběhem vzduchu. Nechá se vychladnout, zbytek se rozdrtí na jemný prášek a převede do skleněné kolony. Eluuje se ethylacetátem (4.1) a jímá se 100 ml. Přidají se 2 ml roztoku vnitřního standardu (roztok C) (6.1.2).
- 6.3 *Methylace vzorku*
Všechna reakční činidla a aparatura se dvě hodiny chladí na teplotu 0 až 4 °C. Do vnějšího zásobníku diazomethanové aparatury se převede 1,2 ml roztoku připraveného podle bodu 6.2 a 0,1 ml methanolu (4.4). Do středního zásobníku se převede asi 200 mg diazalu (4.2), přidá se 1 ml karbitolu (4.5) a 1 ml diethyletheru (4.3) a nechá se rozpustit. Aparatura se sestaví, z poloviny se ponoří do lázně o teplotě 0 °C a do středního zásobníku se injekční stříkačkou zavede asi 1 ml

⁵ Vzhledem k tomu, že hexachlorofen je obsažen v celé řadě typů výrobků, je důležité před definitivním zaznamenáním výsledků stanovit výtěžek hexachlorofenu při stanovení v dotyčném vzorku tímto postupem. Jsou-li výtěžky nízké, mohou být se souhlasem zúčastněných stran provedeny změny, například změna rozpouštědla (benzen místo ethylacetátu) apod.

vychlazeného roztoku hydroxidu draselného (4.7). Je třeba se přesvědčit, že žluté zbarvení způsobené vzniklým diazomethanem přetrvává. Pokud žluté zbarvení nepřetrvává, methylace se opakuje s dalšími 200 mg diazaldu (4.2)⁶.

Aparatura se po 15 minutách vyjme z lázně a ponechá se uzavřená při pokojové teplotě 12 hodin. Aparatura se otevře, přebytek diazomethanu se odstraní přidávkem několika kapek 10% (V/V) roztoku kyseliny mravenčí v ethylacetátu (4.15), organický roztok se převede do odměrné baňky na 25 ml. Doplní se na objem hexanem (4.8).

1,5 µl tohoto roztoku se nastříkne do chromatografu.

6.4 *Methylace standardu*

Všechna reakční činidla a aparatura se dvě hodiny chladí na teplotu 0 až 4 °C. Do vnějšího zásobníku diazomethanové aparatury se umístí:

0,2 ml roztoku B (6.1.1),

1 ml ethylacetátu (4.1),

0,1 ml methanolu (4.4).

V methylaci se pokračuje tak, jak je popsáno v bodě 6.3. 1,5 µl výsledného roztoku se nastříkne do chromatografu.

7. PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIE

Kolona musí zaručit rozlišení „R“ rovné nebo lepší než 1,5, kde:

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

kde

r_1 a r_2 = retenční časy dvou píků (v minutách),

W_1 a W_2 = šířky píků v polovině výšky píků (v milimetrech),

d' = rychlost posuvu papíru (v milimetrech za minutu).

Jako vhodné se ukázaly následující chromatografické podmínky:

Kolona: nerezová ocel.

Délka: 1,7 m.

Průměr: 3 mm.

Nosič:

Chromosorb WAW

zrnitost: 80 až 100 mesh.

Stacionární fáze: 10% OV 17.

Teploty:

kolona: 280 °C,

nástřík: 280 °C,

detektor: 280 °C.

⁶ Přetrvávání tohoto žlutého zbarvení je známkou přebytku diazomethanu, který je nezbytný pro zajištění úplné methylace vzorku.

Nosný plyn: dusík zbavený kyslíku.

Tlak: 2,3 bar.

Průtok: 30 ml/min.

8. VÝPOČET

8.1 *Koeficient úměrnosti hexachlorofenu*

Bude odpovídat zvolenému standardu a jeho poměru ve standardní směsi.

Označí-li se

h = hexachlorofen,

k_h = jeho koeficient úměrnosti,

m'_h = jeho hmotnost ve směsi (v gramech),

A'_h = plocha jeho píku,

s = vybraný standard,

m'_s = jeho hmotnost ve směsi (v gramech),

A'_s = plocha jeho píku,

potom:

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

8.2 *Množství hexachlorofenu ve vzorku*

Označí-li se

h = hexachlorofen,

k_h = jeho koeficient úměrnosti,

A_h = plocha jeho píku,

s = vybraný standard,

m_s = jeho hmotnost ve směsi (v gramech),

A_s = plocha jeho píku,

M = hmotnost odebraného vzorku (v gramech),

potom % (m/m) hexachlorofenu ve vzorku je

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

8. OPAKOVATELNOST⁽³⁾

Pro výrobky obsahující asi 0,1 % (m/m) hexachlorofenu nesmí rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení na stejném vzorku překročit absolutní hodnotu 0,005 %.

³ Viz ČSN ISO 5725

KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ TOSYLCHLORAMIDU SODNÉHO (CHLORAMINU-T)(INN)

(Směrnice komise 83/514/EHS z 27. září 1983)

1. ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ

V této metodě je popsáno kvantitativní stanovení tosylchloramidu sodného (chloraminu-T) v kosmetických prostředcích chromatografií na tenké vrstvě.

2. DEFINICE

Obsah chloraminu-T ve vzorku stanovený touto metodou se vyjádří v hmotnostních procentech (m/m).

3. PRINCIP

Chloramin-T se kvantitativně hydrolyzuje na 4-toluensulfonamid varem s kyselinou chlorovodíkovou.

Množství vzniklého 4-toluensulfonamidu se po chromatografii na tenké vrstvě stanoví fotodenzitometricky.

4. REAKČNÍ ČINIDLA

Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a.

4.1 Tosylchloramid sodný (chloramin-T)

4.2 Standardní roztok 4-toluensulfonamidu: 50 mg 4-toluensulfonamidu ve 100 ml ethanolu (4.5)

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

4.4 Diethylether

4.5 Ethanol, 96% (V/V)

4.6 *Vyvíjecí rozpouštědlo*

4.6.1 Butan-1-ol/ethanol (4.5)/voda (40:4:9, V/V/V), nebo

4.6.2 Chloroform/aceton (6:4, V/V)

4.7 Hotové desky pro chromatografii na tenké vrstvě, silikagel 60, bez fluorescenčního indikátoru

4.8 Manganistan draselný

4.9 Kyselina chlorovodíková, 15% (m/m)

4.10 Vyvolávací činidlo: 2-toluidin, 1% roztok (m/V) v ethanolu (4.5)

5. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

5.1 Obvyklé laboratorní vybavení

5.2 Obvyklé vybavení pro chromatografii na tenké vrstvě

5.3 Fotodenzitometr

6. POSTUP

6.1 *Hydrolyza*

Do baňky na 50 ml s kulatým dnem se přesně naváží asi 1 g vzorku (m). Přidá se 5 ml vody a 5 ml kyseliny chlorovodíkové (4.3) a vaří se jednu hodinu pod zpětným chladičem. Horká suspenze se okamžitě převede vodou do odměrné baňky na 50 ml.

Nechá se vychladnout a doplní po rysku vodou. Odstředuje se pět minut alespoň při 3000 ot./min a supernatant se zfiltruje.

6.2 *Extrakce*

6.2.1 Odebere se 30 ml filtrátu a extrahuje se třikrát 15 ml diethyletheru (4.4). V případě potřeby se etherové fáze vysuší a shromáždí v 50 ml odměrné baňce. Doplní se na objem diethyletherem (4.4).

6.2.2 Odebere se 25 ml vysušeného etherického extraktu a odpaří se do sucha v proudu dusíku. Odparek se rozpustí v 1 ml ethanolu (4.5).

6.3 *Chromatografie na tenké vrstvě*

6.3.1 20 µl ethanolického roztoku odparku (6.2.2) se nanese na desku pro chromatografii na tenké vrstvě (4.7).

Současně a stejným způsobem se nanese 8, 12, 16 a 20 µl standardních roztoků 4-toluensulfonamidu (4.2).

6.3.2 Nechá se vyvíjet ve vyvíjecím rozpouštědle (4.6.1 nebo 4.6.2) až čelo dosáhne vzdálenosti asi 150 mm.

6.3.3 Po úplném odpaření vyvíjecího rozpouštědla se deska umístí na dvě až tři minuty do atmosféry par chloru, vzniklých nalitím asi 100 ml kyseliny chlorovodíkové (4.9) na asi 2 g manganistanu draselného (4.8) v uzavřené nádobě. Přebytek chloru se odstraní zahřátím desky na 100 °C po dobu pěti minut. Poté se deska postříká detekčním činidlem (4.10).

6.4 *Měření*

Přibližně po jedné hodině se fialové skvrny proměří fotodenzitometrem při 525 nm.

6.5 *Vynesení kalibračních křivek*

Hodnoty maximálních výšek píků stanovených pro čtyři skvrny 4-toluensulfonamidu se vynesou proti odpovídajícím množství 4-toluensulfonamidu (tj. 4, 6, 8 a 10 µg 4-toluensulfonamidu na skvrnu).

7. POZNÁMKA

Metodu je možno ověřit pomocí 0,1 nebo 0,2% roztoku (m/V) chloraminu-T (4.1), který se podrobí stejnému postupu jako vzorek (6).

8. VÝPOČET

Obsah chloraminu-T ve vzorku vyjádřený v hmotnostních procentech se vypočte takto

$$\% \text{ (m/m) tosylchloramid sodný} = \frac{1,33 \times a}{60 \times m}$$

kde

1,33 = přepočítávací faktor 4-toluensulfonamid/Chloramin-T,

a = množství 4-toluensulfonamidu ve vzorku, odečtené z kalibračních křivek (v µg),

m = hmotnost odebraného vzorku (v gramech).

8. OPAKOVATELNOST⁽³⁾

Pro výrobky obsahující asi 0,2 % (m/m) chloraminu-T nesmí rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení na stejném vzorku překročit absolutní hodnotu 0,03 %.

KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ CELKOVÉHO FLUORU V ZUBNÍCH PASTÁCH

(Směrnice komise 83/514/EHS z 27. září 1983)

1. ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ

Tato metoda je určena ke kvantitativnímu stanovení celkového fluoru v zubních pastách. Je vhodná pro obsah nepřesahující 0,25 %.

2. DEFINICE

Obsah fluoru ve vzorku stanovený touto metodou se vyjádří v hmotnostních procentech.

3. PRINCIP

Stanovení se provádí plynovou chromatografií. Fluor se ze sloučenin obsahujících fluor převede na triethylfluorsilan (TEFS) přímou reakcí s chlortriethylsilanem (TECS) v kyselém prostředí a současně se extrahuje xylenem obsahujícím cyklohexan jako vnitřní standard.

4. REAKČNÍ ČINIDLA

Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a.

4.1 Fluorid sodný, sušený při 120 °C do konstantní hmotnosti

4.2 Voda, dvakrát destilovaná nebo ekvivalentní kvality

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

4.4 Cyklohexan (C₆H₁₂)

4.5 Xylen nevykazující na chromatogramu při chromatografii za stejných podmínek jako vzorek (6.1) žádné píky před píkem rozpouštědla. V případě potřeby se čistí destilací (5.8).

4.6 Chlortriethylsilan (TECS Merck nebo ekvivalentní)

4.7 *Standardní roztoky fluoru*

4.7.1 Zásobní roztok, 0,250 mg F⁻/ml. Naváží se přesně 138,1 mg fluoridu sodného (4.1) a rozpustí se ve vodě (4.2). Roztok se kvantitativně převede do odměrné baňky na 250 ml (5.5). Zředí se po rysku vodou (4.2) a promíchá.

4.7.2 Zředěný zásobní roztok, 0,050 mg F⁻/ml. Do odměrné baňky na 100 ml (5.5) se pipetou převede 20 ml zásobního roztoku (4.7.1). Zředí se po rysku vodou a promíchá.

³ Viz ČSN ISO 5725

- 4.8 *Roztok vnitřního standardu*
Smíchá se 1 ml cyklohexanu (4.4) a 5 ml xylenu (4.5).
- 4.9 *Roztok chlortriethylsilan/vnitřní standard*
Do odměrné baňky na 10 ml se pipetou (5.7) převede 0,6 ml TECS (4.6) a 0,12 ml roztoku vnitřního standardu (4.8). Zředí se xylenem po rysku a promíchá. Přípravuje se čerstvý každý den.
- 4.10 Kyselina chloristá, 70% (m/V)
- 4.11 Kyselina chloristá, 20% (m/V) ve vodě (4.2)
5. PŘÍSTROJE A POMŮCKY
- 5.1 Obvyklé laboratorní vybavení
- 5.2 Plynový chromatograf vybavený plamenovým ionizačním detektorem
- 5.3 Míchačka Vortex nebo ekvivalentní
- 5.4 Třepačka Bühler, typ SMB₁ nebo ekvivalentní
- 5.5 Odměrné baňky na 100 a 250 ml z polypropylenu
- 5.6 Centrifugační kyvety (skleněné) na 20 ml se šroubovacími uzávěry potaženými teflonem, Sovirel typ 611-56 nebo ekvivalentní. Kyvety a uzávěry se čistí louhováním v kyselině chloristé (4.11) několik hodin, poté se pětkrát vypláchnou vodou (4.2) a nakonec se suší při 100 °C.
- 5.7 Pipety s nastavitelným objemem na 50 až 200 µl, se špičkami z plastu na jedno použití.
- 5.8 Destilační přístroj s třídílnou Schneiderovou kolonou nebo ekvivalentní kolonou Vigreux.
6. POSTUP
- 6.1 *Analýza vzorku*
- 6.1.1 Vybere se dosud neotevřená tuba se zubní pastou, rozřízne se a veškerý obsah se vyjme. Převede se do nádoby z plastu, důkladně se promíchá a uchovává se za podmínek, při nichž nedojde ke znehodnocení vzorku.
- 6.1.2 Do centrifugační zkumavky (5.6) se naváží přesně 150 mg vzorku (m), přidá se 5 ml vody (4.2) a zhomogenizuje se (5.3).
- 6.1.3 Přidá se 1 ml xylenu (4.5).
- 6.1.4 Po kapkách se přidá 5 ml kyseliny chlorovodíkové (4.3) a zhomogenizuje se (5.3).
- 6.1.5 Do centrifugační kyvety (5.6) se pipetou přidá 0,5 ml roztoku chlortriethylsilan/vnitřní standard (4.9).
- 6.1.6 Kyveta se uzavře šroubovacím uzávěrem (5.6) a důkladně se třepe 45 minut na třepačce (5.4) nastavené na 150 kmitů za minutu.
- 6.1.7 Odstředí se 10 minut při takové rychlosti, aby došlo ke zřetelné separaci fází, kyveta se otevře, organická vrstva se oddělí a 3 µl organické fáze se nastříknou do kolony plynového chromatografu (5.2).
- Poznámka:*
Eluce všech složek trvá asi 20 minut.
- 6.1.8 Nástřík se opakuje, vypočte se průměrný poměr ploch píků (A_{TEFS}/A_{CH}), a odpovídající obsah fluoru (v miligramech (m_1)) se odečte z kalibrační křivky (6.3).

6.1.9 Celkový obsah fluoru ve vzorku (v hmotnostních procentech fluoru) se vypočte způsobem popsaným v bodě 7.

6.2 **Chromatografické podmínky**

6.2.1 Kolona: nerezová ocel.

Délka: 1,8 m.

Průměr: 3 mm.

Nosič: Gaschrom Q, 80 až 100 mesh.

Stacionární fáze: silikonový olej DC 200 nebo ekvivalentní, 20 %. Kolona se kondicionuje přes noc při 100 °C (při průtoku nosného plynu 25 ml dusíku za minutu), což se opakuje každou noc. Po každém čtvrtém nebo pátém nástřiku se kolona znovu kondicionuje zahřátím na 100 °C na dobu 30 minut.

Teplotní režim:

kolona: 70 °C,

nástřík: 150 °C,

detektor: 250 °C.

Průtok nosného plynu: 35 ml dusíku za minutu.

6.3 **Kalibrační křivka**

6.3.1 Do řady šesti centrifugačních kyvet (5.6) se pipetou odměří 0, 1, 2, 3, 4 a 5 ml zředěného standardního roztoku fluoridu (4.7.2). Každá zkumavka se doplní vodou (4.2) na objem 5 ml.

6.3.2 Pokračuje se tak, jak je popsáno v bodech 6.1.3 až 6.1.6 včetně.

6.3.3 Do kolony plynového chromatografu (5.2) se nastříknou 3 µl organické fáze.

6.3.4 Nástřík se opakuje a vypočítá se průměrný poměr ploch píků (A_{TEFS}/A_{CH}).

6.3.5 Vynese se kalibrační křivka závislosti hmotnosti fluoru (v miligramech) ve standardních roztocích (6.3.1) a poměr ploch píku (A_{TEFS}/A_{CH}) změřených podle bodu 6.3.4. Pomocí regresní analýzy se provede nejlepší proložení bodů křivky přímkou.

7. VÝPOČET

Koncentrace celkového fluoru ve vzorku (v hmotnostních procentech fluoru) (% (m/m) F) je dána vztahem

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

kde

m = zkušební vzorek (6.1.2) (v miligramech),

m_1 = množství F (v miligramech) odečtené z kalibrační křivky (6.1.8).

8. OPAKOVATELNOST⁽³⁾

Pro výrobky obsahující asi 0,15 % (m/m) fluoru nesmí rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení na stejném vzorku překročit absolutní hodnotu 0,012 %.

³ Viz ČSN ISO 5725

KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ ORGANICKÝCH SLOUČENIN RTUTI

(Směrnice komise 83/514/EHS z 27. září 1983)

ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ

Dále popsanou metodu lze použít pro kvalitativní a kvantitativní stanovení organických derivátů rtuti používaných jako konzervační přísady v kosmetických prostředcích k líčení a odličování očí. Metodu lze použít pro thiomersal (INN), merthiolát a fenylrtuťnaté soli.

A. KVALITATIVNÍ STANOVENÍ

1. PRINCIP

Organické sloučeniny rtuti se převedou na komplex s 1,5-difenyl-3-thiokarbazonem. Po extrakci dithizonátu chloridem uhličitým se provede chromatografie na tenké vrstvě na silikagelu. Dithizonáty se na chromatogramu projeví jako oranžově zbarvené skvrny.

2. REAKČNÍ ČINIDLA

Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a.

2.1 Kyselina sírová, 25% (V/V)

2.2 1,5-difenyl-3-thiokarbazon (dithizon): 0,8 mg ve 100 ml chloridu uhličitého (2.4)

2.3 Dusík

2.4 Chlorid uhličitý

2.5 Vyvíjecí rozpouštědlo: hexan/aceton, 90:10 (V/V)

2.6 Standardní roztok, 0,001 % ve vodě:

2-(ethylmercuriothio)benzoátu sodného,
chloridu ethylrtuti nebo chloridu methylrtuti,
dusičnanu fenylrtuti nebo octanu fenylrtuti,
chloridu rtuťnatého nebo octanu rtuťnatého.

2.7 Hotové silikagelové desky (např. Merck 5721 nebo ekvivalentní)

2.8 Chlorid sodný

3. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

3.1 Obvyklé laboratorní vybavení

3.2 Obvyklé vybavení pro TLC

3.3 Filtr pro separaci fází

4. POSTUP

4.1 *Extrakce*

4.1.1 1 g vzorku se zředí v centrifugační kyvetě 20 ml destilované vody. Co nejvíce se rozptýlí a zahřeje na vodní lázni na 60 °C. Přidají se 4 g chloridu sodného (2.8). Protřepe se. Nechá se vychladnout.

4.1.2 Odstředuje se alespoň 20 minut při 4500 ot./min, aby se oddělila větší část pevné fáze od kapaliny. Přefiltruje se do dělicí nálevky a přidá se 0,25 ml roztoku kyseliny sírové (2.1).

- 4.1.3 Několikrát se extrahuje 2 až 3 ml roztoku dithizonu (2.2), dokud nezůstane poslední organická fáze zelená.
- 4.1.4 Všechny organické fáze se postupně přefiltrují přes filtr pro separaci fází (3.3).
- 4.1.5 Odpaří se do sucha v proudu dusíku (2.3).
- 4.1.6 Rozpustí se v 0,5 ml chloridu uhličitého (2.4). Roztok se okamžitě použije způsobem popsaným v bodě 4.2.1.

4.2 *Separace a kvalitativní stanovení*

- 4.2.1 Na silikagelovou desku (2.7) se ihned nanese 50 µl roztoku v chloridu uhličitém, připraveného podle bodu 4.1.6. Současně se 10 ml standardního roztoku (2.6) podrobí postupu popsanému v bodě 4.1 a 50 µl získaného roztoku se nanese na tutéž desku.
- 4.2.2 Deska se umístí do rozpouštědla (2.5) a rozpouštědlo se nechá vystoupit do výšky 150 mm. Organické sloučeniny rtuti se objeví jako oranžové skvrny, jejichž barva je stálá, jestliže se okamžitě po odpaření rozpouštědla přikryjí skleněnou deskou.

Lze získat například následující hodnoty R_f :

	R_f	Barva
Thiomersal	0,33	Oranžová
Chlorid ethylrtuti	0,29	Oranžová
Chlorid methylrtuti	0,29	Oranžová
Soli fenylrtuti	0,21	Oranžová
Rtuťnaté soli	0,10	Oranžová
Octan rtuťnatý	0,10	Oranžová
1,5-difenyl-3-thiokarbazon	0,09	Růžová

B. KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ

1. DEFINICE

Obsah organických sloučenin rtuti stanovený touto metodou se vyjádří v hmotnostních procentech (m/m) rtuti ve vzorku.

2. PRINCIP

Metoda je založena na měření celkového obsahu přítomné rtuti. Je proto nezbytné se nejprve ujistit, že není přítomna anorganická rtuť, a identifikovat organické sloučeniny rtuti přítomné ve vzorku. Po mineralizaci se uvolněná rtuť stanoví bezplamenovou atomovou absorpcí.

3. REAKČNÍ ČINIDLA

Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a.

- 3.1 Koncentrovaná kyselina dusičná, $d_4^{20} = 1,41$ g/ml
- 3.2 Koncentrovaná kyselina sírová, $d_4^{20} = 1,84$ g/ml
- 3.3 Redestilovaná voda
- 3.4 Manganistan draselný, 7% roztok (m/V)
- 3.5 Hydroxylamonium-chlorid, 1,5% roztok (m/V)
- 3.6 Peroxodisíran draselný, 5% roztok (m/V)

- 3.7 Chlorid cínatý, 10% roztok (m/V)
- 3.8 Koncentrovaná kyselina chlorovodíková, $d_4^{20} = 1,18$ g/ml
- 3.9 Skelná vata impregnovaná chloridem paladnatým, 1% (m/m)
4. PŘÍSTROJE A POMŮCKY
- 4.1 Obvyklé laboratorní vybavení
- 4.2 Přístroj pro stanovení rtuti bezplamenovou atomovou absorpční spektrometrií (technika generování studených par) včetně potřebného skleněného nádobí. Optická dráha kyvety alespoň 100 mm.
5. POSTUP
- Zachovávají se všechna bezpečnostní opatření obvyklá pro stopovou analýzu rtuti.
5. **Rozklad**
- 5.1.1 Přesně se naváží 150 mg vzorku (m). Přidá se 10 ml kyseliny dusičné (3.1) a ponechá se působit tři hodiny ve vzduchotěsné nádobce ve vodní lázni při 55 °C, v pravidelných intervalech se protřepává. Současně se provede slepý pokus s reakčními činidly.
- 5.1.2 Po vychladnutí se přidá 10 ml kyseliny sírové (3.2) a ještě jednou se zahřívá 30 minut ve vodní lázni vyhřáté na 55 °C.
- 5.1.3 Nádoba se vloží do ledové lázně a opatrně se přidá 20 ml vody (3.3).
- 5.1.4 Po dávkách se přidají 2 ml 7% roztoku manganistanu draselného (3.4), dokud roztok nezůstane zbarvený. Vráť se na dalších 15 minut do vodní lázně vyhřáté na 55 °C.
- 5.1.5 Přidají se 4 ml roztoku peroxidisíranu draselného (3.6). V zahřívání na vodní lázni při 55 °C se pokračuje po dobu 30 minut.
- 5.1.6 Nechá se vychladnout a obsah se převede do odměrné baňky na 100 ml. Nádobka se vypláchne 5 ml roztoku hydroxylamonium-chloridu (3.5) a poté čtyřikrát 10 ml vody (3.3). Roztok by se měl úplně odbarvit. Doplní se po rysku vodou (3.3).
- 5.2 **Kvantitativní stanovení**
- 5.2.1 10 ml zkušební roztoku (5.1.6) se převede do skleněné nádobky pro stanovení rtuti technikou generování studených par (4.2). Zředí se 100 ml vody (3.3) a následně se přidá 5 ml kyseliny sírové (3.2) a 5 ml roztoku chloridu cínatého (3.7). Po každém přidávku se promíchá. Vyčká se 30 sekund, aby se veškeré ionty rtuti zredukovaly na kovovou rtuť, a odečte se výsledná hodnota (n).
- 5.2.2 Skelná vata impregnovaná chloridem paladnatým (3.9) se vloží mezi redukční nádobku a průtočnou kyvetu přístroje (4.2). Postup podle bodu 5.2.1 se opakuje a odečte se výsledná hodnota. Pokud hodnota není nulová, mineralizace byla neúplná a analýza se musí opakovat.
7. VÝPOČET
- Označí-li se
- m = hmotnost zkušební vzorku (v mg)
- n = množství rtuti odečtené na přístroji (v μg), pak:
- množství rtuti vyjádřené v hmotnostních procentech rtuti se vypočte ze vzorce:

$$\% \text{ rtuti} = \frac{n}{m}$$

7. POZNÁMKY

- 7.1 Ke zlepšení mineralizace může být nezbytné začít zředěním vzorku.
- 7.2 Je-li podezření, že se rtuť absorbuje na substrát, mělo by se provést kvantitativní stanovení metodou standardních přídavek.

8. OPAKOVATELNOST⁽³⁾

Pro výrobky obsahující asi 0,007 % (m/m) rtuť nesmí rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení na stejném vzorku překročit absolutní hodnotu 0,00035 %.

KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ ALKALICKÝCH SULFIDŮ A SULFIDŮ KOVŮ ALKALICKÝCH ZEMIN

(Směrnice komise 83/514/EHS z 27. září 1983)

1. ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ

V této metodě je popsáno kvantitativní stanovení sulfidů přítomných v kosmetických prostředcích. Přítomnost thiolů nebo jiných redukčních činidel (včetně siřičitanů) neruší.

2. DEFINICE

Koncentrace sulfidů stanovená touto metodou se vyjádří v hmotnostních procentech síry.

3. PRINCIP

V okyseleném prostředí se sirovodík odvede proudem dusíku a poté se vysráží ve formě sulfidu kademnatého. Ten se odfiltruje, propláchne a stanoví jodometricky.

4. REAKČNÍ ČINIDLA

Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a.

- 4.1 Koncentrovaná kyselina chlorovodíková, $d_4^{20} = 1,19$ g/ml
- 4.2 Thiosíran sodný, 0,1M odměrný roztok
- 4.3 Jod, 0,05M odměrný roztok
- 4.4 Sulfid sodný
- 4.5 Octan kademnatý
- 4.6 Koncentrovaný amoniak, $d_4^{20} = 0,90$ g/ml
- 4.7 Amoniakální roztok octanu kademnatého: 10 g octanu kademnatého (4.5) se rozpustí v přibližně 50 ml vody. Přidává se amoniak (4.6), dokud se sraženina nerozpustí (tj. přibližně 20 ml). Doplní se vodou po rysku do 100 ml.
- 4.8 Dusík
- 4.9 Roztok amoniaku M

³ Viz ČSN ISO 5725

5. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

5.1 Obvyklé laboratorní vybavení

5.2 Tříhrdlá zábrusová baňka na 100 ml s kulatým dnem

5.3 Dvě Erlenmeyrové baňky na 150 ml se zábrusem, s trubičkou pro přívod a odvod plynu.

5.4 Jedna nálevka s dlouhým stonkem

6. POSTUP

6.1 *Uvolnění sulfidů*

6.1.1 Použije se dosud neotevřené balení prostředku. Do baňky s kulatým dnem (5.2) se přesně naváží množství výrobku (m) (vyjádřeno v gramech), které odpovídá nejvýše 30 mg sulfidových iontů. Přidá se 60 ml vody a dvě kapky odpěňovače.

6.1.2 Do obou Erlenmeyerových baněk (5.3) se převede po 50 ml roztoku (4.7).

6.1.3 Na tříhrdlou baňku (5.2) se připojí dělicí nálevka, trubice pro přívod a odvod plynu. Trubice pro odvod plynu se připojí pomocí hadiček z PVC na Erlenmeyrové baňky (5.3) řazené za sebou.

Poznámka: Aparatura na uvolnění sulfidů musí projít následující zkouškou těsnosti: za stejných zkušebních podmínek se prostředek, který má být zkoumán, nahradí 10 ml roztoku sulfidu (přípraveného podle bodu 4.4), obsahujícího „X mg“ sulfidu (stanoví se jodometricky). Necht' „Y“ je počet miligramů sulfidu zjištěný na konci této operace. Rozdíl mezi množstvím „X“ a „Y“ nesmí překročit 3 %.

6.1.4 Pro odstranění vzduchu se nechá baňkou s kulatým dnem (5.2) 15 minut procházet dusík (4.8) rychlostí dvě bublinky za sekundu.

6.1.5 Baňka s kulatým dnem se ohřeje na 85 ± 5 °C.

6.1.6 Proud dusíku (4.8) se zastaví a po kapkách se přidá 40 ml kyseliny chlorovodíkové (4.1).

6.1.7 Proud dusíku (4.8) se obnoví po přidání téměř veškeré kyseliny, ponechá se minimální množství kapaliny, aby se zamezilo úniku sirovodíku.

6.1.8 Po 30 minutách se ohřev přeruší. Baňka (5.2) se nechá nejméně hodinu a půl chladnout za stálého proudu dusíku (4.8).

6.2 *Titrace*

6.2.1 Sraženina sulfidu kademnatého se odfiltruje přes nálevku s dlouhým stonkem (5.4).

6.2.2 Erlenmeyrové baňky (5.3) se nejprve propláchnou roztokem amoniaku (4.9) a kapalina se nalije na filtr. Poté se vypláchnou destilovanou vodou a voda se použije k promytí sraženiny zadržované na filtru.

6.2.3 Promývání sraženiny se dokončí promytím dalšími 100 ml vody.

6.2.4 Papírový filtr se vloží do první Erlenmeyrové baňky, která obsahovala sraženinu. Přidá se 25 ml (n_1) roztoku jodu (4.3), přibližně 20 ml kyseliny chlorovodíkové (4.1) a 50 ml destilované vody.

6.2.5 Nadbytek jodu se stanoví roztokem thiosíranu sodného (n_2) (4.2).

7. VÝPOČET

Obsah sulfidů ve vzorku vyjádřený v hmotnostních procentech síry se vypočte podle následujícího vzorce:

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

kde:

n_1 = použité množství odměrného roztoku jodu (4.3) (v mililitrech),

x_1 = molarita tohoto roztoku,

n_2 = použité množství odměrného roztoku thiosíranu sodného (4.2) (v mililitrech),

x_2 = molarita tohoto roztoku,

m = hmotnost zkušební vzorku (v gramech).

8. OPAKOVATELNOST⁽³⁾

Pro výrobky obsahující asi 2 % (m/m) sulfidů nesmí rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení na stejném vzorku překročit absolutní hodnotu 0,2 %.

KVALITATIVNÍ A KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ 2,3-DIHYDROXYPROPYL-4-AMINOBEZOÁTU

(Směrnice komise 85/490/EHS z 11. října 1985)

A. KVALITATIVNÍ STANOVENÍ

1. ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ

Tato metoda slouží ke kvalitativnímu stanovení 2,3-dihydroxypropyl-4-aminobenzoátu (glycerol-1-(4-aminobenzoátu)). Slouží rovněž ke kvalitativnímu stanovení ethyl-4-aminobenzoátu (benzokainu INN), který může být přítomen jako nečistota.

2. PRINCIP

Kvalitativní stanovení se provádí chromatografií na tenké vrstvě s použitím silikagelu a fluorescenčního indikátoru a důkazem volné primární aminoskupiny prostřednictvím tvorby diazobarviva na desce.

3. REAKČNÍ ČINIDLA

Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a.

3.1 Směs rozpouštědel: cyklohexan/propan-2-ol/stabilizovaný dichlormethan 48/64/9 (V/V/V).

3.2 Vyvíjecí rozpouštědlo: petrolether (40-60)/benzen/aceton/roztok hydroxidu amonného (alespoň 25 % amoniaku): 35/35/35/1 (V/V/V/V).

3.3 Detekční činidlo: a) dusitan sodný: 1 g ve 100 ml 1M HCl (připravený těsně před použitím),

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

³ Viz ČSN ISO 5725

- 3.4 Standardní roztoky:
2,3-dihydroxypropyl-4-aminobenzoát: 0,05 g ve 100 ml směsného rozpouštědla 3.1;
ethyl-4-aminobenzoát: 0,05 g ve 100 ml směsného rozpouštědla 3.1.
- 3.5 Silikagelové desky 60 F254, o tloušťce vrstvy 0,25 mm, 200 mm × 200 mm.
4. PŘÍSTROJE A POMŮCKY
- 4.1 Obvyklé zařízení pro chromatografii na tenké vrstvě
- 4.2 Ultrazvuková lázeň
- 4.3 Filtr Millipore FH 0,5 μm nebo ekvivalentní
5. POSTUP
- 5.1 **Příprava vzorku**
Do odměrné baňky s uzávěrem na 10 ml se naváží 1,5 g prostředku, který má být analyzován. Doplní se po rysku rozpouštědlem 3.1. Uzavře se a 1 hodinu ponechá při pokojové teplotě v ultrazvukové lázni (4.2.). Zfiltruje se přes filtr Millipore (4.3) a filtrát se použije pro chromatografii.
- 5.2 **Chromatografie na tenké vrstvě**
Na desku (3.5) se nanese 10 μl roztoku vzorku (5.1) a každého ze standardních roztoků (3.4). Chromatogram se vyvíjí do výšky 150 mm v komoře předem nasycené rozpouštědlem 3.2. Deska se nechá vyschnout při teplotě okolí.
- 5.3 **Detekce**
- 5.3.1 Deska se pozoruje pod UV světlem 254 nm.
- 5.3.2 Zcela vysušená deska se postříká roztokem 3.3 a).
Deska se nechá schnout 1 minutu při pokojové teplotě a ihned se postříká roztokem 3.3 b). Vysuší se v sušárně při 60 °C. Objeví se skvrny oranžové barvy. 2,3-dihydroxypropyl-4-aminobenzoát: R_f asi 0,07, ethyl-4-aminobenzoát: R_f 0,55.

B. KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ

1. ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ
Tato metoda slouží ke kvantitativnímu stanovení 2,3-dihydroxypropyl-4-aminobenzoátu a rovněž stanovuje ethyl-4-aminobenzoát. Nelze stanovit více než 5 % (m/m) 2,3-dihydroxypropyl-4-aminobenzoátu a více než 1 % (m/m) ethyl-4-aminobenzoátu.
2. DEFINICE
Obsah 2,3-dihydroxypropyl-4-aminobenzoátu a obsah ethyl-4-amino-benzoátu stanovené touto metodou se vyjádří v procentech (% m/m) hmotnosti prostředku.
3. PRINCIP
Prostředek, který má být analyzován, se suspenduje v methanolu a po vhodné úpravě vzorku se stanoví vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC).
4. REAKČNÍ ČINIDLA
Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a. a musí být vhodná pro HPLC.
- 4.1 Methanol
- 4.2 Dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4)

- 4.3 Octan zinečnatý ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- 4.4 Kyselina octová ($d_4^{20} = 1,05$)
- 4.5 Hexakynoželeznatan draselný ($\text{K}_4(\text{Fe}(\text{CN})_6) \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)
- 4.6 Ethyl-4-hydroxybenzoát
- 4.7 2,3-dihydroxypropyl-4-aminobenzoát
- 4.8 Ethyl-4-aminobenzoát
- 4.9 Fosfátový pufráční roztok (0,02M): rozpustí se 2,72 g dihydrogenfosforečnanu draselného (4.2) v jednom litru vody.
- 4.10 Eluční roztok: fosfátový pufráční roztok (4.9)/methanol (4.1) 61/39 (V/V)

Složení mobilní fáze může být změněno s cílem dosáhnout faktoru rozlišení $R \geq 1,5$.

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

kde

R_1 a R_2 = retenční časy pík v minutách,

W_1 a W_2 = šířky pík v polovině výšky pík v mm,

d' = rychlost posuvu papíru v milimetrech za minutu.

- 4.11 Zásobní roztok 2,3-dihydroxypropyl-4-aminobenzoátu: Naváží se přesně asi 40 mg 2,3-dihydroxypropyl-4-aminobenzoátu a převede se do odměrné baňky na 100 ml. Rozpustí se ve 40 ml methanolu (4.1). Doplní se pufráčním roztokem (4.9) po rysku a promíchá se.
- 4.12 Zásobní roztok ethyl-4-aminobenzoátu: Naváží se přesně asi 40 mg ethyl-4-aminobenzoátu a převede se do odměrné baňky na 100 ml. Rozpustí se ve 40 ml methanolu (4.1). Doplní se pufráčním roztokem (4.9) po rysku a promíchá se.
- 4.13 Roztok vnitřního standardu: Naváží se přesně asi 50 mg ethyl-4-hydroxybenzoátu a převede se do odměrné baňky na 100 ml. Rozpustí se ve 40 ml methanolu (4.1). Doplní se pufráčním roztokem (4.9) po rysku a promíchá se.
- 4.14 Standardní roztoky: Připraví se čtyři standardní roztoky rozpuštěním následujících látek ve 100 ml elučního roztoku (4.10) podle následující tabulky:

Standardní roztok	2,3-dihydroxypropyl-4-aminobenzoát		ethyl-4-aminobenzoát		ethyl-4-hydroxybenzoát	
	($\mu\text{g}/\text{ml}$) (*)	ml (4.11)	($\mu\text{g}/\text{ml}$) (*)	ml (4.12)	($\mu\text{g}/\text{ml}$) (*)	ml (4.13)
I	8	2	8	2	50	10
II	16	4	12	3	50	10
III	24	6	16	4	50	10
IV	40	10	20	5	50	10

(*) Tyto hodnoty jsou informativní a odpovídají přesným hmotnostem v 4.11, 4.12 a 4.13.

Poznámka: Tyto roztoky mohou být připraveny jiným způsobem.

4.15 Carrezovo činidlo I: Rozpustí se 26,5 g hexakynoželeznatanu draselného (4.5) ve vodě a doplní se do 250 ml.

4.16 Carrezovo činidlo II: Rozpustí se 54,9 g octanu zinečnatého (4.3) a 7,5 ml kyseliny octové (4.4) ve vodě a doplní se do 250 ml.

4.17 Merck Lichrosorb RP-18, nebo ekvivalentní, s průměrnou velikostí částic 5 μm

5. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

5.1 Obvyklé laboratorní vybavení

5.2 Zařízení pro vysokouúčinnou chromatografii s ultrafialovým detektorem o nastavitelné vlnové délce a komorou s termostatem nastaveným na 45 °C

5.3 Kolona z nerezové oceli: délka: 250 mm; vnitřní průměr: 4,6 mm; náplň Lichrosorb RP-18 (4.17)

5.4 Ultrazvuková lázeň

6. POSTUP

6.1 Příprava vzorku

6.1.1 Do kádinky na 100 ml se přesně naváží 1 g vzorku a přidá se 10 ml methanolu (4.1).

6.1.2 Kádinka se na 20 minut umístí do ultrazvukové lázně (5.4), aby se vytvořila suspenze. Takto vytvořená suspenze se kvantitativně převede nejvýše 75 ml elučního činidla (4.10) do odměrné baňky na 100 ml.

Postupně se přidá 1 ml Carrezova činidla I (4.15) a 1 ml Carrezova činidla II (4.16) a po každém přidání se promíchá. Doplní se elučním roztokem (4.10) po rysku, znovu se promíchá a zfiltruje se přes skládaný filtrační papír.

6.1.3 Do odměrné baňky na 50 ml se pipetou převede 3,0 ml filtrátu získaného podle bodu 6.1.2 a 5,0 ml roztoku vnitřního standardu (4.13). Doplní se elučním roztokem po rysku a promíchá se. Takto získaný roztok se použije pro provedení chromatografické analýzy popsané v bodě 6.2.

6.2 Chromatografie

6.2.1 Průtok mobilní fáze (4.10) se upraví na 1,2 ml/min a teplota kolony se nastaví na 45 °C.

6.2.2 Detektor (5.2) se nastaví na 274 nm.

6.2.3 Do chromatografu se mikrostříkačkou alespoň dvakrát nastříkne 20 μl roztoku (6.1.3) a změří se plochy píků.

6.3 Kalibrační křivka

6.3.1 Nastříkne se 20 μl každého ze standardních roztoků (4.14) a změří se plochy píků.

6.3.2 Pro každou koncentraci se vypočte poměr ploch píků 2,3-dihydroxypropyl-4-aminobenzoátu k plochám píků vnitřního standardu. Tento poměr se vynese na osu *x* a na osu *y* se vynese poměr odpovídajících hmotností.

6.3.3 Stejným způsobem se postupuje v případě ethyl-4-hydroxybenzoátu.

7. VÝPOČET

7.1 Z kalibrační křivky získané v bodě 6.3 se odečtou poměry hmotností (RP1, RP2) odpovídající poměrům mezi plochami píků vypočítanými v bodě 6.2.3, kde

RP1 = hmotnost 2,3-dihydroxypropyl-4-aminobenzoátu / hmotnost ethyl-4-hydroxybenzoátu,

RP2 = hmotnost ethyl-4-aminobenzoátu / hmotnost ethyl-4-hydroxybenzoátu,

- 7.2 Z takto získaných poměrů hmotností se vypočítá obsah 2,3-dihydroxypropyl-4-aminobenzoátu a obsah ethyl-4-aminobenzoátu v hmotnostních procentech (% m/m) pomocí vzorce:

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

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

q = množství ethyl-4-hydroxybenzoátu (vnitřního standardu) navážené v bodě 4.12 v mg,

p = množství vzorku navážené v bodě 6.1.1 v g.

8. OPAKOVATELNOST⁽³⁾
- 8.1 Pro výrobky obsahující asi 5 % (m/m) 2,3-dihydroxypropyl-4-aminobenzoátu nesmí rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení na stejném vzorku překročit absolutní hodnotu 0,25 %.
- 8.2 Pro výrobky obsahující asi 1 % (m/m) ethyl-4-aminobenzoátu nesmí rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení na stejném vzorku překročit absolutní hodnotu 0,10 %.
9. POZNÁMKY
- 9.1 Před provedením analýzy je třeba zkontrolovat, zda vzorek neobsahuje látky, jejichž píky by se mohly na chromatogramu překrývat s píkem vnitřního standardu (ethyl-4-aminobenzoátu).
- 9.2 Pro kontrolu, zda nedochází k další interferenci, se stanovení opakuje, přičemž se podíl methanolu v mobilní fázi změní relativně o 10 %.

KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ CHLORBUTANOLU

(Směrnice komise 85/490/EHS z 11. října 1985)

- 1 ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ
- Tato metoda je vhodná pro kvantitativní stanovení chlorbutanolu (INN) až do maximální koncentrace 0,5 % (m/m) ve všech kosmetických prostředcích s výjimkou aerosolů.
- 2 DEFINICE
- Obsah chlorbutanolu stanovený touto metodou se vyjádří v procentech hmotnosti (% m/m) prostředku.
- 3 PRINCIP
- Po vhodném zpracování prostředku, který má být analyzován, se stanovení provede plynovou chromatografií s 2,2,2-trichlorethanolem jako vnitřním standardem.

³ Viz ČSN ISO 5725

4. REAKČNÍ ČINIDLA

Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a.

4.1 Chlorbutanol (1,1,1-trichlor-2-methylpropan-2-ol)

4.2 2,2,2-trichlorethanol

4.3 Absolutní ethanol

4.4 Standardní roztok chlorbutanolu: 0,025 g ve 100 ml ethanolu (4.3) (m/V)

4.5 Standardní roztok 2,2,2-trichlorethanolu: 4 mg ve 100 ml ethanolu (4.3) (m/V)

5. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

5.1 Obvyklé laboratorní vybavení

5.2 Plynový chromatograf s detektorem elektronového záchyty s ^{63}Ni

6. POSTUP

6.1 Příprava vzorku

Do odměrné baňky na 100 ml se odváží přesně od 0,1 až 0,3 g vzorku (p gramů). Obsah se rozpustí v ethanolu (4.3), přidá se 1 ml roztoku vnitřního standardu (4.5) a doplní po rysku ethanollem.

6.2 Chromatografické podmínky

6.2.1 Provozní podmínky musí dávat rozlišovací faktor $R \geq 1,5$.

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

kde

R_1 a R_2 = retenční časy píků v minutách,

W_1 a W_2 = šířky píků v polovině výšky píků v mm,

d' = rychlost posuvu papíru v milimetrech za minutu.

6.2.2 Požadované rozlišení poskytnou například následující provozní podmínky:

Kolona	I	II
Materiál	Sklo	Nerezová ocel
Délka	1,8 m	3 m
Průměr	3 mm	3 mm
Stacionární fáze	10% Carbowax 20 M TPA na Gaschromu Q 80 - 100 mesh	5% OV 17 na Chromosorbu WAW DMCS 80 - 100 mesh
Kondicionování	2 až 3 dny při 190 °C	
Teplota:		
– nástřík	200 °C	150 °C
– kolona	150 °C	100 °C
– detektor	200 °C	150 °C
Nosný plyn	Dusík	Argon/methan (95/5 V/V)
Průtok	35 ml/min	35 ml/min

6.3 Kalibrační křivka

Do pěti odměrných baněk na 100 ml se odměří 1 ml standardního roztoku (4.5) a 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 nebo 0,6 ml roztoku 4.4, objem se doplní po rysku ethanolem (4.3) a promíchá. Do chromatografu se nastříkne po 1 µl každého z těchto roztoků za provozních podmínek popsaných v bodě 6.2.2 a kalibrační křivka se sestrojí vnesením poměru hmotností chlorbutanolu a 2,2,2-trichlorethanolu na osu x a poměru odpovídajících ploch píků na osu y .

6.4 Nastříkne se 1 µl roztoku připraveného v bodě 6.1 a postupuje se podle podmínek popsaných v bodě 6.2.2.

7. VÝPOČET

7.1 Z kalibrační křivky (6.3) se odečte hodnota „ a “ vyjádřená v µg chlorbutanolu v roztoku 6.1.

7.2 Obsah chlorbutanolu ve vzorku se vypočte podle vzorce

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

8. OPAKOVATELNOST⁽³⁾

Pro výrobky obsahující asi 0,5 % (m/m) chlorbutanolu nesmí rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení na stejném vzorku překročit absolutní hodnotu 0,10 %.

Poznámka:

Jestliže je výsledek roven nebo větší než nejvyšší povolená koncentrace, je nutno zkontrolovat, zda nedochází k interferenci.

KVALITATIVNÍ A KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ CHININU

(Směrnice komise 85/490/EHS z 11. října 1985)

A. KVALITATIVNÍ STANOVENÍ

1. ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ

Tato metoda je určena ke kvalitativnímu stanovení přítomnosti chininu v šamponech a vlasových lotionech.

2. PRINCIP

Kvalitativní stanovení se provádí chromatografií na tenké vrstvě silikagelu. Důkazem chininu je modrá fluorescence v kyselém prostředí při 360 nm.

Pro další potvrzení lze fluorescenci odstranit parami bromu a páry čpavku vyvolají žlutou fluorescenci.

³ Viz ČSN ISO 5725

3 REAKČNÍ ČINIDLA

Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a.

- 3.1 Silikagelové desky bez fluorescenčního indikátoru, o tloušťce vrstvy 0,25 mm, 200 mm × 200 mm
- 3.2 Vyvíjecí rozpouštědlo: toluen/diethylether/dichlormethan/diethylamin 20/20/20/8 (V/V/V/V)
- 3.3 Methanol
- 3.4 Kyselina sírová (96%; $d_4^{20} = 1,84$ g/ml)
- 3.5 Diethylether
- 3.6 Detekční činidlo: k 95 ml diethyletheru (3.5) se v chlazené nádobě opatrně přidá 5 ml kyseliny sírové (3.4).
- 3.7 Brom
- 3.8 Vodný roztok čpavku (28 %; $d_4^{20} = 0,90$)
- 3.9 Chinin bezvodý
- 3.10 Standardní roztok: do odměrné baňky se naváží přesně asi 100,0 mg bezvodého chininu (3.9) a rozpustí se ve 100 ml methanolu (3.3).

4. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

- 4.1 Obvyklé vybavení pro chromatografii na tenké vrstvě
- 4.2 Ultrazvuková lázeň
- 4.3 Filtr Millipore FH 0,5 μ m nebo ekvivalentní a vhodné filtrační zařízení

5. POSTUP

5.1 Příprava vzorku

Do odměrné baňky na 100 ml se přesně naváží množství vzorku, které obsahuje asi 100 mg chininu, rozpustí se a doplní po rysku methanolem (3.3).

Baňka se uzavře a ponechá jednu hodinu při pokojové teplotě v ultrazvukové lázni (4.2). Obsah se zfiltruje (4.3) a filtrát se použije pro chromatografii.

5.2 Chromatografie na tenké vrstvě

Na desku (3.1) se nanese 1,0 μ l standardního roztoku (3.10) a 1,0 μ l roztoku vzorku (5.1). Chromatogram se vyvíjí do výšky 150 mm v komoře předem nasycené rozpouštědlem (3.2).

5.3 Detekce

- 5.3.1 Deska se vysuší při pokojové teplotě.
- 5.3.2 Postříká se činidlem 3.6.
- 5.3.3 Deska se nechá jednu hodinu schnout při pokojové teplotě.
- 5.3.4 Pozoruje se ve světle UV lampy nastavené na vlnovou délku 360 nm. Chinin se projeví jako intenzivně fluoreskující modrá skvrna.

Jako příklad jsou v následující tabulce uvedeny hodnoty R_f hlavních chininových alkaloidů při vyvíjení chromatogramu rozpouštědlem 3.2:

Alkaloid	R _f
Chinin	0,20
Chinidin	0,29
Cinchonin	0,33
Cinchonidin	0,27
Hydrochinidin	0,17

5.3.5 Pro další potvrzení přítomnosti chininu se deska vystaví asi na jednu hodinu parám bromu (3.7). Fluorescence zmizí. Je-li tatáž deska vystavena parám amoniaku (3.8), skvrny se znovu objeví v hnědé barvě a pod světlem UV lampy (360 nm) je pozorovatelná nažloutlá fluorescence. Mez detekce: 0,1 µg chininu.

B. KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ

1. ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ

V této metodě je popsáno kvantitativní stanovení chininu. Metodu lze použít ke stanovení chininu do nejvyšší přípustné koncentrace 0,5 % (m/m) v šamponech a 0,2 % ve vlasových lotionech.

2. DEFINICE

Obsah chininu stanovený touto metodou se vyjádří v procentech hmotnosti (% m/m) prostředku.

3. PRINCIP

Po vhodném zpracování prostředku, který má být analyzován, se stanovení provede vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC).

4. REAKČNÍ ČINIDLA

Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a. a musí být vhodná pro HPLC.

4.1 Acetonitril

4.2 Dihydrogenfosforečnan draselný (KH₂PO₄)

4.3 Kyselina trihydrogenfosforečná (85 %; d₄²⁰ = 1,7 g/ml)

4.4 Tetramethylamoniumbromid

4.5 Chinin bezvodý

4.6 Methanol

4.7 Roztok kyseliny trihydrogenfosforečné (0,1M):

Naváží se 11,53 g kyseliny trihydrogenfosforečné (4.3) a rozpustí se v odměrné baňce v 1000 ml vody.

4.8 Roztok dihydrogenfosforečnanu draselného (0,1M):

Naváží se 13,6 g dihydrogenfosforečnanu draselného (4.2) a rozpustí se v odměrné baňce v 1000 ml vody.

4.9 Roztok tetramethylamoniumbromidu:

Rozpustí se 15,40 g tetramethylamoniumbromidu (4.4) v odměrné baňce v 1000 ml vody.

- 4.10 Mobilní fáze: Kyselina trihydrogenfosforečná (4.7)/roztok dihydrogenfosforečnanu draselného (4.8)/roztok tetramethylamonium bromidu (4.9)/voda/acetonitril (4.1) 10/50/100/340/90 (V/V/V/V/V).

Složení uvedené mobilní fáze může být změněno tak, aby se dosáhlo rozlišení $R \geq 1,5$.

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

kde

R_1 a R_2 = retenční časy píků v minutách,

W_1 a W_2 = šířky píků v polovině výšky píků v mm,

d' = rychlost posuvu papíru v milimetrech za minutu.

- 4.11 Silikagel chemicky vázaný s oktadecylsilanem, 10 μm
- 4.12 Standardní roztoky: Do odměrných baněk na 100 ml se přesně naváží asi 5,0, 10,0, 15,0 a 20,0 mg bezvodého chininu (4.5), doplní se po rysku methanolem (4.6) a obsah se protřepe, dokud se chinin nerozpustí. Roztoky se filtrují přes filtr 0,5 μm .

5. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

- 5.1 Obvyklé laboratorní vybavení
- 5.2 Ultrazvuková lázeň
- 5.3 Zařízení pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii s detektorem s nastavitelnou vlnovou délkou
- 5.4 Kolona: délka 250 mm, vnitřní průměr 4,6 mm, náplň: silikagel (4.11)
- 5.5 Filtr Millipore FH 0,5 μm nebo ekvivalentní s vhodným filtračním zařízením

6. POSTUP

6.1 Příprava vzorku

Do odměrné baňky na 100 ml se přesně naváží množství prostředku, které obsahuje asi 10,0 mg bezvodého chininu, přidá se 20 ml methanolu (4.6) a láhev se ponoří na 20 minut do ultrazvukové lázně (5.2). Objem se doplní po rysku methanolem (4.6), promíchá se a alikvotní podíl se zfiltruje (5.5).

6.2 Chromatografické podmínky

Průtok: 1,0 ml/min.

Vlnová délka detektoru (5.3): 332 nm.

Objem nástřiku: 10 μl filtrovaného roztoku (6.1).

Měřená veličina: plocha píku.

6.3 Kalibrační křivka

Alespoň třikrát se nastříkne 10 μl každého standardního roztoku (4.12), změří se plocha píků a vypočte se průměrná hodnota pro každou koncentraci.

Sestrojí se kalibrační křivka a ověří se, zda tvoří přímku.

7. VÝPOČET

- 7.1 Z kalibrační křivky (6.3) se odečte množství bezvodého chininu v μg , obsaženého v nastříknutém objemu (6.2).

- 7.2 Koncentrace bezvodého chininu ve vzorku vyjádřená v hmotnostních procentech (% m/m) se vypočte ze vzorce:

$$\% \text{ (m/m) bezvodého chininu} = \frac{B}{A}$$

kde

B = množství bezvodého chininu v mikrogramech nalezené v 10 mikrolitrech zfiltrovaného roztoku (6.1),

A = hmotnost vzorku v gramech (6.1).

8. OPAKOVATELNOST⁽³⁾

Pro výrobky obsahující asi 0,5 % (m/m) bezvodého chininu nesmí rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení na stejném vzorku překročit absolutní hodnotu 0,02 %.

Pro výrobky obsahující asi 0,2 % (m/m) bezvodého chininu nesmí rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení na stejném vzorku překročit absolutní hodnotu 0,01 %.

KVALITATIVNÍ A KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ ANORGANICKÝCH SIŘIČITANŮ A HYDROGENSIŘIČITANŮ

(Směrnice komise 85/490/EHS z 11. října 1985)

ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ

V této metodě je popsáno kvalitativní a kvantitativní stanovení anorganických siřičitanů a hydrogensířičitanů v kosmetických prostředcích. Metoda je použitelná pouze pro prostředky, které obsahují vodnou nebo alkoholovou fázi a pro koncentrace oxidu siřičitého nepřevyšující 0,2 %.

A. KVALITATIVNÍ STANOVENÍ

1. PRINCIP

Vzorek se zahřívá s kyselinou chlorovodíkovou a uvolněný oxid siřičitý se identifikuje jeho zápachem nebo indikátorovým papírkem.

2. REAKČNÍ ČINIDLA

Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a.

2.1 Kyselina chlorovodíková, 4M

2.2 Škrobový papírek s jodičnanem draselným nebo jiná vhodná alternativa

3. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

3.1 Obvyklé laboratorní vybavení

3.2 Baňka na 25 ml s krátkým zpětným chladičem

³ Viz ČSN ISO 5725

4. POSTUP
- 4.1 Do baňky (3.2) se převede asi 2,5 g vzorku a 10 ml kyseliny chlorovodíkové (2.1).
- 4.2 Roztok se zamíchá a uvede do varu.
- 4.3 Unikající oxid siřičitý se dokazuje jeho zápachem nebo indikátorovým papírkem.

B. KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ

1. DEFINICE
Obsah siřičitanu nebo hydrogensiřičitanu ve vzorku, stanovený touto metodou, se vyjádří v hmotnostních procentech oxidu siřičitého.
2. PRINCIP
Po okyselení vzorku se uvolněný oxid siřičitý jímá v roztoku peroxidu vodíku. Vzniklá kyselina sírová se titruje odměrným roztokem hydroxidu sodného.
3. REAKČNÍ ČINIDLA
Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a.
 - 3.1 Peroxid vodíku 0,2 % (m/V). Roztok se připravuje denně čerstvý.
 - 3.2 Kyselina trihydrogenfosforečná ($d_4^{20} = 1,75$ g/ml)
 - 3.3 Methanol
 - 3.4 Odměrný roztok hydroxidu sodného, 0,01M
 - 3.5 Dusík
 - 3.6 Indikátor: směs 1:1 (V/V) methylové červeně (0,03% m/V) v ethanolu a methylenové modři (0,05% m/V) v ethanolu. Roztok se zfiltruje.
4. PŘÍSTROJE A POMŮCKY
 - 4.1 Obvyklé laboratorní vybavení
 - 4.2 Destilační přístroj (viz obr. Přístroj na destilaci oxidu siřičitého podle Tannera)
5. POSTUP
 - 5.1 Do destilační baňky A (viz obr. Přístroj na destilaci oxidu siřičitého podle Tannera) se přesně odváží asi 2,5 g vzorku.
 - 5.2 Přidá se 60 ml vody a 50 ml methanolu (3.3) a obsah se promíchá.
 - 5.3 Do destilační předlohy D (viz obr. Přístroj na destilaci oxidu siřičitého podle Tannera) se odměří 10 ml roztoku peroxidu vodíku (3.1), 60 ml vody a přidá se několik kapek indikátoru (3.6) a dále několik kapek hydroxidu sodného (3.4) do zeleného zbarvení indikátoru.
 - 5.4 Postup podle 5.3 se opakuje s promývací lahví E (viz obr. Přístroj na destilaci oxidu siřičitého podle Tannera).
 - 5.5 Přístroj se sestaví a průtok dusíku (3.5) se nastaví asi na 60 bublinek za minutu.
 - 5.6 Do destilační baňky A se z dělicí nálevky připustí 15 ml kyseliny trihydrogenfosforečné (3.2).
 - 5.7 Rychle se zahřeje k varu a poté se zvolna vaří 30 minut.
 - 5.8 Destilační předloha D se odpojí. Trubice se vypláchne a provede se titrace roztokem hydroxidu sodného (3.4) do zeleného zbarvení indikátoru (3.6).

6. VÝPOČET

Obsah siřičitanu nebo hydrogensiřičitanu ve vzorku v hmotnostních procentech se vypočte ze vzorce:

$$\% \text{ (m/m) oxidu siřičitého} = \frac{3,2MV}{m}$$

kde

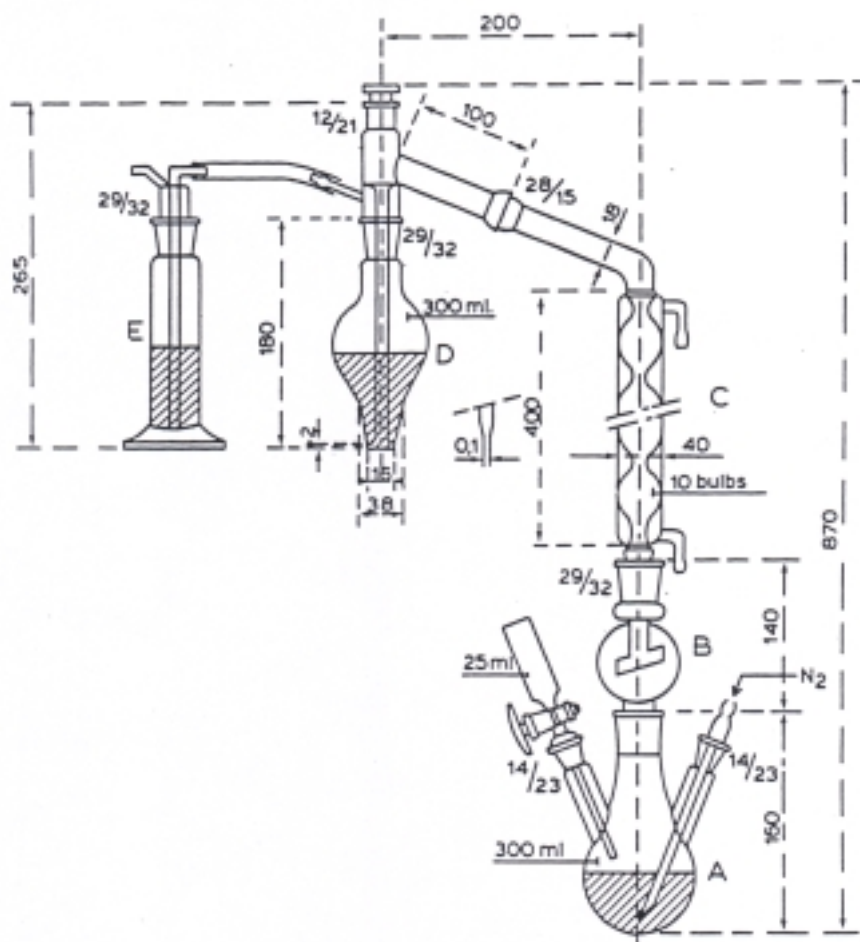
M = molární koncentrace roztoku hydroxidu sodného (3.4),

V = objem roztoku hydroxidu sodného (3.4) spotřebovaný při titraci (5.8) v mililitrech,

m = hmotnost vzorku (5.1) v gramech.

7. OPAKOVATELNOST⁽³⁾

Pro výrobky obsahující asi 0,2 % (m/m) oxidu siřičitého nesmí rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení na stejném vzorku překročit absolutní hodnotu 0,006 %.



Přístroj na destilaci oxidu siřičitého podle Tannera

Všechny rozměry v mm

Kuličkový chladič s 10 kuličkami

³ Viz ČSN ISO 5725

KVALITATIVNÍ A KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ CHLOREČNANŮ ALKALICKÝCH KOVŮ

(Směrnice komise 85/490/EHS z 11. října 1985)

ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ

V této metodě je popsána identifikace a stanovení chlorečnanů v zubní pastě a jiných kosmetických prostředcích.

A. KVALITATIVNÍ STANOVENÍ

1. PRINCIP

Chlorečnany se oddělí od bromičnanů a jodičnanů chromatografií na tenké vrstvě a identifikují se pomocí oxidace jodidu na jod.

2. REAKČNÍ ČINIDLA

Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a.

2.1 Referenční roztoky: vodné roztoky chlorečnanu, bromičnanu a jodičnanu draselného 0,2% (m/V), čerstvě připravené

2.2 Vyvíjecí rozpouštědlo: roztok čpavku 28% (m/V)/aceton/butanol (60/130/30 V/V/V)

2.3 Jodid draselný, vodný roztok 5% (m/V)

2.4 Roztok škrobu, 1 až 5% (m/V)

2.5 Kyselina chlorovodíková, 1M

2.6 Hotová celulózová deska pro chromatografií na tenké vrstvě (tloušťka vrstvy 0,25 mm)

3. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

Obvyklé vybavení pro chromatografií na tenké vrstvě

4. POSTUP

4.1 Asi 1 g vzorku se extrahuje vodou, zfiltruje se a zředí se na asi 25 ml.

4.2 Na desku (2.6) se nanese 2 μ l roztoku (4.1) a 2 μ l každého ze tří referenčních roztoků (2.1).

4.3 Deska se vloží do vyvíjecí komory a chromatogram se vyvíjí rozpouštědlem (2.2) ve vzestupném uspořádání asi do tří čtvrtin délky desky (2.6).

4.4 Deska se vyjme z komory a rozpouštědlo se nechá odpařit. (*Poznámka:* Může to trvat až dvě hodiny.)

4.5 Deska se postříká roztokem jodidu draselného (2.3) a nechá se asi pět minut schnout.

4.6 Deska se postříká roztokem škrobu (2.4) a nechá se asi pět minut schnout.

4.7 Deska se postříká roztokem kyseliny chlorovodíkové (2.5).

5. VYHODNOCENÍ

Jsou-li přítomny chlorečnany, objeví se po půl hodině modrá (případně hnědá) skvrna s hodnotou R_f přibližně 0,7 až 0,8.

	R_f
Jodičnan	0 až 0,2
Bromičnan	0,5 až 0,6
Chlorečnan	0,7 až 0,8

Je třeba poznamenat, že bromičnany a jodičnany dávají okamžitou reakci. Je třeba dbát na to, aby se nezaměnily skvrny bromičnanu a chlorečnanu.

B. KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ

1. DEFINICE

Obsah chlorečnanu ve vzorku stanovený touto metodou se vyjádří v hmotnostních procentech chlorečnanu.

2. PRINCIP

Chlorečnan je redukován práškovým zinkem v kyselém prostředí. Vzniklý chlorid se stanoví potenciometrickou titrací roztokem dusičnanu stříbrného. Podobné stanovení před redukcí odhalí možnou přítomnost bromičnanů a jodičnanů.

3. REAKČNÍ ČINIDLA

Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a.

- 3.1 Kyselina octová, 80 % (m/m)
- 3.2 Práškový zinek
- 3.3 Odměrný roztok dusičnanu stříbrného, 0,1M

4. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

- 4.1 Obvyklé laboratorní vybavení
- 4.2 Potenciometr se stříbrnou indikační elektrodou

5. POSTUP

5.1 Příprava vzorku

Do centrifugační zkumavky se naváží přesně asi 2 g vzorku („m“ gramů). Přidá se asi 15 ml kyseliny octové (3.1) a důkladně se promíchá. Po 30 minutách stání se 15 minut odstředí při 2000 ot./min. Supernatant se převede do odměrné baňky na 50 ml. Odstředování se opakuje ještě dvakrát vždy po přidání 15 ml octové kyseliny (3.1) ke zbytku. Supernatanty se sloučí v jedné odměrné baňce. Objem se doplní po rysku kyselinou octovou (3.1).

5.2 Redukce chlorečnanu

Ke 20 ml roztoku 5.1 se přidá 0,6 g práškového zinku (3.2). Obsah se ve varné baňce pod zpětným chladičem uvede do varu. Po 30 minutách varu se ochladí a zfiltruje. Baňka se vypláchne vodou a tou se promyje filtr. Filtrát a vymývací voda se spojí.

5.3 Stanovení chloridů

20 ml roztoku 5.2 se titruje roztokem dusičnanu stříbrného (3.3) s potenciometrickou indikací (4.2). Stejným způsobem se roztokem dusičnanu stříbrného (3.3) titruje 20 ml roztoku 5.1.

Poznámka: Obsahuje-li prostředek deriváty bromu nebo jodu, které mohou uvolňovat při redukci bromidy nebo jodidy, bude titrační křivka vykazovat několik inflexních bodů. V takovém případě je objem titračního činidla odpovídající chloridům dán rozdílem mezi posledním a předposledním inflexním bodem.

6. VÝPOČET

Obsah chlorečnanu ve vzorku (% m/m) se vypočte ze vzorce:

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

kde

V= objem roztoku dusičnanu stříbrného (3.3) v mililitrech, spotřebovaný při titraci roztoku 5.2,

V'= objem roztoku dusičnanu stříbrného (3.3) v mililitrech, spotřebovaný při titraci 20 ml roztoku 5.1,

M = molalita odměrného roztoku dusičnanu stříbrného (3.3),

m = hmotnost vzorku v gramech.

7. OPAKOVATELNOST⁽³⁾

Pro výrobky obsahující asi 3 až 5 % (m/m) chlorečnanu nesmí rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení na stejném vzorku překročit absolutní hodnotu 0,07 %.

KVALITATIVNÍ A KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ JODIČNANU SODNÉHO

(Směrnice komise 85/490/EHS z 11. října 1985)

ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ

Tato metoda popisuje postup kvalitativního a kvantitativního stanovení jodičnanu sodného v kosmetických prostředcích, které se po použití ihned oplachují.

A. KVALITATIVNÍ STANOVENÍ

1. PODSTATA METODY

Jodičnan sodný se oddělí od bromičnanů a jodičnanů chromatografií na tenké vrstvě a identifikuje se oxidací jodidu na jod.

2. REAKČNÍ ČINIDLA

Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a.

2.1 Referenční roztoky: vodné roztoky chlorečnanu, bromičnanu a jodičnanu draselného 0,2% (m/V), čerstvě připravené

2.2 Vytvájecí rozpouštědlo:

roztok čpavku 28% (m/V)/aceton/butanol (60/130/30 V/V/V)

³ Viz ČSN ISO 5725

- 2.3 Jodid draselný, vodný roztok 5%(m/V)
 - 2.4 Roztok škrobu, 1 až 5% (m/V)
 - 2.5 Kyselina chlorovodíková, 1M
 - 3. PŘÍSTROJE A POMŮCKY
 - 3.1 Hotová celulózová deska pro chromatografii na tenké vrstvě (tloušťka vrstvy 0,25 mm).
 - 3.2 Obvyklé vybavení pro chromatografii na tenké vrstvě
 - 4. POSTUP
 - 4.1 Asi 1 g vzorku se extrahuje vodou, zfiltruje se a zředí se na asi 10 ml.
 - 4.2 Na desku (3.1) se nanese 2 μ l tohoto roztoku a 2 μ l každého ze tří referenčních roztoků (2.1).
 - 4.3 Deska se vloží do vyvíjecí komory a chromatogram se vyvíjí rozpouštědlem 2.2 ve vzestupném uspořádání asi do tří čtvrtin délky desky.
 - 4.4 Deska se vyjme z komory a rozpouštědlo se nechá odpařit při teplotě okolí. (*Poznámka:* Může to trvat až dvě hodiny.)
 - 4.5 Deska se postříká roztokem jodidu draselného (2.3) a nechá se asi pět minut schnout.
 - 4.6 Deska se postříká roztokem škrobu (2.4) a nechá se asi pět minut schnout.
 - 4.7 Nakonec se deska se postříká roztokem kyseliny chlorovodíkové (2.5).
 - 5. VYHODNOCENÍ
- Jsou-li přítomny jodičnany, objeví se okamžitě modrá skvrna (barva může být hnědá nebo může po určité době zhnědnout) s hodnotou R_f 0 až 0,2.
- Je třeba poznamenat, že bromičnany reagují okamžitě s hodnotou R_f přibližně 0,5 až 0,6, chlorečnany reagují asi po půl hodině s hodnotou R_f 0,7 až 0,8.

B. KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ

- 1. DEFINICE
- Obsah jodičnanu sodného stanovený touto metodou se vyjádří v hmotnostních procentech jodičnanu sodného.
- 2. PRINCIP
- Jodičnan sodný se rozpustí ve vodě a stanoví se pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie se dvěma kolonami v sérii: s kolonou s obrácenou fází C18 a s kolonou plněnou anexem.
- 3. REAKČNÍ ČINIDLA
- Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a. a zejména musí být vhodná pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC).
- 3.1 Kyselina chlorovodíková, 4M
 - 3.2 Siřičitan sodný, 5% vodný roztok (m/V)
 - 3.3 Zásobní roztok jodičnanu sodného
- Připraví se zásobní roztok rozpuštěním 50 mg jodičnanu sodného ve 100 ml vody.
- 3.4 Dihydrogenfosforečnan draselný

- 3.5 Hydrogenfosforečnan disodný dihydrát
- 3.6 Mobilní fáze pro HPLC: Rozpustí se 3,88 g dihydrogenfosforečnanu draselného (3.4) a 1,19 g hydrogenfosforečnanu disodného dihydrátu (3.5) v 1 litru vody.
pH tohoto roztoku je 6.2.

3.7 Univerzální indikátorový papírek, pH 1 – 11

4. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

4.1 Obvyklé laboratorní vybavení

4.2 Kulatý filtrační papír, průměr 110 mm, Schleicher and Schüll No. 575, nebo ekvivalentní

4.3 Přístroj pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii vybavený detektorem s nastavitelnou vlnovou délkou

4.4 Kolony: Délka: 120 mm, vnitřní průměr: 4,6 mm, počet: 2 kolony v sérii; první kolona: Nucleosil® 5 C18 nebo ekvivalentní; druhá kolona: Vydac™-301-SB nebo ekvivalentní

5. POSTUP

5.1 Příprava vzorku

5.1.1 *Kapalné vzorky (šampony)*

Do kalibrované zkumavky na 10 ml se zabroušenou zátkou nebo do odměrné baňky se naváží přesně asi 1,0 g zkušební vzorku.

Objem se doplní vodou po rysku a promíchá.

V případě potřeby se roztok zfiltruje.

Jodičnany se v roztoku stanoví pomocí HPLC způsobem popsaným v bodě 5.2.

5.1.2 *Pevné vzorky (mýdlo)*

Část vzorku se jemně nadrtí a do skleněného děleného válce na 100 ml se zabroušenou zátkou se přesně naváží asi 1,0 g zkušební vzorku. Doplní se vodou na 50 ml a důkladně se třepe jednu minutu. Odstředí se a zfiltruje přes filtrační papír (4.1), nebo se ponechá stát alespoň přes noc.

Rosolovitá hmota se důkladně protřepe a zfiltruje přes papírový filtr (4.1).

Jodičnany se ve filtrátu stanoví pomocí HPLC způsobem popsaným v bodě 5.2.

5.2 Chromatografie

Průtok: 1 ml/min.

Vlnová délka detektoru (4.2): 210 nm.

Objem nástřiku: 10 µl.

Měřená veličina: plocha píku.

5.3 Kalibrace

Do odměrných baněk na 50 ml se odpipetuje 1,0, 2,0, 5,0, 10,0 a 20,0 ml zásobního roztoku jodičnanu sodného (3.3). Objemy se doplní po rysku a promíchají.

Vzniklé roztoky obsahují 0,01, 0,02, 0,05, 0,1 a 0,20 mg jodičnanu sodného v 1 ml.

Do kolony se nástříkne 10 µl každého standardu a zaznamená se chromatogram. Stanoví se plochy píků jodičnanu a sestrojí se kalibrační křivka závislosti plochy píku na koncentraci jodičnanu sodného.

6. VÝPOČET

Obsah jodičnanu sodného vyjádřený v hmotnostních procentech (m/m) se vypočte ze vzorce:

$$\% \text{ (m/m) jodičnanu sodného} = \frac{Vc}{10 m}$$

kde

m = hmotnost zkušební vzorku (5.1) v gramech,

V = celkový objem roztoku vzorku získaného podle bodu 5.1 v ml,

c = koncentrace jodičnanu sodného v mg/ml odečtená z kalibrační křivky (5.3).

7. OPAKOVATELNOST⁽³⁾

Pro výrobky obsahující asi 0,1 % (m/m) jodičnanu sodného nesmí rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení na stejném vzorku překročit absolutní hodnotu 0,002 %.

8. POTVRZENÍ

8.1 Princip

V okyseleném roztoku kosmetického prostředku se jodičnany (IO_3^-) redukují na jodidy (I^-) siřičitanem a výsledný roztok se analyzuje vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií. Jestliže pík s retenčním časem odpovídajícím retenčnímu času jodičnanu po reakci se siřičitanem zmizí, jednalo se s největší pravděpodobností o pík jodičnanů.

8.2 Postup

Do Erlenmeyerovy baňky se odpipetuje 5 ml roztoku vzorku připraveného podle bodu 5.1.

pH roztoku se upraví kyselinou chlorovodíkovou (3.1) na hodnotu 3 nebo nižší; použije se univerzální indikátorový papírek (3.7).

Přidají se tři kapky roztoku siřičitanu sodného (3.2) a roztok se zamíchá.

10 μl roztoku se nastříkne do kolony kapalinového chromatografu (4.2).

Výsledný chromatogram se porovná s chromatogramem zaznamenaným pro stejný vzorek podle oddílu 5.

KVALITATIVNÍ A KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ DUSIČNANU STŘÍBRNÉHO V KOSMETICKÝCH PROSTŘEDCÍCH

(Směrnice komise 93/73/EHS z 9. září 1993)

A. KVALITATIVNÍ STANOVENÍ

1. ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ

V této metodě je popsáno kvalitativní stanovení dusičnanu stříbrného vyjádřeného jako stříbro v kosmetických prostředcích na bázi vody.

³ Viz ČSN ISO 5725

2. PRINCIP

Kvalitativní stanovení stříbra se provede prostřednictvím charakteristické bílé sraženiny s chloridovými ionty.
3. REAKČNÍ ČINIDLA

Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a.

 - 3.1 Roztok kyseliny chlorovodíkové, 2M
 - 3.2 Vodný roztok hydroxidu amonného: koncentrovaný roztok hydroxidu amonného ($d_4^{20} = 0,88 \text{ g/ml}$) se zředí stejným množstvím vody a promíchá.
 - 3.3 Roztok kyseliny dusičné, 2M
4. PŘÍSTROJE A POMŮCKY
 - 4.1 Obvyklé laboratorní vybavení
 - 4.2 Odstředivka
5. POSTUP
 - 5.1 K přibližně 1 g vzorku v centrifugační kyvetě se přidává po kapkách 2M kyselina chlorovodíková (3.1), dokud nedojde k úplnému vysrážení; promíchá se a odstředí.
 - 5.2 Supernatant se odstraní a sraženina se promyje dalšími pěti kapkami studené vody. Promývací kapalina se odstraní.
 - 5.3 Do centrifugační kyvety se ke sraženině přidá stejný objem vody. Za stálého míchání se zahřeje k varu.
 - 5.4 Za horka se odstředí; supernatant se odstraní.
 - 5.5 Ke sraženině se přidá několik kapek roztok amoniaku (3.2); promíchá se a odstředí.
 - 5.6 K jedné kapce kapaliny nad sraženinou se na podložní sklíčko přidá několik kapek 2M kyseliny dusičné (3.3).
 - 5.7 Bílá sraženina je důkazem přítomnosti stříbra.

B. KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ

1. ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ

Tato metoda je vhodná pro stanovení obsahu dusičnanu stříbrného, vyjádřeného jako stříbro v kosmetických prostředcích určených k barvení řas a obočí.
2. PRINCIP

Stříbro se ve výrobku stanoví atomovou absorpční spektrometrií.
3. REAKČNÍ ČINIDLA

Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a.

 - 3.1 Kyselina dusičná, 0,02M roztok
 - 3.2 Standardní roztoky stříbra
 - 3.2.1 Zásobní standardní roztok stříbra, 1 000 $\mu\text{g/ml}$ v roztoku 0,5M kyseliny dusičné („SpectrosoL“ nebo ekvivalentní)
 - 3.2.2 Standardní roztok stříbra, 100 $\mu\text{g/ml}$: 10 ml zásobního standardního roztoku stříbra (3.2.1) se odpipetuje do odměrné baňky na 100 ml. Doplní se po rysku roztokem

0,02M kyseliny dusičné a promíchá se. Tento standardní roztok se připravuje čerstvý a skladuje se ve skleněné lahvi z tmavého skla.

4. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

4.1 Obvyklé laboratorní vybavení

4.2 Atomový absorpční spektrometr vybavený stříbrnou výbojkou s dutou katodou.

5. POSTUP

5.1 Příprava vzorku

Přesně se odváží asi 0,1 g (m gramů) homogenního vzorku výrobku. Toto množství se převede do odměrné baňky na jeden litr, doplní se po rysku 0,02 M roztokem kyseliny dusičné (3.1) a promíchá se.

5.2 Podmínky pro atomovou absorpční spektrometrii

Plamen: vzduch-acetylen

Vlnová délka: 338,3 nm

Korekce pozadí: ano

Požadavky na palivo: chudé; pro maximální absorpenci je nutná optimalizace výšky hořáku a palivových podmínek.

5.3 Kalibrace

5.3.1 Do série odměrných baněk na 100 ml se odpipetuje 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 a 5,0 ml standardního roztoku stříbra (3.2.2). Jednotlivé baňky se doplní po rysku 0,02M roztokem kyseliny dusičné (3.1) a obsah se promíchá. Tyto roztoky obsahují 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 a 5,0 µg stříbra na mililitr.

5.3.2 Změří se absorbance 0,02M roztoku kyseliny dusičné (3.1) a takto získaná hodnota se použije jako nulová koncentrace stříbra pro kalibrační křivku. Změří se absorbance každého standardního roztoku stříbra (5.3.1). Sestrojí se kalibrační křivka vynesím závislosti hodnot absorbance na koncentraci stříbra.

5.4 Kvantitativní stanovení

Změří se absorbance roztoku vzorku (5.1). Z kalibrační křivky se odečte koncentrace stříbra odpovídající hodnotě absorbance naměřené pro roztok vzorku.

6. VÝPOČET

Obsah dusičnanu stříbrného ve vzorku vyjádřený v hmotnostních procentech (% m/m) se vypočte podle vzorce

$$\% \text{ (m/m) dusičnanu stříbrného} = \frac{1,5748 \times c}{10 \times m}$$

kde

m = hmotnost analyzovaného vzorku (5.1) v gramech,

c = koncentrace stříbra v roztoku vzorku (5.1) odečtená z kalibrační křivky v µg/ml.

7. OPAKOVATELNOST⁽³⁾

Pro výrobky obsahující asi 4 % (m/m) dusičnanu stříbrného nesmí rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení na stejném vzorku překročit absolutní hodnotu 0,05 %.

³ Viz ČSN ISO 5725

KVALITATIVNÍ A KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ OBSAHU SULFIDU SELENIČITÉHO V ŠAMPONECH PROTI LUPŮM

(Směrnice komise 93/73/EHS z 9. září 1993)

A. KVALITATIVNÍ STANOVENÍ

1. ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ

V této metodě je popsáno kvalitativní stanovení sulfidu seleničitého jako selenu v šamponech proti lupům.

2. PRINCIP

Kvalitativní stanovení selenu se provede prostřednictvím charakteristického žlutého až oranžového zbarvení při reakci s močovinou a jodidem draselným.

3. REAKČNÍ ČINIDLA

Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a.

3.1 Kyselina dusičná, koncentrovaná ($d_4^{20} = 1,42$ g/ml)

3.2 Močovina

3.3 Jodid draselný, 10% (m/V) roztok: 10 g jodidu draselného se rozpustí ve 100 ml vody.

4. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

4.1 Obvyklé laboratorní vybavení

4.2 Digesční (vyluhovací) baňka na 100 ml

4.3 Digesční zařízení s vyhřívacím blokem

4.4 Filtrační papír (Whatman č. 42 nebo ekvivalentní) nebo membránový filtr (velikost pórů 0,45 μ m)

5. POSTUP

5.1 K přibližně 1 g šamponu ve vyluhovací baňce (4.2) se přidá 2,5 ml koncentrované kyseliny dusičné (3.1) a vaří se v digesčním zařízení s vyhřívacím blokem (4.3) při 150 °C po dobu 30 minut.

5.2 Vyloužený vzorek se zředí vodou na objem 25 ml, zfiltruje se přes filtrační papír nebo přes membránový filtr (0,45 μ m) (4.4).

5.3 K 2,5 ml filtrátu se přidá 5 ml vody, 2,5 g močoviny (3.2) a vaří se. Ochladí se a přidá se 1 ml roztoku jodidu draselného (3.3).

5.4 Žluté až oranžové zbarvení, které stáním rychle tmavne, je důkazem přítomnosti selenu.

B. KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ

1. ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ

Tato metoda je vhodná pro kvantitativní stanovení sulfidu seleničitého jako selenu v šamponech proti lupům, obsahujících nejvýše 4,5 % (m/m) sulfidu seleničitého.

2. PRINCIP

Vzorek se vyluhuje kyselinou dusičnou a selen se ve výsledném výluhu stanoví atomovou absorpční spektrometrií.

3. REAKČNÍ ČINIDLA

Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a.

- 3.1 Kyselina dusičná, koncentrovaná ($d_4^{20} = 1,42$ g/ml)
- 3.2 Kyselina dusičná, 5% (V/V) roztok: do 500 ml vody se v kádince za stálého míchání přidá 50 ml koncentrované kyseliny dusičné (3.1). Tento roztok se převede do jednolitrové odměrné baňky a doplní po rysku vodou.
- 3.3 Zásobní standardní roztok selenu, 1 000 $\mu\text{g/ml}$ v 0,5M roztoku kyseliny dusičné („SpectrosoL“ nebo ekvivalentní)

4. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

- 4.1 Obvyklé laboratorní vybavení
- 4.2 Digesční (vyluhovací) baňka na 100 ml
- 4.3 Digesční zařízení s vyhřívacím blokem
- 4.4 Filtrační papír (Whatman č. 42 nebo ekvivalentní) nebo membránový filtr 0,45 μm
- 4.5 Atomový absorpční spektrofotometr vybavený selenovou výbojkou s dutou katodou

5. POSTUP

5.1 Příprava vzorku

- 5.1.1 Do vyluhovací baňky (4.2) se přesně naváží asi 0,2 g (m gramů) homogenního vzorku šamponu.
- 5.1.2 Přidá se 5 ml koncentrované kyseliny dusičné (3.1) a nechá se jednu hodinu vyluhovat v digesčním zařízení s vyhřívacím blokem (4.3) při 150 °C.
- 5.1.3 Roztok se nechá vychladnout a zředí se vodou na 100 ml. Zfiltruje se přes filtrační papír nebo membránový filtr (0,45 μm) (4.4) a zfiltrovaný roztok se uschová pro kvantitativní stanovení.

5.2 Podmínky pro atomovou absorpční spektrometrii

Plamen: vzduch-acetylen

Vlnová délka: 196,0 nm

Korekce pozadí: ano

Podmínka paliva: chudé; pro maximální absorpční je nutná optimalizace výšky hořáku a palivových podmínek.

5.3 Kalibrace

- 5.3.1 Do série odměrných baněk na 100 ml se odpipetuje 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 a 5,0 ml zásobního standardního roztoku selenu (3.2.2). Jednotlivé baňky se doplní po rysku 5% (m/m) roztokem kyseliny dusičné (3.1) a obsah se promíchá. Tyto roztoky obsahují 10, 20, 30, 40 a 50 μg selenu na mililitr.
- 5.3.2 Změří se absorbance 5% roztoku kyseliny dusičné (3.1) a takto získaná hodnota se použije jako nulová koncentrace selenu pro kalibrační křivku. Změří se absorbance každého standardního roztoku selenu (5.3.1). Sestrojí se kalibrační křivka vynesáním závislosti hodnot absorbance na koncentraci selenu.

5.4 Kvantitativní stanovení

Změří se absorbance roztoku vzorku (5.1.3). Z kalibrační křivky se odečte koncentrace selenu odpovídající hodnotě absorbance naměřené pro roztok vzorku.

6. VÝPOČET

Obsah sulfidu seleničitého ve vzorku v hmotnostních procentech (% m/m) se vypočte podle vzorce:

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

kde

m = hmotnost analyzovaného vzorku (5.1) v gramech,

c = koncentrace selenu v roztoku vzorku (5.1.3) odečtená z kalibrační křivky v µg/ml.

7. OPAKOVATELNOST⁽³⁾

Pro výrobky obsahující asi 1 % (m/m) sulfidu seleničitého nesmí rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení na stejném vzorku překročit absolutní hodnotu 0,05 %.

KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ ROZPUSTNÉHO BARYA A STRONCIA V PIGMENTECH VE FORMĚ SOLÍ NEBO KOMPLEXŮ

(Směrnice komise 93/73/EHS z 9. září 1993)

A. KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ ROZPUSTNÉHO BARYA

1. ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ

V této metodě je popsán postup extrakce a kvantitativního stanovení rozpustného barya z pigmentů ve formě solí nebo komplexů.

2. PRINCIP

Pigment se extrahuje 0,07M roztokem kyseliny chlorovodíkové za definovaných podmínek a množství barya v extraktu se stanoví atomovou absorpční spektrometrií.

3. REAKČNÍ ČINIDLA

Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a.

3.1 Etanol, absolutní

3.2 Kyselina chlorovodíková, 0,07M roztok

3.3 Kyselina chlorovodíková, 0,5M roztok

3.4 Chlorid draselný, 8% (m/V) roztok: 16 g chloridu draselného se rozpustí ve 200 ml 0,07M roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.2).

3.5 Standardní roztoky barya

3.5.1 Zásobní standardní roztok barya, 1 000 µg/ml v 0,5M roztoku kyseliny dusičné („SpectrosoL“ nebo ekvivalentní)

3.5.2 Standardní roztok barya, 200 µg/ml: 20,0 ml zásobního standardního roztoku barya (3.5.1) se odpipetuje do odměrné baňky na 100 ml. Doplní se po rysku 0,07M roztokem kyseliny dusičné (3.2) a promíchá.

³ Viz ČSN ISO 5725.

4. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

4.1 Obvyklé laboratorní vybavení

4.2 pH-metr s přesností $\pm 0,02$

4.3 Třepačka s krouživým pohybem

4.4 Membránový filtr s velikostí pórů $0,45 \mu\text{m}$

4.5 Atomový absorpční spektrofotometr vybavený baryovou výbojkou s dutou katodou

5. POSTUP

5.1 Příprava vzorku

5.1. Do Erlenmeyerovy baňky se přesně odváží asi 0,5 g pigmentu (m gramů). Pro účinné promíchání je vhodné použít baňku o minimálním objemu 150 ml.

5.1.2 Pipetou se přidá 1,0 ml ethanolu (3.1) a baňkou se krouží tak, aby se pigment důkladně smočil. Z byrety se přidá přesně takové množství 0,07 M roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.2), které je nezbytné k tomu, aby byl dosažen poměr objemu kyseliny k hmotnosti pigmentu přesně 50 mililitrů na gram. Celkový objem extraktu včetně ethanolu se označí "V ml". Pro dosažení důkladného promíchání se obsahem baňky 5 sekund krouží.

5.1.3 pH-metrem (4.2) se změří pH výsledné suspenze a je-li nad hodnotu 1,5, přidá se po kapkách 0,5M roztok kyseliny chlorovodíkové (3.3), dokud se nedosáhne hodnoty 1,4 až 1,5.

5.1.4 Baňka se zazátkuje a ihned se 60 minut třepe v třepačce s krouživým pohybem (4.3). Třepačka musí mít dostatečnou rychlost, aby vznikla pěna. Zfiltruje se přes membránový filtr $0,45 \mu\text{m}$ (4.4) a filtrát se jímá. Extrakt se nesmí odstředit před zfiltrováním. 5,0 ml filtrátu se odpipetuje do odměrné baňky na 50 ml; doplní se po rysku 0,07M kyselinou chlorovodíkovou (3.2) a promíchá. Tento roztok se také používá ke stanovení obsahu stroncia (část B).

5.1.5 Do odměrné baňky na 100 ml se odpipetuje 5,0 ml roztoku chloridu draselného (3.4) a alikvotní podíl (" W_{Ba} ml") zředěného filtrátu (5.1.4), tak aby očekávaná koncentrace byla 3 až 10 μg barya na mililitr. (Alikvotní podíl 10 ml by měl být vhodným výchozím množstvím.) Doplní se po rysku 0,07M roztokem kyseliny chlorovodíkové (3.2) a promíchá se.

5.1.6 Koncentrace barya v roztoku (5.1.5) se stanoví atomovou absorpční spektrometrií tentýž den.

5.2 Podmínky pro atomovou absorpční spektrometrii

Plamen: oxid dusný-acetylen

Vlnová délka: 553,5 nm

Korekce pozadí: ne

Podmínka paliva: chudé; pro maximální absorpční je nutná optimalizace výšky hořáku a palivových podmínek.

5.3 Kalibrace

5.3.1 Do série odměrných baněk na 100 ml se odpipetuje 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 a 5,0 ml standardního roztoku barya (3.5.2). Do každé baňky se odpipetuje 5,0 ml roztoku chloridu draselného (3.4). Doplní se po rysku 0,07M roztokem kyseliny chlorovodíkové (3.2) a obsah se promíchá. Tyto roztoky obsahují 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 a 10,0 μg barya na mililitr.

Obdobně se provede slepý pokus s tím, že se vynechá standardní roztok barya.

- 5.3.2 Změří se absorbance slepého pokusu (5.3.1) a takto získaná hodnota se použije jako nulová koncentrace barya pro kalibrační křivku. Změří se absorbance každého standardního roztoku barya (5.3.1). Sestrojí se kalibrační křivka vynesením závislosti hodnot absorbance na koncentraci barya.

5.4 Stanovení

Změří se absorbance roztoku vzorku (5.1.5). Z kalibrační křivky se odečte koncentrace barya odpovídající hodnotě absorbance naměřené pro roztok vzorku.

6. VÝPOČET

Obsah rozpustného barya (% m/m) v pigmentu se vypočítá podle vzorce

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

kde

m = hmotnost analyzovaného vzorku (5.1.1) v gramech,

c = koncentrace barya v roztoku vzorku (5.1.5) odečtená z kalibrační křivky v $\mu\text{g/ml}$,

V = celkový objem extraktu (5.1.2) v ml,

W_{Ba} = objem extraktu odebraného podle bodu 5.1.5 v ml.

7. OPAKOVATELNOST⁽³⁾

Pro výrobky obsahující asi 2 % (m/m) rozpustného barya je pro tuto metodu nejlepším odhadem opakovatelnosti 0,3 %.

8. POZNÁMKY

- 8.1 Za určitých podmínek může být absorbance barya zvýšena přítomností vápníku. Tomu lze zabránit přidáním iontů hořčíku v koncentraci 5 g/l⁽⁷⁾.
- 8.2 Použití metody spektrometrie s indukčně vázanou plazmou – optická emisní spektrometrie je povoleno jako alternativa plamenové atomové absorpční spektrometrie.

B. KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ ROZPUSTNÉHO STRONCIA

1. ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ

V této metodě je popsán postup extrakce a kvantitativního stanovení rozpustného stroncia z pigmentů ve formě solí nebo komplexů.

2. PRINCIP

Pigment se extrahuje 0,07M roztokem kyseliny chlorovodíkové za definovaných podmínek a množství stroncia v extraktu se stanoví atomovou absorpční spektrometrií.

3. REAKČNÍ ČINIDLA

Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a.

³ Viz ČSN ISO 5725

⁷ „Magnesium as modifier for the determination of barium by flame atomic emission spectrometry“. Jerrow, M. et al., Analytical Proceedings, 1991, 28, 40.

- 3.1 Ethanol, absolutní
- 3.2 Kyselina chlorovodíková, 0,07M roztok
- 3.3 Chlorid draselný, 8% (m/V) roztok: 16 g chloridu draselného se rozpustí ve 200 ml 0,07M roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.2).
- 3.4 Standardní roztoky stroncia
- 3.5.1 Zásobní standardní roztok stroncia, 1 000 µg/ml v 0,5M roztoku kyseliny dusičné („SpectrosoL“ nebo ekvivalentní)
- 3.5.2 Standardní roztok stroncia, 100 µg/ml: 10,0 ml zásobního standardního roztoku barya (3.4.1) se odpipetuje do odměrné baňky na 100 ml. Doplní se po rysku 0,07M roztokem kyseliny dusičné (3.2) a promíchá.

4. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

- 4.1 Obvyklé laboratorní vybavení
- 4.2 Membránový filtr s velikostí pórů 0,45 µm
- 4.3 Atomový absorpční spektrofotometr vybavený stronciovou výbojkou s dutou katodou

5. POSTUP

5.1 Příprava vzorku

Pro kvantitativní stanovení rozpustného stroncia se použije roztok připravený v oddíle A 5.1.4.

- 5.1.1 Do odměrné baňky na 100 ml se odpipetuje 5,0 ml roztoku chloridu draselného (3.3) a alikvotní podíl ("W_{Sr} ml") zředěného filtrátu (A 5.1.4), aby byla předpokládaná koncentrace stroncia 2 až 5 µg/ml. (Alikvotní podíl 10 ml by měl být vhodným výchozím množstvím.) Doplní se po rysku 0,07 M roztokem kyseliny chlorovodíkové (3.2) a promíchá.
- 5.1.2 Koncentrace stroncia v roztoku (5.1.1) se stanoví atomovou absorpční spektrometrií tentýž den.

5.2 Podmínky pro atomovou absorpční spektrometrii

Plamen: oxid dusný-acetylen

Vlnová délka: 460,7 nm

Korekce pozadí: ne

Podmínka paliva: chudé; pro maximální absorpční je nutná optimalizace výšky hořáku a palivových podmínek.

5.3 Kalibrace

- 5.3.1 Do série odměrných baněk na 100 ml se odpipetuje 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 a 5,0 ml standardního roztoku stroncia (3.4.2). Do každé baňky se odpipetuje 5,0 ml roztoku chloridu draselného (3.3). Doplní se po rysku 0,07M roztokem kyseliny chlorovodíkové (3.2) a obsah se promíchá. Tyto roztoky obsahují 1,0, 2,0, 4,0 a 5,0 µg stroncia na mililitr.

Obdobně se provede slepý pokus s tím, že se vynechá standardní roztok stroncia.

- 5.3.2 Změří se absorbance slepého pokusu (5.3.1) a takto získaná hodnota se použije jako nulová koncentrace stroncia pro kalibrační křivku. Změří se absorbance každého kalibračního standardu stroncia (5.3.1). Sestrojí se kalibrační křivka vynesemím závislosti hodnot absorbance na koncentraci stroncia.

5.4 Stanovení

Změří se absorbance roztoku vzorku (5.1.1). Z kalibrační křivky se odečte koncentrace stroncia odpovídající hodnotě absorbance naměřené pro roztok vzorku.

6. VÝPOČET

Obsah rozpustného stroncia (% m/m) v pigmentu se vypočítá podle vzorce

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

kde

m = hmotnost analyzovaného vzorku (A 5.1.1) v gramech,

c = koncentrace stroncia v roztoku vzorku (5.1.1) odečtená z kalibrační křivky v $\mu\text{g/ml}$,

V = celkový objem extraktu (A 5.1.2) v ml,

W_{Sr} = objem extraktu odebraného podle bodu 5.1.1 v ml.

7. OPAKOVATELNOST⁽³⁾

Pro výrobky obsahující asi 0,6 % (m/m) rozpustného barya je pro tuto metodu nejlepším odhadem opakovatelnosti 0,09 %.

8. POZNÁMKA

Použití metody spektrometrie s indukčně vázanou plazmou – optická emisní spektrometrie je povoleno jako alternativa plamenové atomové absorpční spektrometrie.

KVALITATIVNÍ A KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ BENZYLALKOHOLU

(Směrnice komise 93/73/EHS z 9. září 1993)

A. KVALITATIVNÍ STANOVENÍ

1. ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ

V této metodě je popsáno kvalitativní stanovení benzylalkoholu v kosmetických prostředcích.

2. PRINCIP

Kvalitativní stanovení benzylalkoholu se provede chromatografií na tenké vrstvě na silikagelu.

3. REAKČNÍ ČINIDLA

Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a.

3.1 Benzylalkohol

3.2 Chloroform

³ Viz ČSN ISO 5725

- 3.3 Ethanol, absolutní
- 3.4 n-Pentan
- 3.5 Vyvíjecí rozpouštědlo: diethylether
- 3.6 Standardní roztok benzylalkoholu: Do odměrné baňky na 100 ml se naváží 0,1 g benzylalkoholu (3.1), doplní po rysku ethanolem (3.3) a promíchá.
- 3.7 Desky pro chromatografii na tenké vrstvě, skleněné, 100 × 200 mm nebo 200 × 200 mm, s nanesenou vrstvou silikagelu 60 F₂₅₄ o tloušťce 0,25 mm.
- 3.8 Detekční činidlo: kyselina 12-molybdofosforečná, 10% (m/V) roztok v ethanolu (3.3).

4. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

- 4.1 Obvyklé vybavení pro chromatografii na tenké vrstvě
- 4.2 Chromatografická komora se dvěma žlábků, vnější rozměry přibližně 80 mm × 230 mm × 240 mm
- 4.3 Chromatografický papír: Whatman nebo ekvivalentní
- 4.4 UV lampa, vlnová délka 254 nm.

5. POSTUP

5.1 Příprava vzorku

Do odměrné baňky na 10 ml se naváží 1,0 g prostředku, který má být analyzován. Přidají se 3 ml chloroformu (3.2) a důkladně se třepe, dokud se prostředek nerozptýlí. Doplní se po rysku ethanolem (3.3) a důkladně třepe až do vzniku čirého nebo téměř čirého roztoku.

5.2 Chromatografie na tenké vrstvě

- 5.2.1 Chromatografická komora se nasatí (4.2) n-pentanem takto: strana komory sousedící se zadním žlábkem se vyloží chromatografickým papírem (4.3) tak, aby byl dolní okraj papíru ve žlábků. Zadní žlábek se naplní 25 ml n-pentanu (3.4) přelitím tohoto roztoku po povrchu chromatografického papíru. Okamžitě se nasadí víko a ponechá se stát 15 minut.
- 5.2.2 Do vhodných bodů na startovací linii chromatografické desky pro chromatografii na tenké vrstvě se nanese 10 μl roztoku vzorku (5.1) a 10 μl standardního roztoku benzylalkoholu (3.6). Nechá se vyschnout.
- 5.2.3 Do předního žlábků komory se odpipetuje 10 ml diethyletheru (3.5) a poté se do stejného žlábků ihned umístí deska (5.2.2). Opět se rychle nasadí víko komory a deska se vyvíjí do výšky 150 mm. Deska se vyjme z chromatografické komory a nechá se schnout při pokojové teplotě.
- 5.2.4 Deska (5.2.3) se pozoruje pod ultrafialovým světlem a označí se poloha fialových skvrn. Deska se postříká detekčním činidlem (3.8) a poté se zahřeje 15 minut při 120 °C. Benzylalkohol se jeví jako tmavě modrá skvrna.
- 5.2.5 Vypočte se hodnota R_f získaná pomocí standardního roztoku benzylalkoholu. Tmavě modrá skvrna se stejnou hodnotou R_f získaná z roztoku vzorku indikuje přítomnost benzylalkoholu.

Mez detekce: 0,1 μg benzylalkoholu.

B. KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ

1. ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ

V této metodě je popsáno kvantitativní stanovení obsahu benzylalkoholu v kosmetických prostředcích.

2. DEFINICE

Množství benzylalkoholu stanovené touto metodou se vyjádří v hmotnostních procentech (% m/m).

3. PRINCIP

Vzorek se extrahuje methanolem a množství benzylalkoholu v extraktu se stanoví vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC).

4. REAKČNÍ ČINIDLA

Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a. a podle potřeby musí být vhodná pro HPLC.

4.1 Methanol

4.2 4-Ethoxyfenol

4.3 Benzylalkohol

4.4 Mobilní fáze: methanol (4.1)/voda (45:55; V/V)

4.5 Zásobní roztok benzylalkoholu: do odměrné baňky na 100 ml se přesně naváží asi 0,1 g benzylalkoholu (4.3). Doplní se po rysku methanolem (4.1) a promíchá.

4.6 Zásobní roztok vnitřního standardu: do odměrné baňky na 100 ml se přesně naváží asi 0,1 g 4-ethoxyfenolu (4.2). Doplní se po rysku methanolem (4.1) a promíchá.

4.7 Standardní roztoky: Do série odměrných baněk na 25 ml se odpipetuje zásobní roztok benzylalkoholu (4.5) a zásobní roztok vnitřního standardu (4.6) podle níže uvedené tabulky. Doplní se po rysku methanolem (4.1) a promíchá.

Standardní roztok	Koncentrace benzylalkoholu		Koncentrace 4-ethoxyfenolu	
	počet přidaných ml (4.5)	µg/ml (*)	počet přidaných ml (4.6)	µg/ml (*)
I	0,5	20	2,0	80
II	1,0	40	2,0	80
III	2,0	80	2,0	80
IV	3,0	120	2,0	80
V	4,0	200	2,0	80

(*) Tyto hodnoty jsou uvedeny jako ukazatele a odpovídají koncentracím standardních roztoků připravených z roztoků benzylalkoholu (4.5) a 4-ethoxyfenolu (4.6), které obsahují přesně 0,1 % (m/V) benzylalkoholu a přesně 0,1 % (m/V) 4-ethoxyfenolu.

5. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

5.1 Obvyklé laboratorní vybavení

- 5.2 Zařízení pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii s UV detektorem s nastavitelnou vlnovou délkou a s nastříkovací smyčkou o objemu 10 μ l
- 5.3 Analytická kolona: kolona z nerezové oceli: 250 mm \times 4,6 mm s náplní Spherisorb ODS o velikosti částic 5 μ m nebo s ekvivalentní náplní.
- 5.4 Vodní lázeň
- 5.5 Ultrazvuková lázeň
- 5.6 Odstředivka
- 5.7 Centrifugační kyvety na 15 ml
6. POSTUP
- 6.1 **Příprava vzorku**
- 6.1.1 Do centrifugační kyvety (5.7) se přesně naváží asi 0,1 g (m gramů) vzorku a přidá se 5 ml methanolu (4.1).
- 6.1.2 Zahřívá se po dobu 10 minut na vodní lázni (5.4) nastavené na teplotu 50 °C a poté se vloží do ultrazvukové lázně (5.5), kde se ponechá do důkladného rozptýlení vzorku.
- 6.1.3 Ochladí se a poté se odstředí 5 minut při 3 500 ot./min.
- 6.1.4 Supernatant se převede do odměrné baňky na 25 ml.
- 6.1.5 Zbytek vzorku se extrahuje dalšími 5 ml methanolu (4.1). Extrakty se sloučí v odměrné baňce na 25 ml.
- 6.1.6 Do odměrné baňky na 25 ml se odpipetují 2,0 ml zásobního roztoku vnitřního standardu (4.6). Doplní se po rysku methanolem (4.1) a promíchá se. Tento roztok se použije pro chromatografii popsanou v bodě 6.4.
- 6.2 **Chromatografie**
- 6.2.1 Obvyklým způsobem se sestaví zařízení pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (5.2). Průtoková rychlost mobilní fáze (4.4) se nastaví na 2,0 ml za minutu.
- 6.2.2 Vlnová délka UV detektoru (5.2) se nastaví na 210 nm.
- 6.3 **Kalibrace**
- 6.3.1 Nastříkne se po 10 μ l každého ze standardních roztoků benzylalkoholu (4.7) a změří se plocha píků benzylalkoholu a 4-ethoxyfenolu.
- 6.3.2 Pro každý standardní roztok benzylalkoholu (4.7) se vypočte poměr plochy píku benzylalkoholu a 4-ethoxyfenolu. Kalibrační křivka se sestrojí vnesením těchto poměrů na osu y a odpovídajících koncentrací benzylalkoholu v μ g/ml na osu x .
- 6.4 **Kvantitativní stanovení**
- 6.4.1 Na kolonu se nastříkne se 10 μ l roztoku vzorku (6.1.6) a změří se plochy píků benzylalkoholu a 4-ethoxyfenolu. Vypočítá se poměr ploch píků benzylalkoholu a 4-ethoxyfenolu. Tento postup se opakuje s dalšími alikvotními podíly po 10 μ l roztoku vzorku, dokud se nezískají shodné výsledky.
- 6.4.2 Z kalibrační křivky (6.3.2) se odečte koncentrace benzylalkoholu odpovídající poměru ploch píků benzylalkoholu a 4-ethoxyfenolu.
7. VÝPOČET
- Obsah benzylalkoholu ve vzorku v hmotnostních procentech se vypočítá podle vzorce:

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

kde

m = hmotnost analyzovaného vzorku (6.1.1) v gramech,

c = koncentrace benzylalkoholu v roztoku vzorku (6.1.1) v µg/ml, odečtená z kalibrační křivky.

7. OPAKOVATELNOST⁽³⁾

Pro výrobky obsahující asi 1 % (m/m) benzylalkoholu nesmí rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení na stejném vzorku překročit absolutní hodnotu 0,10 %.

KVALITATIVNÍ STANOVENÍ ZIRKONIA A KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ ZIRKONIA, HLINÍKU A CHLORU V NEAEROSOLOVÝCH ANTIPERSPIRANTECH

(Směrnice komise 93/73/EHS z 9. září 1993)

Tato metoda má pět stádií:

- A. Kvalitativní stanovení zirkonia
- B. Kvantitativní stanovení zirkonia
- C. Kvantitativní stanovení hliníku
- D. Kvantitativní stanovení chloru
- E. Výpočet poměru obsahu atomů hliníku k obsahu atomů zirkonia a výpočet poměru obsahu atomů hliníku a zirkonia k obsahu atomů chloru.

A. KVALITATIVNÍ STANOVENÍ ZIRKONIA

1. ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ

V této metodě je popsáno kvalitativní stanovení zirkonia v neaerosolových antiperspirantech. Nejsou popsány metody vhodné pro kvalitativní stanovení chloro(hydroxo)komplexů hliníku a zirkonia $Al_xZr(OH)_yCl_z$.

2. PRINCIP

Kvalitativní stanovení zirkonia se provede prostřednictvím tvorby charakteristické červenofialové sraženiny při reakci s alizarinovou červení S v silně kyselém prostředí.

3. REAKČNÍ ČINIDLA

Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a.

3.1 Kyselina chlorovodíková, koncentrovaná ($d_4^{20} = 1,18 \text{ g/ml}$)

3.2 Roztok alizarinové červeně S (CI 58005: 2 % (m/V) alizarinsulfonátu sodného ve vodě)

³ Viz ČSN ISO 5725

4. PŘÍSTROJE A POMŮCKY
- 4.1 Běžné laboratorní vybavení
5. POSTUP
- 5.1 K přibližně 1 g vzorku ve zkumavce se přidají 2 ml vody. Zazátkuje se a protřepe.
- 5.2 Přidají se tři kapky roztoku alizarinové červeně S (3.2) a poté 2 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové (3.1). Zazátkuje se a protřepe.
- 5.3 Nechá se přibližně dvě minuty stát.
- 5.4 Červenofialové zabarvení supernatantu a sraženiny znamená přítomnost zirkonia.

B. KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ ZIRKONIA

1. ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ
Tato metoda je vhodná pro kvantitativní stanovení zirkonia v chloro(hydroxo)komplexech hliníku a zirkonia až do maximální koncentrace zirkonia 5,4 (m/m) v neaerosolových antiperspirantech.
2. PRINCIP
Zirkonium se extrahuje z prostředku v kyselém prostředí a kvantitativní stanovení se provede plamenovou atomovou absorpční spektrometrií.
3. REAKČNÍ ČINIDLA
Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a.
- 3.1 Kyselina chlorovodíková, koncentrovaná ($d_4^{20} = 1,18$ g/ml)
- 3.2 Roztok kyseliny chlorovodíkové, 10% (V/V): k 500 ml vody v kádince se za stálého míchání přidá 100 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové (3.1). Tento roztok se převede do odměrné baňky na 1 litr a doplní se po rysku vodou.
- 3.3 Zásobní standardní roztok zirkonia, 1000 $\mu\text{g/ml}$ v 0,5M roztoku kyseliny chlorovodíkové („SpectroSol“ nebo ekvivalentní)
- 3.4 Chlorid hlinitý (hydratovaný) $[\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$: činidlo: 22,6 g hexahydrátu chloridu hlinitého se rozpustí ve 250 ml 10% (V/V) roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.2).
- 3.5 Chlorid amonný: činidlo: 5,0 g chloridu amonného se rozpustí ve 250 ml 10% (V/V) roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.2).
4. PŘÍSTROJE A POMŮCKY
- 4.1 Obvyklé laboratorní vybavení
- 4.2 Topná deska s magnetickým míchadlem
- 4.3 Filtrační papír (Whatman č. 41 nebo ekvivalentní)
- 4.4 Atomový absorpční spektrofotometr vybavený zirkoniovou výbojkou s dutou katodou
5. POSTUP
- 5.1 **Příprava vzorku**
- 5.1.1 Do kádinky na 150 ml se přesně naváží asi 1,0 g (m gramů) homogenního vzorku prostředku. Přidá se 40 ml vody a 10 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové (3.1).

- 5.1.2 Kádinka se umístí na topnou desku s magnetickým míchadlem (4.2). Zapne se míchání a zahřeje se až k varu. Aby se zabránilo rychlému odpaření, umístí se na kádinku hodinové sklo. Vaří se 5 minut, kádinka se sejme z topné desky a ochladí se na pokojovou teplotu.
- 5.1.3 Za použití filtračního papíru (4.3) se obsah kádinky zfiltruje do odměrné baňky na 100 ml. Kádinka se dvakrát vypláchne vždy 10 ml vody a oplachová voda se po zfiltrování přidá do baňky. Doplní se po rysku vodou a promíchá se. Tento roztok se také použije ke kvantitativnímu stanovení hliníku (část C).
- 5.1.4 Do odměrné baňky na 50 ml se odpipetuje 20,00 ml roztoku vzorku (5.1.1), 5,00 ml činidla chloridu hlinitého (3.4) a 5,00 ml činidla chloridu amonného (3.5). Doplní se po rysku 10% (V/V) roztokem kyseliny chlorovodíkové a promíchá se.

5.2 Podmínky atomové absorpční spektrometrie

Plamen: oxid dusný/acetylen

Vlnová délka: 360,1 nm

Korekce pozadí: ne

Podmínka paliva: bohaté; pro maximální absorpční je nutná optimalizace výšky hořáku a palivových podmínek.

5.3 Kalibrace

- 5.3.1 Do série odměrných baněk na 50 ml se odpipetuje 5,00, 10,00, 15,00, 20,0 a 25,00 ml zásobního standardního roztoku zirkonia (3.3). Do každé odměrné baňky se odpipetuje 5,00 ml činidla chloridu hlinitého (3.4) a 5,00 ml činidla chloridu amonného (3,5). Doplní se po rysku 10% (V/V) kyselinou chlorovodíkovou (3.2) a promíchá se. Tyto roztoky obsahují 100, 200, 300, 400 a 500 µg zirkonia na mililitr.

Podobně se připraví slepý pokus, vynechá se standardní roztok zirkonia.

- 5.3.2 Změří se absorbance slepého pokusu (5.3.1) a získaná hodnota se použije jako nulová koncentrace zirkonia pro kalibrační křivku. Změří se absorbance každého kalibračního standardu zirkonia (5.3.1). Sestrojí se kalibrační křivka vynesemím závislosti hodnot absorbance na koncentraci zirkonia.

5.4 Kvantitativní stanovení

Změří se absorbance roztoku vzorku (5.1.4). Z kalibrační křivky se odečte koncentrace zirkonia odpovídající hodnotě absorbance naměřené pro roztok vzorku.

6. VÝPOČET

Obsah zirkonia ze vzorku vyjádřený v hmotnostních procentech se vypočte podle vzorce:

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

kde

m = hmotnost analyzovaného vzorku (5.1.1) v gramech,

c = koncentrace zirkonia v roztoku vzorku (5.1.4) v µg/ml, odečtená z kalibrační křivky.

7. OPAKOVATELNOST⁽³⁾

Pro výrobky obsahující asi 3 % (m/m) zirkonia nesmí rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení na stejném vzorku překročit absolutní hodnotu 0,10 %.

8. POZNÁMKA

Použití metody spektrometrie s indukčně vázanou plazmou – optická emisní spektrometrie je povoleno jako alternativa plamenové atomové absorpční spektrometrie.

C. KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ HLINÍKU

1. ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ

Tato metoda je vhodná pro kvantitativní stanovení hliníku v chloro(hydroxo)komplexech hliníku a zirkonia až do koncentrace hliníku 12 % (m/m) v neaerosolových antiperspirantech.

2. PRINCIP

Hliník se extrahuje z prostředku v kyselém prostředí a kvantitativní stanovení se provede plamenovou atomovou absorpční spektrometrií.

3. REAKČNÍ ČINIDLA

Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a.

3.1 Kyselina chlorovodíková, koncentrovaná ($d_4^{20} = 1,18$ g/ml)

3.2 Kyselina chlorovodíková, 1% (V/V) roztok: k 500 ml vody v kádince se za stálého míchání přidá 10 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové (3.1). Tento roztok se převede do odměrné baňky na 1 litr a doplní se po rysku vodou.

3.3 Zásobní standardní roztok hliníku: 1 000 µg/ml v 0,5M roztoku kyseliny dusičné („SpectrosoL“ nebo ekvivalentní)

3.4 Činidlo s chloridem draselným: 10,0 g chloridu draselného se rozpustí ve 250 ml 1 % kyseliny chlorovodíkové (3.2).

4. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

4.1 Obvyklé laboratorní vybavení

4.2 Atomový absorpční spektrofotometr vybavený hliníkovou výbojkou s dutou katodou

5. POSTUP

5.1 Příprava vzorku

Pro kvantitativní stanovení hliníku se použije roztok připravený v části B (5.1.3).

5.1.1 Do odměrné baňky na 100 ml se odpipetuje 5,00 ml roztoku vzorku (B 5.1.3) a 10,00 ml činidla s chloridem draselným (3.4). Doplní se po rysku 1% roztokem kyseliny chlorovodíkové (3.2) a promíchá se.

5.2 Podmínky atomové absorpční spektrometrie

Plamen: oxid dusný-acetylen

Vlnová délka: 309,3 nm

Korekce pozadí: ne

³ Viz ČSN ISO 5725

Podmínka paliva: bohaté; pro maximální absorpenci je nutná optimalizace výšky hořáku a palivových podmínek.

5.3 Kalibrace

5.3.1 Do série odměrných baněk na 100 ml se odpipetuje 1,00, 2,00, 3,00, 4,00 a 5,00 ml zásobního standardního roztoku hliníku (3.3). Do každé odměrné baňky se odpipetuje 10,00 ml činidla s chloridem draselným (3.4) a doplní se po rysku 1% roztokem kyseliny chlorovodíkové (3.2) a promíchá se. Tyto roztoky obsahují 10, 20, 30, 40 a 50 µg hliníku na mililitr.

Obdobně se připraví slepý pokus, vynechá se standardní roztok hliníku.

5.3.2 Změří se absorbance slepého pokusu (5.3.1) a takto získaná hodnota se použije jako nulová koncentrace hliníku pro kalibrační křivku. Změří se absorbance každého standardního roztoku hliníku. Sestrojí se kalibrační křivka vynesemím závislosti hodnot absorbance na koncentraci hliníku.

5.4 Kvantitativní stanovení

Změří se absorbance roztoku vzorku (5.1.1). Z kalibrační křivky se odečte koncentrace hliníku odpovídající hodnotě absorbance naměřené pro roztok vzorku.

6. VÝPOČET

Obsah hliníku ve vzorku vyjádřený v hmotnostních procentech se vypočte podle vzorce:

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

kde

m = hmotnost analyzovaného vzorku (B 5.1.1) v gramech,

c = koncentrace hliníku v roztoku vzorku (5.1.1) v µg/ml, odečtená z kalibrační křivky.

7. OPAKOVATELNOST⁽³⁾

Pro výrobky obsahující asi 3,5% (m/m) hliníku nesmí rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení na stejném vzorku překročit absolutní hodnotu 0,10 %.

8. POZNÁMKA

Použití metody spektrometrie s indukčně vázanou plazmou – optická emisní spektrometrie je povoleno jako alternativa plamenové atomové absorpční spektrometrie.

D. KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ CHLORU

1. ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ

Tato metoda je vhodná pro kvantitativní stanovení chloru přítomného ve formě chloridových iontů v chloro(hydroxo)komplexech hliníku a zirkonia v neaerosolových antiperspirantech.

2. PRINCIP

Obsah chloridových iontů v prostředí se stanoví potenciometrickou titrací standardním roztokem dusičnanu stříbrného.

³ Viz ČSN ISO 5725

3. REAKČNÍ ČINIDLA

Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a.

- 3.1 Kyselina dusičná, koncentrovaná ($d_4^{20} = 1,42 \text{ g/ml}$)
- 3.2 Kyselina dusičná, 5% (V/V) roztok: ke 250 ml vody v kádince se za stálého míchání přidá 25 ml koncentrované kyseliny dusičné (3.1). Tento roztok se přenese do odměrné baňky na 500 ml a doplní se po rysku vodou.
- 3.3 Aceton
- 3.4 Dusičnan stříbrný, 0,1M odměrný roztok („AnalaR“ nebo ekvivalentní)

4. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

- 4.1 Obvyklé laboratorní vybavení
- 4.2 Topná deska s magnetickým míchadlem
- 4.3 Stříbrná elektroda
- 4.4 Kalomelová referentní elektroda
- 4.5 pH-metr nebo milivoltmetr vhodný pro potenciometrickou titraci

5. POSTUP

5.1 Příprava vzorku

- 5.1.1 Do kádinky na 250 ml se přesně odváží přibližně 1,0 g (m gramů) homogenního vzorku prostředku. Přidá se 80 ml vody a 20 ml roztoku 5% kyseliny dusičné (3.2).
- 5.1.2 Kádinka se umístí na topnou desku s magnetickým míchadlem (4.2). Zapne se míchání a zahřeje se až k varu. Aby se zabránilo rychlému odpaření, umístí se na kádinku hodinové sklo. Vaří se 5 minut, kádinka se sejme z topné desky a ochladí se na pokojovou teplotu.
- 5.1.3 Přidá se 10 ml acetonu (3.3), elektrody (4.3 a 4.4) se ponoří pod hladinu roztoku a zapne se míchání. Provede se potenciometrická titrace 0,1M roztokem dusičnanu stříbrného (3.4) a sestrojí se diferenciální křivka za účelem stanovení bodu ekvivalence (V ml).

6. VÝPOČET

Obsah chloru ve vzorku, vyjádřený v hmotnostních procentech, se vypočítá podle vzorce:

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

kde

m = hmotnost analyzovaného vzorku (5.1.1) v gramech,

V = objem 0,1 M roztoku dusičnanu stříbrného v mililitrech, spotřebovaného pro titraci do bodu ekvivalence.

7. OPAKOVATELNOST⁽³⁾

Pro výrobky obsahující asi 4 % (m/m) chloru nesmí rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení na stejném vzorku překročit absolutní hodnotu 0,10 %.

³ Viz ČSN ISO 5725

E. VÝPOČET POMĚRU OBSAHU ATOMŮ HLINÍKU K OBSAHU ATOMŮ ZIRKONIA A VÝPOČET POMĚRU OBSAHU ATOMŮ HLINÍKU A ZIRKONIA K OBSAHU ATOMŮ CHLORU

1. *Výpočet poměru obsahu atomů hliníku k obsahu atomů zirkonia*

Poměr Al:Zr se vypočítá podle vzorce:

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

2. *Výpočet poměru obsahu atomů hliníku a zirkonia k obsahu atomů chloru*

Poměr (Al + Zr):Cl se vypočítá podle vzorce:

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

KVALITATIVNÍ A KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ HEXAMIDINU, DIBROMHEXAMIDINU, DIBROMPROPAMIDINU A CHLORHEXIDINU

(Směrnice komise 93/73/EHS z 9. září 1993)

1. ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ

V této metodě je popsáno kvalitativní a kvantitativní stanovení

- hexamidinu a jeho solí včetně 2-hydroxyethansulfonátu a 4-hydroxybenzoátu,
- dibromhexamidinu a jeho solí včetně 2-hydroxyethansulfonátu,
- dibrompropamidinu a jeho solí včetně 2-hydroxyethansulfonátu,
- diacetátu, diglukonátu a dihydrochloridu chlorhexidinu

v kosmetických prostředcích.

2. DEFINICE

Koncentrace hexamidinu, dibromhexamidinu, dibrompropamidinu a chlorhexidinu stanovené touto metodou se vyjádří v hmotnostních procentech (% m/m).

3. PODSTATA METODY

Kvalitativní a kvantitativní stanovení se provádí pomocí chromatografie iontových párů za použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s obrácenými fázemi s následnou detekcí UV spektrofotometrií. Hexamidin, dibromhexamidin, dibrompropamidin a chlorhexidin se kvalitativně stanovují podle svých retenčních časů v chromatografické koloně.

4. REAKČNÍ ČINIDLA

Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a. a podle potřeby musí být vhodná pro HPLC.

- 4.1 Methanol
- 4.2 Natrium-heptan-1-sulfonát monohydrát
- 4.3 Ledová kyselina octová ($d_4^{20} = 1,05$ g/ml)
- 4.4 Chlorid sodný
- 4.5 Mobilní fáze
- 4.5.1 Eluent I: 0,005M roztok natrium-heptan-1-sulfonátu monohydrátu (4.2) v methanolu (4.1) upravený ledovou kyselinou octovou (4.3) na hodnotu pH 3,5.
- 4.5.2 Eluent II: 0,005M roztok natrium-heptan-1-sulfonátu monohydrátu (4.2) ve vodě upravený ledovou kyselinou octovou (4.3) na hodnotu pH 3,5.
- Poznámka:* Je-li nutné zlepšit tvar píků, lze mobilní fáze upravit a připravit níže uvedeným způsobem:
- eluent I: 5,84 g chloridu sodného (4.4) a 1,1013 g natrium-heptan-1-sulfonátu monohydrátu (4.2) se rozpustí ve 100 ml vody. Přidá se 900 ml methanolu (4.1) a upraví se ledovou kyselinou octovou (4.3) na hodnotu pH 3,5.
 - eluent II: 5,84 g chloridu sodného (4.4) a 1,1013 g natrium-heptan-1-sulfonátu monohydrátu (4.2) se rozpustí v jednom litru vody a upraví se ledovou kyselinou octovou (4.3) na hodnotu pH 3,5.
- 4.6 Hexamidin-di(2-hydroxyethansulfonát) [$C_{20}H_{26}N_4O_2 \cdot 2C_2H_6O_4S$]
- 4.7 Dibromhexamidin-di(2-hydroxyethansulfonát) [$C_{20}H_{24}Br_2N_4O_2 \cdot 2C_2H_6O_4S$]
- 4.8 Dibrompropamidin-di(2-hydroxyethansulfonát) [$C_{17}H_{18}Br_2N_4O_2 \cdot 2C_2H_6O_4S$]
- 4.9 Chlorhexidin-diacetát [$C_{22}H_{30}Cl_2N_{10} \cdot 2C_2H_4O_2$]
- 4.10 Referenční roztoky: v eluentu I (4.5.1) se připraví 0,05% (m/V) roztoky všech čtyř konzervantů (4.6 až 4.9).
- 4.11 3,4,4'-Trichlorkarbanilid (Triclocarban - INN)
- 4.12 4,4'-Dichlor-3-(trifluormethyl)karbanilid (Halocarban - INN)
5. PŘÍSTROJE A POMŮCKY
- 5.1 Obvyklé laboratorní vybavení
- 5.2 Chromatograf pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii vybavený UV detektorem s nastavitelnou vlnovou délkou
- 5.3 Analytická dělicí kolona: kolona z nerezové oceli o délce 30 cm a vnitřním průměru 4 mm, s náplní μ -Bondapack C_{18} , 10 μ m, nebo s ekvivalentní náplní.
- 5.4 Ultrazvuková lázeň
6. KVALITATIVNÍ STANOVENÍ
- 6.1 **Příprava vzorku**
- Do odměrné baňky na 10 ml se přesně naváží asi 0,5 g vzorku a doplní se po rysku eluentem I (4.5.1). Baňka se na 10 minut vloží do ultrazvukové lázně (5.4). Roztok se zfiltruje nebo odstředí. Filtrát nebo supernatant se použije pro chromatografii.

6.2 Chromatografie

6.2.1 Gradient mobilní fáze

Čas (min)	eluent I (% V/V) (4.5.1)	eluent II (% V/V) (4.5.2)
0	50	50
15	65	35
30	65	35
45	50	50

6.2.2 Průtok mobilní fáze (6.2.1) se nastaví na 1,5 ml/min a teplota kolony se nastaví na 35 °C.

6.2.3 Vlnová délka detektoru se nastaví na 264 nm.

6.2.4 Proveďte se nástřik 10 µl každého z referenčních roztoků (4.10) a zaznamenají se jejich chromatogramy.

6.2.5 Proveďte se nástřik 10 µl roztoku vzorku (6.1) a zaznamená se jeho chromatogram.

6.3 Důkaz přítomnosti hexamidinu, dibromhexamidinu, dibrompropamidinu nebo chlorhexidinu se provede porovnáním retenčních časů píků zaznamenaných v bodě 6.2.5 s píky získanými pro referenční roztoky v bodě 6.2.4.

7. KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ

7.1 Příprava standardních roztoků

Jako vnitřní standard se použije jeden z konzervantů (4.6 až 4.9), který není ve vzorku přítomen. Není-li to možné, může být použit Triclocarban (4.11) nebo Halocarban (4.12).

7.1.1 Zásobní roztok konzervantu, jehož přítomnost je prokázána v bodě 6.3, 0,05% (m/V) v eluentu I (4.5.1).

7.1.2 Zásobní roztok konzervantu zvoleného jako vnitřní standard, 0,05% (m/V) v eluentu I (4.5.1).

7.1.3 Pro každý nalezený konzervant se připraví čtyři standardní roztoky tak, že se do odměrných baněk na 10 ml odměří podle níže uvedené tabulky množství zásobního roztoku prokázaného konzervantu (7.1.1) a množství zásobního roztoku vnitřního standardu (7.1.2).

Standardní roztok	Zásobní roztok vnitřního standardu	Zásobní roztok konzervantu, jehož přítomnost byla prokázána	
	počet přidávaných ml (7.1.2)	počet přidávaných ml (7.1.1)	µg/ml (*)
I	1,0	0,5	25
II	1,0	1,0	50
III	1,0	1,5	75
IV	1,0	2,0	100

(*) Tyto hodnoty jsou uvedeny jako ukazatele a odpovídají koncentracím standardních roztoků prokázaných konzervantů, připravených ze zásobních roztoků obsahujících přesně 0,05 % prokázaného konzervantu.

7.2 Příprava vzorku

- 7.2.1 Do odměrné baňky na 10 ml se přesně naváží asi 0,5 g (p gramů) vzorku, přidá se 1,0 ml roztoku vnitřního standardu (7.1.2) a 6 ml eluentu I (4.5.1) a promíchá se.
- 7.2.2 Baňka se umístí na 10 minut do ultrazvukové lázně (5.4). Ochladí se. Doplní se po rysku eluentem I a promíchá. Odstředí se nebo se zfiltruje přes skládaný filtrační papír. Supernatant nebo popřípadě filtrát se použije pro chromatografii.

7.3 Chromatografie

- 7.3.1 Gradient mobilní fáze, průtok, teplota kolony a vlnová délka detektoru zařízení pro HPLC (5.2) se nastaví podle podmínek požadovaných při kvalitativním stanovení (6.2.1 až 6.2.3).
- 7.3.2 Nastříkne se 10 µl roztoku vzorku (7.2.2) a změří se plochy píků. Tento postup se opakuje s dalšími 10µl alikvotními podíly roztoku vzorku tak dlouho, dokud se nezískají shodné výsledky. Vypočítá se poměr plochy píku analyzované sloučeniny k ploše píku vnitřního standardu.

7.4 Kalibrace

- 7.4.1 Nastříkne se 10 µl každého standardního roztoku (7.1.3) a změří se plochy píků.
- 7.4.2 Pro každý standardní roztok (7.1.3) se vypočítá poměr plochy píku hexamidinu, dibromhexamidinu, dibrompropamidinu nebo chlorhexidinu k ploše píku vnitřního standardu. Kalibrační křivka se sestrojí vnesením těchto poměrů na osu *y* a odpovídajících koncentrací standardních roztoků prokázaných konzervantů v µg/ml na osu *x*.
- 7.4.3 Z kalibrační křivky (7.4.2) se odečte koncentrace prokázaného konzervantu odpovídající poměru ploch píků vypočítanému v bodě 7.3.2.

8. VÝPOČET

- 8.1 Obsah hexamidinu, dibromhexamidinu, dibrompropamidinu nebo chlorhexidinu ve vzorku v hmotnostních procentech se vypočítá podle vzorce:

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

kde

- p* = hmotnost analyzovaného vzorku (7.2.1) v gramech,
c = koncentrace konzervantu v roztoku vzorku, odečtená z kalibrační křivky, v µg/ml,
*MW*₁ = molekulová hmotnost základní formy přítomného konzervantu,
*MW*₂ = molekulová hmotnost odpovídající soli (viz bod 10).

9. OPAKOVATELNOST⁽³⁾

Pro výrobky obsahující asi 0,1 % (m/m) hexamidinu, dibromhexamidinu, dibrompropamidinu nebo chlorhexidinu nesmí rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení na stejném vzorku překročit absolutní hodnotu 0,005 %.

³ Viz ČSN ISO 5725

10. *Tabulka molekulových hmotností*

Hexamidin	$C_{20}H_{26}N_4O_2$	354,45
Hexamidin-di(2-hydroxyethansulfonát)	$C_{20}H_{26}N_4O_2 \cdot 2C_2H_6O_4S$	606,72
Hexamidin-di-p-hydroxybenzoát	$C_{20}H_{26}N_4O_2 \cdot 2C_7H_6O_3$	630,71
Dibromhexamidin	$C_{20}H_{24}Br_2N_4O_2$	512,24
Dibromhexamidin-di(2-hydroxyethansulfonát)	$C_{20}H_{24}Br_2N_4O_2 \cdot 2C_2H_6O_4S$	764,51
Dibrompropamidin	$C_{17}H_{18}Br_2N_4O_2$	470,18
Dibrompropamidin-di(2-hydroxyethansulfonát)	$C_{17}H_{18}Br_2N_4O_2 \cdot 2C_2H_6O_4S$	722,43
Chlorhexidin	$C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$	505,45
Chlorhexidin-diacetát	$C_{22}H_{30}Cl_2N_{10} \cdot 2C_2H_4O_2$	625,56
Chlorhexidin-diglukonát	$C_{22}H_{30}Cl_2N_{10} \cdot 2C_6H_{12}O_7$	897,76
Chlorhexidin-dihydrochlorid	$C_{22}H_{30}Cl_2N_{10} \cdot 2HCl$	578,37

**KVALITATIVNÍ A KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ KYSELINY BENZOOVÉ,
KYSELINY 4-HYDROXYBENZOOVÉ, KYSELINY SORBOVÉ, KYSELINY
SALICYLOVÉ A KYSELINY PROPIONOVÉ V KOSMETICKÝCH
PROSTŘEDCÍCH**

(Směrnice komise 95/32/EHS ze 7. července 1995)

1. ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ

Metoda je použitelná pro kvalitativní a kvantitativní stanovení kyseliny benzoové, kyseliny 4-hydroxybenzoové, kyseliny sorbové, kyseliny salicylové a kyseliny propionové v kosmetických prostředcích. Samostatně jsou popsány postupy kvalitativního stanovení těchto konzervantů, kvantitativního stanovení kyseliny propionové a kvantitativního stanovení kyseliny 4-hydroxybenzoové, kyseliny salicylové, kyseliny sorbové a kyseliny benzoové.

2. DEFINICE

Množství kyseliny benzoové, kyseliny 4-hydroxybenzoové, kyseliny salicylové, kyseliny sorbové a kyseliny propionové stanovená touto metodou se vyjádří v hmotnostních procentech volných kyselin.

A. KVALITATIVNÍ STANOVENÍ

1. PRINCIP

Po kyselé/zásadité extrakci konzervantů se extrakt analyzuje chromatografií na tenké vrstvě (TLC) a reakční chromatografií („derivatizace na desce“). V závislosti na výsledcích se kvalitativní stanovení potvrdí vysokoučinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) nebo, v případě kyseliny propionové, plynovou chromatografií (GLC).

2. REAKČNÍ ČINIDLA

2.1 Všeobecně

Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a. Musí být použita destilovaná voda nebo voda alespoň ekvivalentní čistoty.

2.2 Aceton

2.3 Diethylether

2.4 Acetonitril

2.5 Toluén

2.6 n-Hexan

2.7 Parafin, tekutý

2.8 Kyselina chlorovodíková, 4M

2.9 Hydroxid draselný, 4M vodný roztok

2.10 Chlorid vápenatý, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

2.11 Uhličitan lithný, Li_2CO_3

2.12 2-Bromo-2'-acetonafon

2.13 Kyselina 4-hydroxybenzoová

2.14 Kyselina salicylová

2.15 Kyselina benzoová

2.16 Kyselina sorbová

2.17 Kyselina propionová

2.18 Referenční roztoky

Připraví se 0,1% (m/V) roztoky (100 mg/100 ml) každého z pěti konzervantů (2.13 až 2.17) v diethyletheru.

2.19 Derivatizační činidlo

0,5% roztok 2-bromo-2'-acetonafonu (2.12) v acetonitrilu (2.4) (50 mg/10 ml). Tento roztok by měl být připravován každý týden a uchováván v ledničce.

2.20 Roztok katalyzátoru

0,3% (m/V) roztok uhličitanu lithného (2.11) ve vodě (300 mg/100 ml). Tento roztok by měl být připravován čerstvý.

2.21 Vytvájecí rozpouštědlo

Toluén (2.5)/aceton (2.2) (20:0,5, V/V)

2.22 Tekutý parafin (2.7)/n-hexan (2.6) (1:2, V/V)

3. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

Obvyklé laboratorní vybavení

3.1 Vodní lázeň nastavitelná na teplotu 60 °C

3.2 Vytvájecí komora

3.3 Zdroj ultrafialového světla, 254 a 366 nm

- 3.4 Hotové desky pro chromatografii na tenké vrstvě, Silikagel 60, bez fluorescenčního indikátoru, 20 × 20 cm, tloušťka vrstvy 0,25 mm s koncentrační zónou 2,5 × 20 cm (Merck 11845 nebo ekvivalentní)
- 3.5 Mikrostříkačka na 10 µl
- 3.6 Mikrostříkačka na 25 µl
- 3.7 Sušárna nastavitelná na teplotu až 105 °C
- 3.8 Erlenmeyerovy baňky na 50 a 200 ml se zábrusovou zátkou
- 3.9 Filtrační papír, průměr 90 mm, Schleicher & Schüll, Weissband No. 5892, nebo ekvivalentní
- 3.10 Univerzální indikátorový papírek, pH 1 – 11
- 3.11 Skleněné vzorkovací lahvičky na 5 ml
- 3.12 Rotační vakuová odparka (Rotavapor nebo ekvivalentní)
- 3.13 Topná deska
- 4. POSTUP
- 4.1 **Příprava vzorků**

Do Erlenmeyerovy baňky na 50 ml se zábrusovou zátkou (3.8) se odváží přibližně 1 g vzorku. Přidají se čtyři kapky 4M kyseliny chlorovodíkové (2.8) a 40 ml acetonu (2.2). U silně zásaditých prostředků, jako je toaletní mýdlo, by mělo být přidáno 20 kapek 4M kyseliny chlorovodíkové (2.8). Pomocí indikátorového papírku (3.10) se zkontroluje, zda je pH přibližně 2. Baňka se uzavře a po dobu jedné minuty se silně protřepává.

Je-li nezbytné usnadnit extrakci konzervantů do acetonové fáze, směs se opatrně zahřeje na asi 60 °C, aby se tekutá fáze rozpustila.

Roztok se zchladí na pokojovou teplotu a přefiltruje přes filtrační papír (3.9) do Erlenmeyerovy baňky.

20 ml filtrátu se převede do Erlenmeyerovy baňky na 200 ml, přidá se 20 ml vody a promíchá se. pH směsi se upraví přibližně na 10 pomocí 4 M hydroxidu draselného (2.9) za použití indikátorového papírku (3.10).

Přidá se 1 g chloridu vápenatého (2.10) a silně se protřepe. Zfiltruje se přes filtrační papír (3.9) do dělicí nálevky na 250 ml obsahující 75 ml diethyletheru (2.3) a silně se třepe jednu minutu. Vrstvy se nechají oddělit a vodná vrstva se převede do Erlenmeyerovy baňky na 250 ml. Etherová vrstva se zlikviduje. Za použití indikátorového papírku (3.10) se pH vodného roztoku upraví na přibližně 2 okyselením 4M kyselinou chlorovodíkovou (2.8). Přidá se 10 ml diethyletheru (2.3), baňka se zazátkuje a silně protřepává jednu minutu; vrstvy se nechají oddělit a etherová vrstva se převede do rotační odparky (3.12). Vodná vrstva se zlikviduje.

Etherová vrstva se odpaří téměř do sucha a zbytek se znovu rozpustí v 1 ml diethyletheru (2.3). Roztok se převede do vzorkovací lahvičky (3.11).

4.2 **Chromatografie na tenké vrstvě**

Na startovní linii koncentrační zóny TLC desky (3.4) se do bodů, jejichž počet odpovídá počtu referenčních roztoků a roztoků vzorků, které mají být analyzovány, nanese stříkačkou (3.5) ve stejných odstupech vždy po 3 µl uhličitanu lithného (2.20) a vysuší se v proudu studeného vzduchu.

Chromatografická deska se přenesení na topnou desku (3.13) zahřátou na 40 °C, aby se skvrny udržely co nejmenší. Mikrostříkačkou (3.5) se na startovní linii desky nanese

vždy 10 µl každého referenčního vzorku (2.18) a roztoku vzorku (4.1) přesně do bodů, kam byl nanesen uhličitán lithný.

Nakonec se opět přesně do bodů, kam byly naneseny referenční roztoky/roztoky vzorku a roztok uhličitánu lithného, nanese přibližně 15 µl derivatizačního činidla (2.19) (roztok 2-bromo-2'-acetonafionu).

Chromatografická deska se zahřívá v sušárně (3.7) 45 minut při 80 °C. Po vychladnutí se deska vyvíjí v komoře (3.2), která byla 15 minut (bez vyložení filtračním papírem) nasycena vyvíjecím rozpouštědlem 2.21 (toluen/aceton), dokud čelo rozpouštědla nedosáhne vzdálenosti 15 cm (doba vyvíjení je přibližně 80 minut).

Deska se vysuší v proudu studeného vzduchu a získané skvrny se vyhodnotí pod UV světlem (3.3). Pro zesílení fluorescence slabých skvrn může být chromatografická deska ponořena do tekutého parafínu/n-hexanu (2.22).

5. KVALITATIVNÍ STANOVENÍ

Pro každou skvrnu se vypočte hodnota R_f .

Hodnoty R_f a chování vzorku pod UV světlem se porovnají s hodnotami a chováním referenčních vzorků.

Učiní se předběžné závěry o přítomnosti a kvalitativním stanovení konzervantů. Proveďte se vysokoúčinná kapalinová chromatografie popsaná v oddílu B, nebo ukazuje-li se, že je přítomna kyselina propionová, proveďte se plynová chromatografie popsaná v oddílu C. Získané retenční časy se porovnají s retenčními časy referenčních vzorků.

Výsledky TLC a HPLC nebo GC se zkombinují a konečný důkaz konzervantů vychází z kombinace výsledků.

B. KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ KYSELINY BENZOOVÉ, KYSELINY 4-HYDROXYBENZOOVÉ, KYSELINY SORBOVÉ A KYSELINY SALICYLOVÉ

1. PRINCIP

Vzorek se po okyselení extrahuje směsí ethanolu a vody. Po filtraci se konzervanty stanoví vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC).

2. REAKČNÍ ČINIDLA

2.1 Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a. a musí být vhodná pro HPLC. Musí být použita destilovaná voda nebo voda alespoň ekvivalentní čistoty.

2.2 Ethanol, absolutní

2.3 Kyselina 4-hydroxybenzoová

2.4 Kyselina salicylová

2.5 Kyselina benzoová

2.6 Kyselina sorbová

2.7 Octan sodný, ($\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$)

2.8 Kyselina octová, $d_4^{20} = 1,05 \text{ g/ml}$

2.9 Acetonitril

2.10 Kyselina sírová, 2M

2.11 Hydroxid draselný, 0,2M vodný roztok

- 2.12 Kyselina 2-methoxybenzoová
- 2.13 Směs ethanol/voda
Devět dílů ethanolu (2.2) se smíchá s jedním dílem vody (2:1).
- 2.14 Roztok vnitřního standardu
Připraví se roztok obsahující 1 g kyseliny 2-methoxybenzoové (2.12) v 500 ml směsi ethanol/voda (2.13).
- 2.15 Mobilní fáze pro HPLC
- 2.15.1 Acetátový pufráční roztok: do 1 litru vody se přidá 6,35 g octanu sodného (2.7) a 20,0 ml kyseliny octové (2.8) a smíchá se.
- 2.15.2 Mobilní fáze se připraví smícháním devíti dílů acetátového pufráčního roztoku (2.15.1) a jednoho dílu acetonitrilu (2.9).
- 2.16 Zásobní roztok konzervantů
Do odměrné baňky na 50 ml se přesně naváží asi 0,05 g kyseliny 4-hydroxybenzoové (2.3), 0,2 g kyseliny salicylové (2.4), 0,2 g kyseliny benzoové (2.5) a 0,05 g kyseliny sorbové (2,6) a objem se doplní směsí ethanol/voda (2.13). Roztok se uchovává v ledničce. Roztok je stabilní jeden týden.
- 2.17 Standardní roztoky konzervantů
Do odměrných baněk na 20 ml se odměří 8,00, 4,00, 2,00, 1,00 a 0,50 ml zásobního roztoku (2.16). Do každé baňky se přidá 10,00 ml roztoku vnitřního standardu (2.14) a 0,5 ml 2M kyseliny sírové (2.10). Objem se doplní směsí ethanol/voda (2.13). Tyto roztoky musí být připravovány čerstvé.
3. PŘÍSTROJE A POMŮCKY
Obvyklé laboratorní vybavení, které není nijak specifikováno a
- 3.1 Vodní lázeň, nastavená na 60 °C
- 3.2 CHROMATOGRAF pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii s UV detektorem s nastavitelnou vlnovou délkou a 10 μ l nastříkovací smyčkou
- 3.3 Analytická kolona
Nerezová ocel, délka 12,5 až 25 cm, vnitřní průměr 4,6 mm, plněná Nucleosilem 5C18 nebo ekvivalentní náplní
- 3.4 Filtrační papír, průměr: 90 mm, Schleicher and Schüll, Weissband No 5892 nebo ekvivalentní
- 3.5 Erlenmeyerovy baňky na 50 ml
- 3.6 Skleněné vzorkovací lahvičky na 5 ml
- 3.7 Varné kamínky, karborundum, velikost 2 – 4 mm, nebo ekvivalentní
4. POSTUP
- 4.1 **Příprava vzorku**
- 4.1.1 Příprava vzorku bez přidání vnitřního standardu
Do Erlenmeyerovy baňky na 50 ml (3.5) se naváží 1 g vzorku. Do baňky se odpipetuje 1,00 ml 2M kyseliny sírové (2.10) a 40,0 ml směsi ethanol/voda (2.13). Přidá se přibližně 1 g varných kamínků (3.7), zkumavka se uzavře a silně se alespoň jednu minutu protřepává, dokud nevznikne homogenní suspenze. Pro usnadnění extrakce konzervantů do ethanolové fáze se baňka zahřívá přesně pět minut na vodní lázni (3.1) při 60 °C.

Baňka se ihned ochladí v proudu studené vody a extrakt se na hodinu uloží při 5 °C.

Extrakt se zfiltruje přes filtrační papír (3.4). Asi 2 ml extraktu se převedou do vzorkovací lahvičky (3.6). Extrakt se uchovává při 5 °C a stanovení pomocí HPLC se provede do 24 hodin.

4.1.2 Příprava vzorku s přidáním vnitřního standardu

Do Erlenmeyerovy baňky na 50 ml (3.5) se s přesností na tři desetinná místa naváží $1 \pm 0,1$ g vzorku (a gramů). Pipetou se přidá 1,00 ml 2M kyseliny sírové (2.10) a 30,0 ml směsi ethanol/voda (2.13). Přidá se přibližně 1 g varných kamínků (3.7) a 10,00 ml roztoku vnitřního standardu. Baňka se uzavře a silně se alespoň jednu minutu protřepává, dokud nevznikne homogenní suspenze. Pro usnadnění extrakce konzervantů do ethanolové fáze se baňka zahřívá přesně pět minut na vodní lázni (3.1) při 60 °C.

Zkumavka se ihned ochladí v proudu studené vody a extrakt se uloží na hodinu při 5 °C.

Extrakt se zfiltruje přes filtrační papír (3.4). Asi 2 ml extraktu se převedou do vzorkovací lahvičky (3.6). Extrakt se uchovává při 5 °C a stanovení pomocí HPLC se provede do 24 hodin.

4.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Mobilní fáze: acetonitril/acetátový pufráční roztok (2.15).

Průtok mobilní fáze kolonou se nastaví na $2,0 \pm 0,5$ ml/min. Vlnová délka detektoru se nastaví na 240 nm.

4.2.1 Kalibrace

Do kapalinového chromatografu (3.2) se nastříkne po 10 μ l standardních roztoků konzervantů (2.17). Pro každý roztok se ze získaných chromatogramů stanoví poměr výšky píku vyšetřovaného konzervantu k výšce píku vnitřního standardu získaného z chromatogramů. Sestrojí se graf závislosti poměru výšek píků na koncentraci každého standardního roztoku.

Je třeba se ujistit, že při kalibraci byla pro standardní roztoky získána lineární odezva.

4.2.2 Stanovení

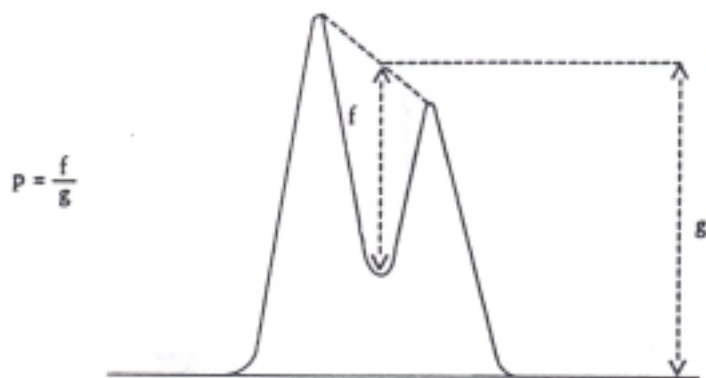
Do kapalinového chromatografu (3.2) se nastříkne 10 μ l extraktu vzorku (4.1.1) a zaznamená se chromatogram. Nastříkne se 10 μ l standardního roztoku konzervantu (2.17) a zaznamená se chromatogram. Obdržené chromatogramy se porovnají. Není-li v chromatogramu extraktu vzorku (4.1.1) žádný pík s přibližně stejným retenčním časem jako pík kyseliny 2-methoxybenzoové (doporučený vnitřní standard), nastříkne se do kapalinového chromatografu 10 μ l extraktu vzorku s přidáním vnitřním standardem (4.1.2) a zaznamená se chromatogram.

Je-li v chromatogramu extraktu vzorku (4.1.1) rušivý pík se stejným retenčním časem jako kyselina 2-methoxybenzoová, měl by být vybrán jiný vnitřní standard. (Není-li jeden z vyšetřovaných konzervantů v chromatogramu přítomen, lze tento konzervant použít jako vnitřní standard.)

Je třeba se ujistit, že při kalibraci byla pro standardní roztoky získána lineární odezva.

Je třeba ověřit, zda chromatogramy získané pro standardní roztok a roztok vzorku splňují následující požadavky:

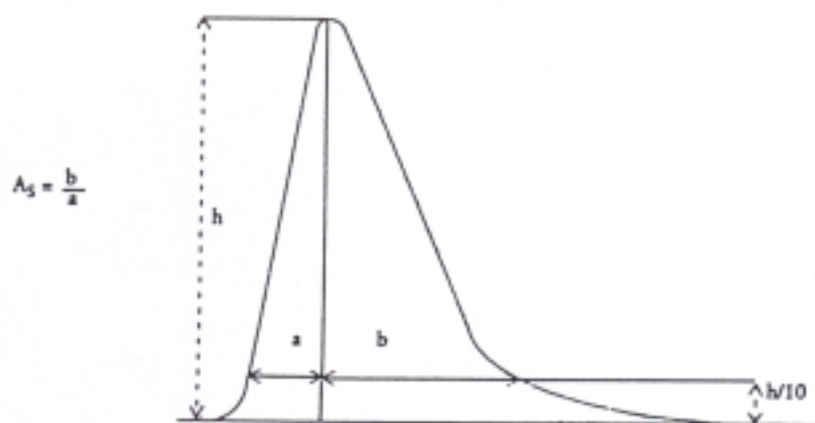
- rozlišení píků nejhůře odděleného páru je alespoň 0,90. (Definice rozlišení píků je uvedena na obrázku 12.);



Obrázek 12: Rozlišení píkú

Není-li požadovaného rozlišení dosaženo, měla by být buď použita účinnější kolona nebo by mělo být složení mobilní fáze upraveno tak, aby byl požadavek splněn;

- faktor asymetrie A_s všech získaných píkú by se měl pohybovat od 0,9 do 1,5. (Definice faktoru asymetrie je uvedena na obrázku 13.) Při zaznamenání chromatogramu za účelem stanovení faktoru asymetrie je doporučená rychlost zaznamenávání 2 cm/min.



Obrázek 13: Faktor asymetrie píku

- Základna musí být stabilní.

5. VÝPOČET

Pro výpočet koncentrace konzervantů v roztoku vzorku se použijí poměry výšek píkú vyšetřovaných konzervantů a výšky píku kyseliny 2-methoxybenzoové (vnitřní standard) a dále kalibrační graf. Obsah kyseliny benzoové, kyseliny 4-hydroxybenzoové, kyseliny sorbové nebo kyseliny salicylové ve vzorku v hmotnostních procentech (x_i) se vypočte pomocí vzorce

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

kde

a = hmotnost zkušební vzorku (4.1.2) (g),
b = koncentrace konzervantu v extraktu vzorku (4.1.2) (μl/ml) odečtená z kalibračního grafu.

6. OPAKOVATELNOST⁽³⁾

Pro výrobky obsahující asi 0,4 % (m/m) kyseliny 4-hydroxybenzoové nesmí rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení na stejném vzorku překročit absolutní hodnotu 0,035 %.

Pro výrobky obsahující asi 0,5 % (m/m) kyseliny benzoové nesmí rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení na stejném vzorku překročit absolutní hodnotu 0,050 %.

Pro výrobky obsahující asi 0,5 % (m/m) kyseliny salicylové nesmí rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení na stejném vzorku překročit absolutní hodnotu 0,045 %.

Pro výrobky obsahující asi 0,6 % (m/m) kyseliny sorbové nesmí rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení na stejném vzorku překročit absolutní hodnotu 0,035 %.

7. POZNÁMKY

7.1 Výsledky testování robustnosti metody ukazují, že množství kyseliny sírové přidané do extraktu kyselin ze vzorku je rozhodující a množství zpracovávaného vzorku by tedy mělo být v předepsaném rozmezí.

7.2 Je-li to žádoucí, lze použít vhodnou ochrannou kolonu.

C. KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ KYSELINY PROPIONOVÉ

1. ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ

Tato metoda je vhodná pro stanovení kyseliny propionové v kosmetických prostředcích až do maximální koncentrace 2 % (m/m).

2. DEFINICE

Koncentrace kyseliny propionové stanovená touto metodou se vyjádří v procentech hmotnosti (% m/m) prostředku.

3. PRINCIP

Po extrakci kyseliny propionové z prostředku se kvantitativní stanovení provede plynovou chromatografií za použití kyseliny 2-methylpropionové jako vnitřního standardu.

4. REAKČNÍ ČINIDLA

Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a; musí být použita destilovaná voda nebo voda alespoň ekvivalentní čistoty.

4.1 Ethanol, 96% (V/V)

4.2 Kyselina propionová

4.3 Kyselina 2-methylpropionová

4.4 Kyselina trihydrogenfosforečná, 10% (m/V)

³ Viz ČSN ISO 5725

4.5 Roztok kyseliny propionové
Do odměrné baňky na 50 ml se přesně naváží 1,00 g (p gramů) kyseliny propionové a doplní se na objem ethanolem (4.1).

4.6 Roztok vnitřního standardu
Do odměrné baňky na 50 ml se přesně naváží 1,00 g (e gramů) kyseliny 2-methylpropionové a doplní se na objem ethanolem (4.1).

5. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

5.1 Obvyklé laboratorní vybavení, a

5.2 Plynový chromatograf s plamenovým ionizačním detektorem

5.3 Skleněná zkumavka (20 × 150 mm) se šroubovacím uzávěrem

5.4 Vodní lázeň nastavená na 60 °C

5.5 Skleněná injekční stříkačka na 10 ml s filtrační membránou (průměr pórů 0,45 μm)

6. POSTUP

6.1 Příprava vzorku

6.1.1 Příprava vzorku bez vnitřního standardu

Do skleněné zkumavky (5.3) se naváží přibližně 1 g vzorku. Přidá se 0,5 ml kyseliny trihydrogenfosforečné (4.4) a 9,5 ml ethanolu (4.1).

Zkumavka se uzavře a silně protřepe. Je-li to nezbytné, umístí se zkumavka na pět minut na vodní lázeň zahřátou na 60 °C (5.4), aby se zcela rozpustila tuková fáze. Zkumavka se rychle zchladí pod tekoucí vodou. Část roztoku se zfiltruje přes membránový filtr (5.5). Chromatografie filtrátu se provede tentýž den.

6.1.2 Příprava vzorku s vnitřním standardem

Do skleněné zkumavky (5.3) se s přesností na 3 desetinná místa naváží $1 \pm 0,1$ g vzorku. Přidá se 0,5 ml kyseliny trihydrogenfosforečné (4.4), 0,50 ml roztoku vnitřního standardu a 9 ml ethanolu (4.1).

Zkumavka se uzavře a silně protřepe. Je-li to nezbytné, umístí se zkumavka na pět minut na vodní lázeň zahřátou na 60 °C (5.4), aby se zcela rozpustila tuková fáze. Zkumavka se rychle zchladí pod tekoucí vodou. Část roztoku se zfiltruje přes membránový filtr (5.5). Chromatografie filtrátu se provede tentýž den.

6.2 Podmínky pro plynovou chromatografii

Doporučují se následující provozní podmínky

Kolona

Typ	nerezová ocel
Délka	2 m
Průměr	3 mm
Náplň	10% SP TM 1000 (nebo ekvivalentní) + 1% H ₃ PO ₄ na Chromosorbu WAW 100 – 120 mesh

Teplota

Nástřík	200 °C
Kolona	120 °C
Detektor	200 °C
Nosný plyn	dusík
Průtoková rychlost	25 ml/min

6.3 Chromatografie

6.3.1 Kalibrace

Do řady odměrných baněk na 20 ml se odpipetuje 0,25, 0,50, 1,00, 2,00 a 4,00 ml roztoku kyseliny propionové (4.5). Do každé odměrné baňky se odpipetuje 1,00 ml roztoku vnitřního standardního (4.6); doplní se na objem ethanolem a zamíchá. Takto připravené roztoky obsahují kyselinu 2-methylpropionovou jako vnitřní standard v koncentraci e mg/ml (to znamená 1 mg/ml, je-li $e=1,000$) a kyselinu propionovou v koncentraci $p/4$, $p/2$, p , $2p$, $4p$ mg/ml (to znamená 0,25, 0,50, 1,00, 2,00, 4,00 mg/ml, je-li $p = 1,000$).

Nastříkne se 1 μ l těchto roztoků a kalibrační křivka se sestrojí vynesemím poměru hmotností kyseliny propionové a kyseliny 2-methylpropionové na osu x a poměru odpovídajících ploch píků na osu y .

Nastříknou se 3 dávky z každého roztoku a vypočte se průměr poměrů ploch píků.

6.3.2 Kvantitativní stanovení

Nastříkne se 1 μ l filtrátu vzorku 6.1.1. Chromatogram se porovná s chromatogramem jednoho ze standardních roztoků (6.3.1). Má-li pík přibližně stejný retenční čas jako pík kyseliny 2-methylpropionové, změní se vnitřní standard. Není-li pozorován žádný rušivý vliv, nastříkne se 1 μ l filtrátu vzorku 6.1.2 a změří se plochy píků kyseliny propionové a píků vnitřního standardu.

Nastříknou se 3 dávky z každého roztoku a vypočte se průměr poměrů ploch píků.

7. VÝPOČTY

7.1 Z kalibrační křivky sestrojené podle bodu 6.3.1 se odečte poměr hmotností (K), který odpovídá poměru ploch píků vypočtenému v bodě 6.3.2.

7.2 Z takto získaného poměru hmotností se vypočte obsah kyseliny propionové ve vzorku (x) v hmotnostních procentech pomocí vzorce

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

kde

K = poměr vypočtený v bodě 7.1,

e = hmotnost vnitřního standardu v gramech podle bodu 4.6,

a = hmotnost vzorku v gramech podle bodu 6.1.2.

Výsledky se zaokrouhlí na jedno desetinné místo.

8. OPAKOVATELNOST⁽³⁾

Pro výrobky obsahující asi 2 % (m/m) kyseliny propionové nesmí rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení na stejném vzorku překročit absolutní hodnotu 0,12 %.

³ Viz ČSN ISO 5725.

**KVALITATIVNÍ A KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ HYDROCHINONU,
HYDROCHINON-MONOMETHYLETERU,
HYDROCHINON-MONOETHYLETERU
A HYDROCHINON-MONOBENZYLETERU
V KOSMETICKÝCH PROSTŘEDCÍCH**

(Směrnice komise 95/32/EHS z 7. července 1995)

A. KVALITATIVNÍ STANOVENÍ

1. ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ

V metodě je popsána detekce a kvalitativní stanovení hydrochinonu, hydrochinon-monomethyletheru, hydrochinon-monoethyletheru a hydrochinon-monobenzyletheru (monobenzonu) v kosmetických prostředcích pro zesvětlení kůže.

2. PRINCIP

Kvalitativní stanovení hydrochinonu a jeho etherů se provede chromatografií na tenké vrstvě (TLC).

3. REAKČNÍ ČINIDLA

Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a.

3.1 Ethanol, 96% (V/V)

3.2 Chloroform

3.3 Diethylether

3.4 Vyvíjecí rozpouštědlo:

Chloroform/diethylether, 66:33 (V/V)

3.5 Amoniak, 25% (m/m) ($d_4^{20} = 0,91$ g/ml)

3.6 Kyselina askorbová

3.7 Hydrochinon

3.8 Hydrochinon-monomethylether

3.9 Hydrochinon-monoethylether

3.10 Hydrochinon-monobenzylether (monobenzon)

3.11 Referenční roztoky

Následující referenční roztoky se připravují čerstvé a jsou stabilní jeden den.

3.11.1 Do dělené zkumavky na 10 ml se naváží 0,05 g hydrochinonu (3.7). Přidá se 0,250 g kyseliny askorbové (3.6) a 5 ml ethanolu (3.1). Přidává se amoniak (3.5), dokud není dosaženo pH 10, a doplní se ethanolem na objem 10 ml (3.1).

3.11.2 Do dělené zkumavky na 10 ml se naváží 0,05 g hydrochinon-monomethyletheru (3.8). Přidá se 0,250 g kyseliny askorbové (3.6) a 5 ml ethanolu (3.1). Přidává se amoniak (3.5), dokud není dosaženo pH 10, a doplní se ethanolem na objem 10 ml (3.1).

3.11.3 Do dělené zkumavky na 10 ml se naváží 0,05 g hydrochinon-monoethyletheru (3.9). Přidá se 0,250 g kyseliny askorbové (3.6) a 5 ml ethanolu (3.1). Přidává se amoniak (3.5), dokud není dosaženo pH 10, a doplní se ethanolem na objem 10 ml (3.1).

3.11.4 Do dělené zkumavky na 10 ml se naváží 0,05 g hydrochinon-monobenzyletheru (3.10). Přidá se 0,250 g kyseliny askorbové (3.6) a 5 ml ethanolu (3.1). Přidává se

amoniak (3.5), dokud není dosaženo pH 10, a doplní se ethanolem na objem 10 ml (3.1).

3.12 Dusičnan stříbrný

3.13 Kyselina 12-molybdofosforečná

3.14 Kyanoželezitan draselný hexahydrát

3.15 Chlorid železitý hexahydrát

3.16 Detekční činidla

3.16.1 Do 5% vodného roztoku (m/V) dusičnanu stříbrného (3.12) se přidává amoniak (3.5), dokud se tvořící se sraženina opět nerozpustí.

Upozornění: Při delším stání se v roztoku tvoří výbušné sloučeniny a měl by být po použití zlikvidován.

3.16.2 10% (m/V) roztok kyseliny 12-molybdofosforečné (3.13) v ethanolu (3.1).

3.16.3 Připraví se 1 % (m/V) vodný roztok kyanoželezitanu draselného (3.14) a 2% (m/V) vodný roztok chloridu železitého (3.15). Těsně před použitím se smíchají stejné díly obou roztoků.

4. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

Obvyklé laboratorní vybavení, a

4.1 Obvyklé vybavení pro chromatografii na tenké vrstvě

4.2 Hotové TLC desky: silikagel GHR/UV₂₅₄; 20 × 20 cm (Machery, Nagel nebo ekvivalentní). Tloušťka vrstvy 0,25 mm.

4.3 Ultrazvuková lázeň

4.4 Odstředivka

4.5 UV lampa, 254 nm

5. POSTUP

5.1 Příprava vzorku

Do dělené zkumavky na 10 ml se naváží 3,0 g vzorku. Přidá se 0,250 g kyseliny askorbové (3.6) a 5 ml ethanolu (3.1). pH roztoku se upraví amoniakem (3.5) na 10. Objem se doplní ethanolem (3.1) na 10 ml. Zkumavka se uzavře zátkou a homogenizuje se 10 minut v ultrazvukové lázni. Zfiltruje se přes filtrační papír nebo se odstředí při 3 000 ot./min.

5.2 Chromatografie na tenké vrstvě (TLC)

5.2.1 Chromatografická komora se nasatí vyvíjecím rozpouštědlem (3.4).

5.2.2 Na desku se nanese po 2 µl referenčních roztoků (3.11) a 2 µl roztoku vzorku (5.1). Vyvíjí se ve tmě při teplotě okolí, dokud čelo rozpouštědla nedosáhne vzdálenosti 15 cm od startu.

5.2.3 Deska se vyjme, nechá se vyschnout při pokojové teplotě.

5.3 Detekce

5.3.1 Deska se pozoruje pod UV světlem při 254 nm a poloha skvrn se označí.

5.3.2 Deska se postříká

- dusičnanem stříbrným (3.16.1), nebo

- kyselinou 12-molybdofosforečnou (3.16.2); zahřeje se na asi 120 °C; nebo

- roztokem kyanoželezitanu draselného a roztokem chloridu železitého (3.16.3).

6. KVALITATIVNÍ STANOVENÍ

Odečte se hodnota R_f každé skvrny.

Skvrny získané pro roztok vzorku se porovnají se skvrnami získanými pro referenční roztoky, pokud jde o jejich hodnoty R_f , barvu skvrn v UV světle a barvu skvrn po zviditelnění detekčním činidlem.

Provede se vysokoúčinná kapalinová chromatografie popsaná v následujícím oddílu (B) a porovnají se retenční časy získané pro pík (píky) vzorku s retenčními časy píků referenčních roztoků.

Výsledky z TLC a HPLC se zkombinují s cílem dokázat přítomnost hydrochinonu a/nebo jeho etherů.

7. POZNÁMKY

Za uvedených podmínek byly pozorovány následující hodnoty R_f :

hydrochinon: 0,32

hydrochinon-monomethylether: 0,53

hydrochinon-monoethylether: 0,55

hydrochinon-monobenzylether: 0,58

B. KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ

1. ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ

V metodě je specifikován postup pro stanovení hydrochinonu, hydrochinon-monomethyletheru, hydrochinon-monoethyletheru a hydrochinon-monobenzyletheru v kosmetických prostředcích pro zesvětlení pleti.

2. PRINCIP

Vzorek je extrahován směsí voda/methanol za mírného zahřátí, kterým se rozpustí tukový materiál. Kvantitativní stanovení analytů ve výsledném roztoku se provede kapalinovou chromatografií s obrácenou fází s UV detekcí.

3. REAKČNÍ ČINIDLA

3.1 Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a. Musí být použita destilovaná voda nebo voda alespoň ekvivalentní čistoty.

3.2 Methanol

3.3 Hydrochinon

3.4 Hydrochinon-monomethylether

3.5 Hydrochinon-monoethylether

3.6 Hydrochinon-monobenzylether (monobenzon)

3.7 Tetrahydrofuran, čistoty pro HPLC

3.8 Směs voda/methanol 1:1 (V/V). Smíchá se jeden díl vody a jeden díl methanolu (3.2).

3.9 Mobilní fáze: směs tetrahydrofuran/voda 45:55 (V/V). Smíchá se 45 dílů tetrahydrofuranu (3.7) a 55 dílů vody.

3.10 Referenční roztok

Do odměrné baňky na 50 ml se naváží 0,06 g hydrochinonu (3.3), 0,08 g hydrochinon-monomethyletheru (3.4), 0,10 g hydrochinon-monoethyletheru (3.5) a 0,12 g hydrochinon-monobenzyletheru (3.6). Rozpustí se a doplní se na objem methanolem (3.2). Referenční roztok se připraví zředěním 10,00 ml tohoto roztoku na 50,00 ml směsí voda/methanol (3.8). Tyto roztoky se připravují čerstvé.

4. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

Obvyklé laboratorní vybavení, a

4.1 Vodní lázeň nastavitelná na teplotu 60 °C

4.2 Chromatograf pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii s UV detektorem s nastavitelnou vlnovou délkou a 10 µl nastříkovací smyčkou

4.3 Analytická kolona:

Chromatografická kolona z nerezové oceli, délka 250 mm, vnitřní průměr 4,6 mm, plněná Zorbax fenylem (chemicky vázaným fenethylsilanem na Zorbaxu SIL, uzavřená trimethylchlorsilanem), velikost částic 6 µm, nebo ekvivalentní náplní. Nepoužívá se ochranná kolona, s výjimkou fenylové kolony nebo kolony s ekvivalentní náplní.

4.4 Filtrační papír, průměr 90 mm, Schleicher and Schüll, Weissband No 5892 nebo ekvivalentní

5. POSTUP

5.1 Příprava vzorku

Do odměrné baňky na 50 ml se s přesností na tři desetinná místa naváží $1 \pm 0,1$ g (a gramů) vzorku. Vzorek se rozptýlí ve 25 ml směsi voda/methanol (3.8). Baňka se uzavře a silně se protřepe, dokud se nevytvoří homogenní suspenze. Protřepává se alespoň 1 minutu. Baňka se umístí do vodní lázně (4.1) nastavené na 60 °C, aby se usnadnila extrakce. Baňka se ochladí a doplní se na objem směsí voda/methanol (3.8). Extrakt se zfiltruje přes filtrační papír (4.4). Kvalitativní stanovení HPLC se provede do 24 hodin od přípravy extraktu.

5.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

5.2.1 Průtoková rychlost mobilní fáze (3.9) se upraví na 1,0 ml/min a vlnová délka detektoru se nastaví na 295 nm.

5.2.2 Nastříkne se 10 µl roztoku vzorku získaného podle bodu 5.1 a zaznamená se chromatogram. Změří se plochy píků. Provede se kalibrace podle bodu 5.2.3. Porovnají se chromatogramy získané pro vzorek a referenční roztoky. Pro výpočet koncentrace analytu v roztoku vzorku se použijí plochy píků a faktory odezvy (RF) vypočtené podle 5.2.3.

5.2.3 Kalibrace

Nastříkne se 10 µl referenčního roztoku (3.10) a zaznamená se chromatogram. Nástřík se provede několikrát, dokud není plocha píku konstantní.

Stanoví se faktor odezvy RF_i :

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

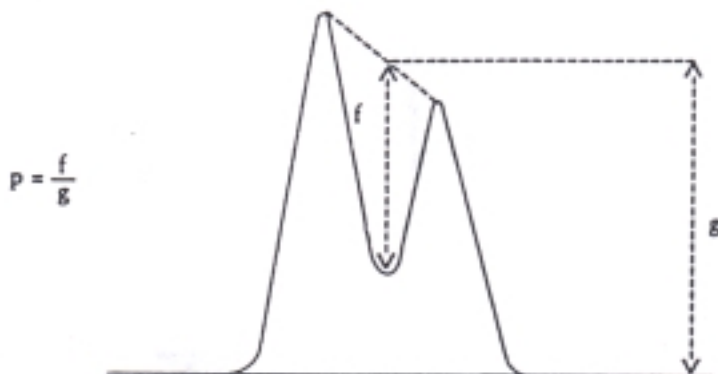
kde

p_i = plocha píku pro hydrochinon, hydrochinon-monomethylether, hydrochinon-monoethylether nebo hydrochinon- monobenzylether

c_i = koncentrace hydrochinonu, hydrochinon-monomethyletheru, hydrochinon-monoethyletheru nebo hydrochinon- monobenzyletheru v referenčním roztoku (3.10) (g/50 ml).

Je třeba ověřit, zda chromatogramy získané pro standardní roztok a roztok vzorku splňují následující požadavky:

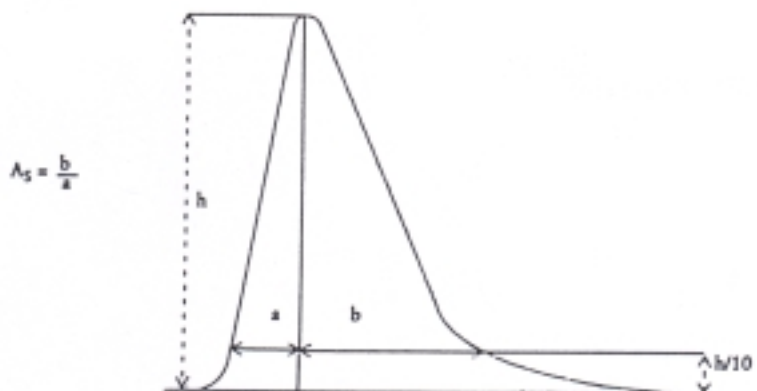
- rozlišení píků nejhůře odděleného páru je alespoň 0,90. (Definice rozlišení píků je uvedena na obrázku 14.);



Obrázek 14: Rozlišení píků

Není-li požadovaného rozlišení dosaženo, měla by být buď použita účinnější kolona nebo by mělo být složení mobilní fáze upraveno tak, aby byl požadavek splněn;

- faktor asymetrie A_s všech získaných píků by se měl pohybovat od 0,9 do 1,5. (Definice faktoru asymetrie je uvedena na obrázku 15.) Při zaznamenání chromatogramu za účelem stanovení faktoru asymetrie je doporučená rychlost zaznamenávání 2 cm/min.



Obrázek 15: Faktor asymetrie píku

- Základna musí být stabilní.

6. VÝPOČET

Pro výpočet koncentrace analytu (koncentrací analytů) ve vzorku se použijí plochy píků analytů. Koncentrace analytu ve vzorku vyjádřená v hmotnostních procentech (x_i) se vypočte pomocí vzorce

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

kde

a = hmotnost vzorku v gramech,

b_i = plocha píku analytu i ve vzorku.

7. OPAKOVATELNOST⁽³⁾

- 7.1 Pro výrobky obsahující asi 2 % (m/m) hydrochinonu nesmí rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení na stejném vzorku překročit absolutní hodnotu 0,13 %.
- 7.2 Pro výrobky obsahující asi 1 % (m/m) hydrochinon-monomethyletheru nesmí rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení na stejném vzorku překročit absolutní hodnotu 0,1%.
- 7.3 Pro výrobky obsahující asi 1 % (m/m) hydrochinon-monoethyletheru nesmí rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení na stejném vzorku překročit absolutní hodnotu 0,11%.
- 7.4 Pro výrobky obsahující asi 1 % (m/m) hydrochinon-monobenzyletheru nesmí rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení na stejném vzorku překročit absolutní hodnotu 0,11%.

8. REPRODUKOVATELNOST⁽³⁾

- 8.1 Pro výrobky obsahující asi 2 % (m/m) hydrochinonu nesmí absolutní hodnota rozdílu mezi výsledky dvou paralelních stanovení na stejném vzorku, provedených stejnou metodou za různých podmínek (různé laboratoře, různí experimentátoři, různé přístroje a/nebo různá doba), překročit absolutní hodnotu 0,37 %.
- 8.2 Pro výrobky obsahující asi 1 % (m/m) hydrochinon-monomethyletheru nesmí absolutní hodnota rozdílu mezi výsledky dvou paralelních stanovení na stejném vzorku, provedených stejnou metodou za různých podmínek (různé laboratoře, různí experimentátoři, různé přístroje a/nebo různá doba), překročit absolutní hodnotu 0,21 %.
- 8.3 Pro výrobky obsahující asi 1 % (m/m) hydrochinon-monoethyletheru nesmí absolutní hodnota rozdílu mezi výsledky dvou paralelních stanovení na stejném vzorku, provedených stejnou metodou za různých podmínek (různé laboratoře, různí experimentátoři, různé přístroje a/nebo různá doba), překročit absolutní hodnotu 0,19%.
- 8.4 Pro výrobky obsahující asi 1 % (m/m) hydrochinon-monobenzyletheru nesmí absolutní hodnota rozdílu mezi výsledky dvou paralelních stanovení na stejném vzorku, provedených stejnou metodou za různých podmínek (různé laboratoře, různí experimentátoři, různé přístroje a/nebo různá doba), překročit absolutní hodnotu 0,11%.

³ Viz ČSN ISO 5725

9. POZNÁMKY

- 9.1 Je-li zjištěn obsah hydrochinonu výrazně vyšší než 2 % a je požadován přesný odhad obsahu, měl by se extrakt vzorku (5.1) zředit na podobnou koncentraci, kterou by měl vzorek obsahující 2 % hydrochinonu, a stanovení se opakuje.

(U některých přístrojů může při vysokých koncentracích hydrochinonu ležet hodnota absorpance mimo lineární rozsah detektoru.)

9.2 Rušivé vlivy

Výše popsaná metoda umožňuje stanovení hydrochinonu a jeho etherů v jednom izokratickém průběhu. Použití fenylové kolony zajistí dostatečnou retenci hydrochinonu, kterou nelze zajistit při použití kolony C18 s uvedenou mobilní fází.

U této metody však snadno dochází k rušivému vlivu celé řady parabenů. V takovém případě by stanovení mělo být zopakováno s jiným systémem mobilní fáze/stacionární fáze. Vhodné metody lze najít v odkazech ⁽⁷⁾ a ⁽⁸⁾:

Kolona: Zorbax ODS, 4,6 mm × 25 mm nebo ekvivalentní:

teplota: 36 °C

průtok: 1,5 ml/min

mobilní fáze:

pro hydrochinon: methanol/voda 5/95 (V/V)

pro hydrochinon-monomethylether: methanol/voda 30/70 (V/V)

pro hydrochinon-monobenzylether: methanol/voda 80/20(V/V) ⁽⁸⁾

Kolona: Spherisorb S5-ODS nebo ekvivalentní:

mobilní fáze: voda/methanol 90/10 (V/V)

průtok: 1,5 ml/min

Tyto podmínky jsou vhodné pro hydrochinon. ⁽⁹⁾

KVALITATIVNÍ A KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ 2-FENOXYETHANOLU, 1-FENOXYPROPAN-2-OLU, METHYL-, ETHYL-, PROPYL-, BUTYL- A BENZYL-4-HYDROXYBENZOÁTU V KOSMETICKÝCH PROSTŘEDCÍCH

(Směrnice komise 96/45/EHS z 2. července 1996)

A. KVALITATIVNÍ STANOVENÍ

1. ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ

V této metodě je specifikován postup chromatografie na tenké vrstvě, který v kombinaci s metodou kvantitativního stanovení, popsanou v oddílu B, umožní identifikaci 2-fenoxyethanolu, 1-fenoxypropan-2-olu, methyl-4-hydroxybenzoátu,

⁸ M. Herpol-Borremans et M.-O. Masse, Identification et dosage de l'hydroquinone et de ses éthers méthylique et benzylique dans les produits cosmétiques pour blanchir la peau. *Int.J.Cosmet.Sci.* 8-203-214 (1986).

⁹ J. Firth and I. Rix, Determination of hydroquinone in skin toning creams, *Analyst* (1986), 111, p.129.

ethyl-4-hydroxybenzoátu, propyl-4-hydroxybenzoátu, butyl-4-hydroxybenzoátu a benzyl-4-hydroxybenzoátu v kosmetických prostředcích.

2. PRINCIP

Konzervační přísady se extrahují z okyselených vzorků kosmetických prostředků acetonem. Po filtraci se acetonový roztok smíchá s vodou a mastné kyseliny se v alkalickém prostředí vysrážejí jako vápenaté soli. Alkalická směs aceton/voda je extrahována diethyletherem, čímž se odstraní lipofilní látky. Po okyselení se konzervační přísady extrahují diethyletherem. Alikvotní část diethyletherového extraktu se nanese na desku pokrytou tenkou vrstvou silikagelu. Po vyvíjení se získaný chromatogram pozoruje v UV světle a zviditelní se za použití Millonova činidla.

3. REAKČNÍ ČINIDLA

3.1 Všeobecně

Všechna použitá reakční činidla musí být čistoty p.a. Musí být použita destilovaná voda nebo voda alespoň stejné čistoty.

3.2 Aceton

3.3 Diethylether

3.4 n-Pentan

3.5 Methanol

3.6 Kyselina octová, ledová

3.7 Roztok kyseliny chlorovodíkové, 4M

3.8 Roztok hydroxidu draselného, 4M

3.9 Chlorid vápenatý dihydrát ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

3.10 Detekční činidlo: Millonovo činidlo

Millonovo činidlo (dusičnan rtuťnatý) je komerčně dostupný roztok (Fluka 69820).

3.11 2-Fenoxyethanol

3.12 1-Fenoxy-propan-2-ol

3.13 Methyl-4-hydroxybenzoát (methylparaben)

3.14 Ethyl-4-hydroxybenzoát (ethylparaben)

3.15 n-Propyl-4-hydroxybenzoát (propylparaben)

3.16 n-Butyl-4-hydroxybenzoát (butylparaben)

3.17 Benzyl-4-hydroxybenzoát (benzylparaben)

3.18 Referenční roztoky

Připraví se 0,1% (m/V) roztoky každé z referenčních látek 3.11, 3.12, 3.13, 3.14, 3.15, 3.16 a 3.17 v methanolu.

3.19 Vyvíjecí rozpouštědlo

Smíchá se 88 dílů n-pentanu (3.4) s 12 díly ledové kyseliny octové (3.6).

4. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

Běžné laboratorní vybavení a

4.1 Vodní lázeň nastavitelná na teplotu 60 °C

- 4.2 Vyvíjecí komora (nevyložená filtračním papírem)
- 4.3 Zdroj ultrafialového světla, 254 nm
- 4.4 Hotové desky 20 cm × 20 cm se sorbční vrstvou: silikagel 60F₂₅₄ (fluorescenční indikátor), tloušťka vrstvy: 0,25 mm, s koncentrační zónou 25 × 200 mm (Merck No 11798, Darmstadt, nebo ekvivalentní)
- 4.5 Sušárna nastavitelná na teplotu až do 105 °C
- 4.6 Horkovzdušný fén
- 4.7 Vlněný malířský váleček o délce přibližně 10 cm, vnější průměr přibližně 3,5 cm. Vlněná vrstva by měla být 2 až 3 mm silná. Podle potřeby se vlna zastříhne.
Viz poznámka v bodě 5.2.
- 4.8 Erlenmeyerovy baňky na 50 a 200 ml, se zábrusovou zátkou
- 4.9 Elektrická topná deska s termostatem. Nastavení teploty: asi 80 °C. Topná deska se pokryje hliníkovou deskou o velikosti 20 cm × 20 cm a tloušťce asi 6 mm, čímž se dosáhne rovnoměrného rozložení tepla.

5. POSTUP

5.1 Příprava vzorku

Do Erlenmeyerovy baňky na 50 ml se zábrusovou zátkou (4.8.) se odváží přibližně 1 g vzorku. Přidají se čtyři kapky roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.7) a 40 ml acetonu.

V případě silně zásaditých kosmetických přípravků, jako je toaletní mýdlo, se přidá 20 kapek roztoku kyseliny chlorovodíkové. Baňka se uzavře, směs se zlehka zahřeje na asi 60 °C, aby se usnadnila extrakce konzervačních látek do acetonové fáze, a 1 minutu se silně třepe.

Indikátorovým papírkem se změří pH roztoku a upraví se na hodnotu ≤ 3 roztokem kyseliny chlorovodíkové. Znovu se 1 minutu silně třepe.

Roztok se ochladí na pokojovou teplotu a zfiltruje se přes filtrační papír do Erlenmeyerovy baňky. 20 ml filtrátu se převede do Erlenmeyerovy baňky na 200 ml, přidá se 60 ml vody a promíchá. Hodnota pH směsi se upraví hydroxidem draselným (3.8.) přibližně na 10 za použití indikátorového papírku.

Přidá se 1 g chloridu vápenatého dihydrátu (3.9) a silně se protřepe.

Roztok se zfiltruje přes filtrační papír do dělicí nálevky na 250 ml, která obsahuje 75 ml diethyletheru, a silně se jednu minutu protřepává. Fáze se nechají oddělit a vodná fáze se vypustí do Erlenmeyerovy baňky na 200 ml. Hodnota pH roztoku se upraví roztokem kyseliny chlorovodíkové na přibližně 2 za použití indikátorového papírku. Poté se přidá 10 ml diethyletheru a silně se jednu minutu protřepává. Fáze se nechají oddělit a asi 2 ml fáze diethyletheru se převede do vzorkovací lahvičky na 5 ml.

5.2 Chromatografie na tenké vrstvě (TLC)

TLC deska se umístí na zahřátou hliníkovou desku (4.9.) Na startovní linii koncentrační zóny TLC desky se nanese 10 μ l každého z referenčních roztoků a 100 μ l roztoku vzorku (vzorků) (5.1).

Podle potřeby lze podpořit odpaření rozpouštědla proudem vzduchu. TLC deska se odstraní z topné desky a nechá se vychladnout na pokojovou teplotu. Vyvíjecí komora (4.2) se naplní 100 ml vyvíjecího rozpouštědla (3.19).

TLC deska se ihned vloží do nenasyčené komory a vyvíjí se při pokojové teplotě, dokud čelo rozpouštědla nepostoupí asi 15 cm od základní linie. Deska se z vyvíjecí komory vyjme a vysuší v proudu horkého vzduchu pomocí horkovzdušného fěnu.

Deska se prohlédne v UV světle (4.3) a pozice skvrn se vyznačí. Deska se zahřívá 30 minut v sušárně (4.5) při 100 °C, aby se odstranila nadbytečná kyselina octová. Konzervační přísady v chromatogramu se zviditelní Millonovým činidlem (3.10) tak, že válečkem (4.7) namočeným do činidla se TLC deska přejede tak, aby byla rovnoměrně navlhčená.

Poznámka: Skvrny lze rovněž zviditelnit opatrným nanesením kapky Millonova činidla na každou skvrnu označenou pod UV světlem.

Estery kyseliny 4-hydroxybenzoové se projeví jako červené skvrny, 2-fenoxyethanol a 1-fenoxypropan-2-ol jako žluté skvrny. Je však třeba dávat pozor na to, že kyselina 4-hydroxybenzoová, která může být přítomná ve vzorcích jako konzervační látka nebo produkt rozkladu parabenů, se sama o sobě projeví jako červená skvrna. Viz 7.3 a 7.4.

6. KVALITATIVNÍ STANOVENÍ

Pro každou skvrnu se odečte hodnota R_f . Skvrny získané z roztoku vzorku se porovnají se skvrnami získanými z referenčních roztoků, pokud jde o jejich hodnoty R_f , jejich chování v UV světle a barvu po zviditelnění. Učiní se předběžné závěry o identitě konzervantů.

Pokud se zdá, že jsou přítomny parabeny, provede se analýza vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) popsanou v oddílu B. Výsledky chromatografie na tenké vrstvě (TLC) a vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) se zkombinují, aby se potvrdila přítomnost 2-fenoxyethanolu, 1-fenoxypropan-2-olu a parabenů.

7. POZNÁMKY

7.1 Vzhledem k toxicitě Millonova činidla je nejvhodnější aplikovat toto činidlo jedním z popsaných způsobů. Postřík se nedoporučuje.

7.2 Jiné sloučeniny obsahující hydroxylové skupiny mohou rovněž při reakci s Millonovým činidlem dávat zbarvení. Tabulka barev a hodnot R_f získaných pro řadu konzervantů použitím chromatografie na tenké vrstvě je uvedena v práci N. de Kruijf, M.A.H. Rijk, L.A. Pranato-Soetardhi a A. Schouten (1987): Determination of preservatives in cosmetic products I: Thin-layer chromatographic procedure for the identification of preservatives in cosmetic products (*J. Chromatography* 410, 395-411).

7.3 Hodnoty R_f uvedené v následující tabulce slouží jako ukazatele hodnot, které lze získat:

Sloučenina	hR_f	Barva
Kyselina 4-hydroxybenzoová	11	červená
Methylparaben	12	červená
Ethylparaben	17	červená
Propylparaben	21	červená
Butylparaben	26	červená
Benzylparaben	16	červená
2-fenoxyethanol	29	žlutá
1-fenoxypropan-2-ol	50	žlutá

- 7.4 V případě kyseliny 4-hydroxybenzoové a methylparabenu a ani v případě benzylparabenu a ethylparabenu nedochází k oddělení. Kvalitativní stanovení těchto sloučenin by mělo být potvrzeno metodou HPLC popsanou v oddílu B a porovnáním retenčních časů vzorku s retenčními časy standardů.

B. KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ

1. ROZSAH A OBLAST POUŽITÍ

V této metodě je specifikován postup pro stanovení 2-fenoxyethanolu, 1-fenoxypropan-2-olu, methyl-4-hydroxybenzoátu, ethyl-4-hydroxybenzoátu, propyl-4-hydroxybenzoátu, butyl-4-hydroxybenzoátu a benzyl-4-hydroxybenzoátu v kosmetických prostředcích.

2. DEFINICE

Množství konzervačních přísad stanovená touto metodou se vyjádří v hmotnostních procentech.

3. PRINCIP

Vzorek se okyselí přidáním kyseliny sírové a poté se suspenduje ve směsi ethanolu a vody. Směs se opatrně zahřeje do rozpuštění tukové fáze, aby se zajistila kvantitativní extrakce, a poté se zfiltruje.

Konzervační látky ve filtrátu se stanoví vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) s obrácenou fází za použití isopropyl-4-hydroxybenzoátu jako vnitřního standardu.

4. REAKČNÍ ČINIDLA

4.1 Všeobecně

Všechna reakční činidla musí být čistoty p.a. a podle potřeby musí být vhodná pro HPLC. Musí být použita destilovaná voda nebo voda alespoň stejné čistoty.

4.2 Ethanol, absolutní

4.3 2-Fenoxyethanol

4.4 1-Fenoxypropan-2-ol

4.5 Methyl-4-hydroxybenzoát (methylparaben)

4.6 Ethyl-4-hydroxybenzoát (ethylparaben)

4.7 n-Propyl-4-hydroxybenzoát (propylparaben)

4.8 Isopropyl-4-hydroxybenzoát (isopropylparaben)

4.9 n-Butyl-4-hydroxybenzoát (butylparaben)

4.10 Benzyl-4-hydroxybenzoát (benzylparaben)

4.11 Tetrahydrofuran

4.12 Methanol

4.13 Acetonitril

4.14 Roztok kyseliny sírové, 2M

4.15 Směs ethanol/voda

Smíchá se devět dílů ethanolu (4.2) a jeden díl vody.

- 4.16 Roztok vnitřního standardu
Přesně se naváží přibližně 0,25 g isopropylparabenu (4.8), převede se do odměrné baňky na 500 ml, rozpustí se a doplní se na objem směsi ethanol/voda (4.15).
- 4.17 Mobilní fáze: směs tetrahydrofuran/voda/methanol/acetonitril
Smíchá se 5 dílů tetrahydrofuranu, 60 dílů vody, 10 dílů methanolu a 25 dílů acetonitrilu.
- 4.18 Zásobní roztok konzervačních přísad
Do odměrné baňky na 100 ml se přesně naváží přibližně 0,2 g 2-fenoxyethanolu, 0,2 g 1-fenoxypropan-2-olu, 0,05 g methylparabenu, 0,05 g ethylparabenu, 0,05 g propylparabenu, 0,05 g butylparabenu a 0,025 g benzylparabenu, rozpustí se a doplní se na objem směsi ethanol/voda.
Roztok se uchovává v ledničce a je stabilní 1 týden.
- 4.19 Standardní roztoky konzervačních přísad
Do odměrných baněk na 50 ml se ze zásobního roztoku (4.18) převede 20,00 ml, 10,00 ml, 5,00 ml, 2,00 ml a 1,00 ml. Do každé baňky se přidá 10,00 ml roztoku vnitřního standardu (4.16) a 1,0 ml roztoku kyseliny sírové (4.14) a doplní se na objem směsi ethanol/voda. Tyto roztoky se připravují čerstvé.
5. PŘÍSTROJE A POMŮCKY
Obvyklé laboratorní vybavení a
- 5.1 Vodní lázeň nastavitelná na teplotu $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$
- 5.2 HPLC chromatograf s UV detektorem, vlnová délka 280 nm
- 5.3 Analytická kolona:
Nerezová ocel, délka 25 cm, vnitřní průměr 4,6 mm, (nebo délka 12,5 cm a vnitřní průměr 4,6 mm), naplněná Nucleosilem 5C18 nebo ekvivalentním (viz 10.1).
- 5.4 Erlenmeyerovy baňky na 100 ml, se zábrusovou zátkou
- 5.5 Varné kamínky, karborundum, velikost 2 až 4 mm, nebo ekvivalentní
6. POSTUP
- 6.1 **Příprava vzorku**
- 6.1.1 Příprava vzorku bez přidání vnitřního standardu
Do Erlenmeyerov baňky na 100 ml se zábrusovou zátkou se odváží asi 1,0 g vzorku. Do baňky se pipetou přidá 1,0 ml roztoku kyseliny sírové (4.14) a 50,0 ml směsi ethanol/voda (4.15). Přidá se přibližně 1 g varných kamínků (5.5), baňka se uzavře a silně se protřepe, dokud nevznikne homogenní suspenze. Protřepává se alespoň jednu minutu. Baňka se vloží na 5 minut do vodní lázně (5.1) o teplotě $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, aby se podpořila extrakce konzervantů do ethanolové fáze.
Baňka se ihned ochladí pod proudem studené vody a extrakt se uloží na jednu hodinu do ledničky. Extrakt se zfiltruje přes filtrační papír. Asi 2 ml filtrátu se převedou do 5 ml vzorkovací lahvičky. Extrakty se uloží do ledničky a stanovení metodou HPLC se provede do 24 hodin.
- 6.1.2 Příprava vzorků včetně přidání vnitřního standardu
Do Erlenmeyerov baňky na 100 ml se zábrusovou zátkou se s přesností na tři desetinná místa odváží $1,0\text{ g} \pm 0,1\text{ g}$ vzorku.

Do baňky se pipetou přidá 1,0 ml roztoku kyseliny sírové (4.14) a 40,0 ml směsi ethanol/voda (4.15). Přidá se přibližně 1 g varných kamínků (5.5) a přesně 10,00 ml roztoku vnitřního standardu. Baňka se uzavře a silně se protřepe, dokud nevznikne homogenní suspenze. Protřepává se alespoň jednu minutu. Baňka se vloží na 5 minut do vodní lázně (5.1) o teplotě $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, aby se podpořila extrakce konzervantů do ethanolové fáze.

Baňka se ihned ochladí pod proudem studené vody a extrakt se uloží na jednu hodinu do ledničky. Extrakt se zfiltruje přes filtrační papír.

Asi 2 ml filtrátu se převedou do 5 ml vzorkovací lahvičky (zkušební roztok). Extrakt se uloží do ledničky a stanovení metodou HPLC se provede do 24 hodin.

6.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

6.2.1 Chromatografické podmínky

- Mobilní fáze: směs tetrahydrofuran/voda/methanol/acetonitril (4.17)
- Průtoková rychlost: 1,5 ml za minutu
- Detekční vlnová délka: 280 nm

6.2.2 Kalibrace

Nastříkne se 10 μl každého ze standardních roztoků konzervantů (4.19). Ze získaných chromatogramů se stanoví poměr výšek pík standardních roztoků konzervantů k píku vnitřního standardu. Pro každý konzervant se sestrojí křivka závislosti těchto poměrů na koncentraci standardních roztoků.

6.2.3 Stanovení

Do chromatografu se nastříkne 10 μl roztoku vzorku bez vnitřního standardu (6.1.1) a zaznamená se chromatogram.

Nastříkne se 10 μl jednoho ze standardních roztoků konzervantů (4.19) a zaznamená se chromatogram. Získané chromatogramy se porovnají.

Není-li v chromatogramu extraktu vzorku (6.1.1) přítomen pík s přibližně stejným retenčním časem, jako je retenční čas píku isopropylparabenu (doporučený vnitřní standard), pokračuje se nastříknutím 10 μl roztoku vzorku s vnitřním standardem (6.1.2). Chromatogram se zaznamená a změří se výšky píků.

Je-li v chromatogramu roztoku vzorku rušivý pík s retenčním časem přibližně stejným jako retenční čas isopropylparabenu, měl by být vybrán jiný vnitřní standard.

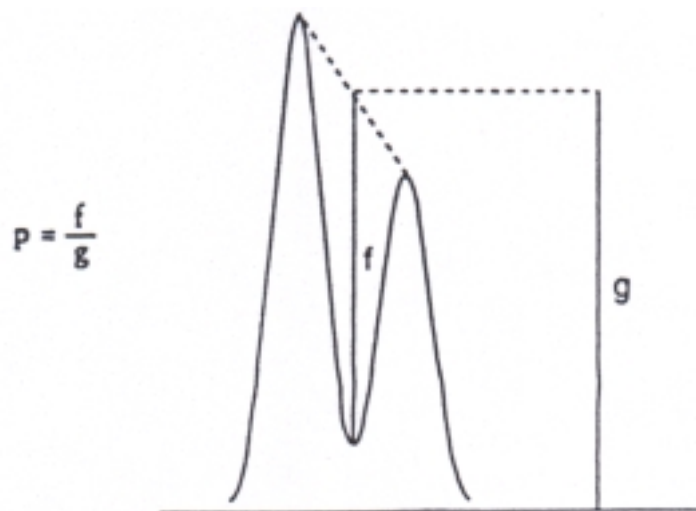
Není-li jeden ze vyšetřovaných konzervantů v chromatogramu vzorku přítomen, lze tento konzervant použít jako vnitřní standard.

Vypočítají se poměry výšek píků vyšetřovaných konzervantů k výšce píku vnitřního standardu.

Je třeba ověřit, že kalibrační křivka použitého standardu je lineární.

Je třeba ověřit, zda chromatogramy získané pro standardní roztok a roztok vzorku splňují následující požadavky:

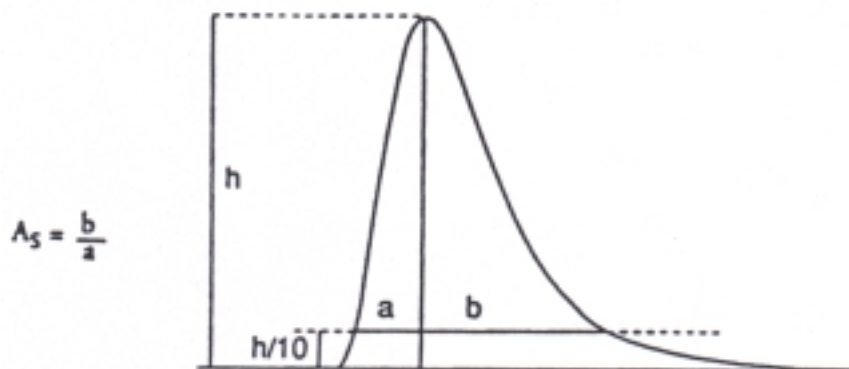
- separace píků nejhůře odděleného páru je alespoň 0,90. (Definice separace píků je uveden na obrázku 16.)



Obrázek 16: Separace píků

Není-li požadované separace dosaženo, měla by být buď použita účinnější kolona, nebo by mělo být složení mobilní fáze upraveno tak, aby byl požadavek splněn.

- faktor asymetrie (A_s) všech získaných píků by se měl pohybovat od 0,9 do 1,5. (Definice faktoru asymetrie je uvedena na obrázku 17.) Při zaznamenání chromatogramu za účelem stanovení faktoru asymetrie je doporučená rychlost zaznamenávání 2 cm/min.



Obrázek 17: Faktor asymetrie píku

- Základna by měla být stabilní.

7. VÝPOČET

Pro výpočet koncentrace konzervantů v roztoku vzorku se použije kalibrační křivka (6.2.2) a hodnoty poměrů výšek píků vyšetřovaných konzervantů k výšce píku vnitřního standardu.

Obsah (w_i) 2-fenoxyethanolu, 1-fenoxypropan-2-olu, methyl-4-hydroxybenzoátu, ethyl-4-hydroxybenzoátu, propyl-4-hydroxybenzoátu, butyl-4-hydroxybenzoátu a benzyl-4-hydroxybenzoátu v hmotnostních procentech (% m/m) se vypočte pomocí vzorce:

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

kde

b_i = koncentrace konzervantu i ve zkušebním roztoku ($\mu\text{g/ml}$) odečtená z kalibrační křivky,

a = hmotnost zkušebního vzorku (g).

8. OPAKOVATELNOST⁽³⁾

Viz poznámka v bodě 10.5.

9. REPRODUKOVATELNOST⁽³⁾

Viz poznámka v bodě 10.5.

10. POZNÁMKY

10.1 Stacionární fáze

Retenční chování rozpouštěných látek při stanoveních HPLC výrazně závisí na typu, značce a historii stacionární fáze. Zda lze kolonu použít pro oddělení vyšetřovaných konzervantů, lze usoudit z výsledků získaných pro standardní roztoky (viz poznámky v bodě 6.2.3). Kromě navrhovaného materiálu náplně kolony byly shledány vhodnými také materiály Hypersil ODS a Zorbax ODS.

Za účelem dosažení požadovaného oddělení lze popřípadě optimalizovat složení mobilní fáze.

10.2 Detekční vlnová délka

Testování robustnosti popisované metody ukázalo, že nepatrná změna detekční vlnové délky může mít významný vliv na výsledky stanovení.

Tento parametr musí být proto během analýzy pečlivě kontrolován.

10.3 Rušivé vlivy

Za podmínek popsanych v této metodě je eluováno mnoho dalších sloučenin, jako jsou konzervanty a kosmetické přísady. Retenční časy velkého množství konzervantů uvedených v příloze č. 6 vyhlášky Ministerstva zdravotnictví č. 26/2001 Sb., o hygienických požadavcích na kosmetické prostředky, o náležitostech žádosti o neuvedení ingredience na obalu kosmetického prostředku a o požadavcích na vzdělání a praxi fyzické osoby odpovědné za výrobu kosmetického prostředku (o kosmetických prostředcích) jsou uvedeny v práci N. de Kruijf, M.A.H. Rijk, L. A. Pranato-Soetardhi and A. Schoulen, (1989). Determination of preservatives in cosmetic products II. High-performance liquid chromatographic identification (*J. Chromatography* 469, 317-398).

10.4 Pro ochranu analytické kolony lze použít vhodnou předkolonu.

10.5 Metoda byla zkoušena při okružním pokusu, na němž se podílelo devět laboratoří. Byly analyzovány tři vzorky. V následující tabulce jsou pro každý ze tří vzorků uvedeny střední hodnoty v % m/m (m), opakovatelnosti (r) a reprodukovatelnosti (R) zjištěné pro analyty, které byly ve vzorcích obsaženy:

³ Viz ČSN ISO 5725.

Vzorek		2-Fenoxy-ethanol	1-Fenoxy-propan-2-ol	Methylparaben	Ethylparaben	Propylparaben	Butylparaben	Benzylparaben
Vitaminový krém	m	1,124		0,250	0,0628	0,031	0,0906	
	r	0,016		0,018	0,0035	0,0280	0,0044	
	R	0,176		0,030	0,0068	0,0111	0,0034	
Základní pleťový krém	m	1,196		0,266	0,076			
	r	0,040		0,003	0,002			
	R	0,147		0,022	0,004			
Masážní krém	m		0,806			0,180	0,148	0,152
	r		0,067			0,034	0,013	0,015
	R		0,112			0,078	0,012	0,016