

O'ZBEKISTON MILLIY STANDARTI

Charm. Bo'yalgan charmda azo bo'yoqlar miqdorini aniqlash usullari. 2-Qism.  
4-aminoazobenzolni aniqlash

(ISO 17234-2:2011, IDT)

Rasmiy nashr

O'zbekiston standartlar instituti

Toshkent

**So‘z boshi**

1 O‘zbekiston standartlar instituti tomonidan QABUL QILISHGA TAQDIM ETILDI.

2 O‘zbekiston standartlar institutining 2024-yil 12 - avgustdagi 45/XSt-son buyrug‘i bilan TASDIQLANDI.

3 Ushbu standart ISO 17234-2:2011 “Leather. Chemical tests for the determination of certain azocolourants in dyed leathers. Part 2: Determination of 4-aminoazobenzene” xalqaro standartiga aynan o‘xshash.

**4 DASTLABKI AMALGA KIRITILISHI**

*Ushbu standart va unga bo‘lgan o‘zgartishlarni O‘zbekiston hududida amalga kiritish haqidagi axborot Standartlashtirish bo‘yicha milliy organning rasmiy veb-saytlari va standartlarning yillik axborot ko‘rsatkichlarida qayd etiladi. Ushbu standartni qayta ko‘rib chiqish yoki bekor qilish haqidagi muvofiq axborot Standartlashtirish bo‘yicha milliy organning rasmiy veb-saytlari va standartlarning yillik axborot ko‘rsatkichlarida qayd etiladi.*

Ushbu standartni O‘zbekiston Respublikasi hududida rasmiy chop etish mutlaq huquqi O‘zbekiston standartlar institutiga tegishli

## Mundarija

1.	Qo‘llanish doirasi.....	1
2.	Standartlarga havolalar.....	1
3.	Umumiy qoidalar.....	2
4.	Tamoyil.....	2
5.	Xavfsizlik choralari.....	2
6.	Qurilmalar.....	2
7.	Reagentlar.....	3
8.	Namuna olish.....	3
9.	Tartib-taomil.....	4
10.	Baholash .....	5
11.	Sinov bayonnomasi.....	6
12.	A ilova .....	7
13.	B ilova.....	12
14.	C ilova.....	13
15.	Bibliografiya.....	14

## Kirish

ISO (Xalqaro standartlashtirish tashkiloti) - milliy standartlar organlarining (ISO a'zolari) butun dunyo federatsiyasi. Xalqaro standartlarni tayyorlash bo'yicha ishlar odatda ISO texnik qo'mitalari orqali amalga oshiriladi. Texnik qo'mita tashkil etilgan mavzudan manfaatdor bo'lgan har bir a'zo organ ushbu qo'mitada vakillik qilish huquqiga ega. Ishda ISO bilan hamkorlikda xalqaro tashkilotlar, davlat va nodavlat tashkilotlar ham ishtirok etmoqda. ISO Xalqaro elektrotexnika komissiyasi (IEC) bilan elektrotexnika standartlashtirishning barcha masalalari bo'yicha yaqindan hamkorlik qiladi.

Xalqaro standartlar ISO/IEC direktivalarining 2-qismida keltirilgan qoidalarga muvofiq ishlab chiqilgan.

Texnik qo'mitalarning asosiy vazifasi xalqaro standartlarni tayyorlashdir. Xalqaro standartlar loyihasi texnik qo'mitalar tomonidan qabul qilingan hujjatlar a'zo organlarga ovoz berish uchun yuboriladi. Nashr sifatida

Xalqaro standart ovoz beruvchi a'zo organlarning kamida 75 % tomonidan ma'qullanishini talab qiladi.

Ushbu hujjatning ayrim elementlari patent huquqlarining predmeti bo'lishi mumkinligiga e'tibor qaratiladi. ISO patent huquqlarining birortasini yoki barchasini aniqlash uchun javobgar emas.

ISO 17234-2 standartlashtirish bo'yicha Evropa qo'mitasi (CEN) CEN/TC 289 Texnik qo'mitasi tomonidan Charm texnologlari va kimyogarlar jamiyatlari xalqaro ittifoqining Kimyoviy sinov komissiyasi (IUC komissiyasi, IULTCS) bilan hamkorlikda tayyorlangan. ISO va CEN o'rtasidagi texnik hamkorlik to'g'risidagi bitim (Vena kelishuvi). Bu usul texnik jihatdan IUC 20-2 dagi usulga o'xshaydi.

IULTCS, dastlab 1897 yilda tashkil etilgan bo'lib, charm fan va texnologiyasini yanada rivojlantirish uchun professional charm jamiyatlarining butun dunyo bo'ylab tashkilotidir. IULTCS ning uchta komissiyasi mavjud bo'lib, ular charmdan namuna olish va sinovdan o'tkazish uchun xalqaro usullarni o'rnatish uchun mas'uldir. ISO IULTCSni charm uchun sinov usullarini tayyorlash bo'yicha xalqaro standartlashtiruvchi organ sifatida tan oladi.

ISO 17234 Charm. Bo'yalgan charmlarda ba'zi azo bo'yoqlarni aniqlash uchun kimyoviy sinovlar umumiy nomi ostida quyidagi qismlardan iborat:

- 1-qism: Azo rang beruvchilardan olingan ba'zi aromatik aminlarni aniqlash
- 2-qism: 4-aminoazobenzolni aniqlash

Ushbu standartni talqin qilish yoki qo'llashda tushunmovchiliklar yuzaga kelganda standartning asli yozilgan tillarining biridan foydalanish tavsiya etiladi.

---

**O'ZBEKISTON MILLIY STANDARTI**

---

**Charm. Bo'yalgan charmada azo bo'yoqlar miqdorini aniqlash usullari. 2-Qism.  
4-aminoazobenzolni aniqlash**

**Кожа. Методы определения содержания азокрасителей в окрашенной коже. Часть 2.  
Определение 4-аминоазобензола**

**Leather. Chemical tests for the determination of certain azocolourants in dyed  
leathers. Part 2. Determination of 4-aminoazobenzene**

---

Amalga kiritish sanasi 12.10.2024

**1 Qo'llanish doirasi**

ISO 17234 ning ushbu qismi ISO 17234-1 ga qo'shimcha bo'lib, 4-aminoazobenzolni chiqarishi mumkin bo'lgan mahsulotlarda ba'zi azo bo'yoqlardan foydalanishni aniqlashning maxsus tartibini tavsiflaydi. Jarayon, shuningdek, oldindan ishlov berishni kamaytirmasdan, tovarlarda erkin amin sifatida mavjud bo'lgan 4-aminoazobenzolni (solvent sariq 1) aniqlaydi.

4-aminoazobenzol hosil qila oladigan azo bo'yoqlar ISO 17234-1 shartlariga ko'ra anilin va 1,4-fenilendiamin aminlarini hosil qiladi. Ushbu 4-aminoazobenzol rang beruvchi moddalarning mavjudligini qo'shimcha ma'lumotsiz (masalan, ishlatiladigan rang beruvchining kimyoviy tuzilishi) yoki maxsus tartib-taomilsiz ishonchli tarzda aniqlash mumkin emas.

Evropa Parlamentining 1907/2006-sonli Nizomning (EC) XVII-ilovasida sanab o'tilgan bir yoki bir nechta boshqa aromatik aminlarning azo guruhi(lar)ini reduktiv bo'linish yo'li bilan ajralib chiqishi mumkin bo'lgan ba'zi azo bo'yoqlardan foydalanish. Kimyoviy moddalarni ro'yxatga olish, baholash, ruxsat berish va cheklash bo'yicha kengash (REACH), 4-aminoazobenzoldan tashqari, ushbu usul bilan miqdoriy jihatdan aniqlanmaydi.

**2 Standartlarga havolalar**

Quyidagi hujjatlar matnda shunday atalganki, ularning bir qismi yoki barcha mazmuni ushbu hujjat talablarini tashkil qiladi. Sanasi ko'rsatilgan havolalar uchun faqat keltirilgan nashr amal qiladi. Sanasi ko'rsatilmagan havolalar uchun havola qilingan hujjatning so'nggi nashri (shu jumladan har qanday tuzatishlar) qo'llaniladi.

ISO 2418 Charm. Kimyoviy fizik-mexanik va chidamlilik sinovlari. Namuna olish joyi (Leather. Chemical, physical and mechanical and fastness tests. Sampling location)

ISO 4044 Charm. Kimyoviy sinovlar. Kimyoviy sinov namunalarini tayyorlash (Leather. Chemical tests. Preparation of chemical test samples).

### 3 Umumiy qoidalar

Ba'zi azo bo'yoqlar azo guruhlarining reduktiv bo'linishi natijasida 4-aminoazobenzolni chiqarishi mumkin, bu Evropa Parlamentining 1907/2006-sonli Nizomning (EC) XVII-ilovasida va Ro'yxatga olish, baholash, ruxsat berish va Kimyoviy moddalarni cheklash (REACH) Kengashi boshqalar tomonidan taqiqlangan.

#### 1-jadval - 4-aminoazobenzol REACH 1907/2006 qoidalari/XVII-ilovada ko'rsatilgan

№	CAS raqami	Indeks raqami	EI raqami	Modda
22	60-09-3	611-008-00-4	200-453-6	4-aminoazobenzol

### 4 Tamoyil

Yog'sizlantirishdan so'ng, charm namunasi yopiq idishda 40 ° C haroratda gidroksidi eritmada natriy ditionit bilan ishlanadi. Jarayonda ajralib chiqadigan 4-aminoazobenzol suyuqlik-suyuqlik ekstraksiyasi yordamida tert-butil metil efir fazasiga o'tkaziladi. Tahlil uchun tert-butil metil efir fazasining alikvoti ishlatiladi.

4-aminoazobenzolni aniqlash va aniqlash diodli massiv detektori (DAD) yoki massa selektiv detektori (HPLC/MS) bilan yuqori samarali suyuqlik xromatografiyasi (HPLC), massa selektiv detektori (GC/MS) bilan kapillyar gaz xromatografiyasi yordamida yoki diodli massiv detektori (CE/DMD) bilan kapillyar elektroforez yoki yupqa qatlamli xromatografiya (TLC, HPTLC) yordamida amalga oshiriladi.

Agar 4-aminoazobenzol bitta xromatografik usul bilan aniqlansa, tasdiqlash bir yoki bir nechta alternativ usullar yordamida amalga oshiriladi. Aminlarni miqdoriy aniqlash [HPLC/DAD] usuli yordamida amalga oshiriladi.

### 5 Xavfsizlik talablari

5.1 4-Aminoazobenzol birikmalari insonning potensial kanserogenlari sifatida tasniflanadi.

Ushbu moddalar bilan ishlash va utilizatsiya qilish milliy sog'liqni saqlash va xavfsizlik qoidalariga qat'iy muvofiq amalga oshirilishi kerak.

5.2 Foydalanuvchi ushbu sinov usuli va tegishli materiallardan foydalanganda xavfsizlik choralariga rioya qilish uchun javobgardir. Materiallar xavfsizligi bo'yicha ma'lumotlar varaqlari va boshqa tavsiyalar kabi qo'shimcha ma'lumotlar uchun ishlab chiqaruvchilar bilan maslahatlashish kerak.

5.3 Yaxshi laboratoriya amaliyotiga rioya qilish tavsiya etiladi. Har qanday laboratoriya xonasida kukunli bo'yoqlar va 4-aminoazobenzol bilan ishlaganda himoya ko'zoynaklari, changga qarshi niqoblar va bir martalik qo'lqoplardan foydalanish kerak.

5.4 Foydalanuvchilar milliy va mahalliy xavfsizlik qoidalariga rioya qilishlari kerak.

### 6 Uskunalar

Standart laboratoriya jihozlaridan, xususan, quyidagilardan foydalaning.

6.1 Reaksiya uchun gaz o'tkazmaydigan tiqinli mos issiqlikka chidamli shisha idish.

6.2 (40 ± 2) °C haroratni ta'minlovchi isitgich.

- 6.3 3000 r/min dan ortiq aylanish tezligi bilan ajratuvchi.
- 6.4 Aylanadigan vakuumli bug'latgich.
- 6.5 Kerakli o'lchamdagi yoki har xil pipetkalar.
- 6.6 Sozlanishi isitish bilan kamida 160 W quvvatga ega ultratovushli vanna.
- 6.7  $5\text{ s}^{-1}$  yetarli chastotali gorizontal silkituvchi, yo'l uzunligi 2 dan 5 cm gacha.
- 6.8 2 ml hajmli polipropilen yoki polietilen shprits.
- 6.9 Instrumental uskunalar
  - 6.9.1 Massa selektiv detektor (MS) bilan gaz xromatografiyasi (GC).
  - 6.9.2 Gradientli elyusiya va diodli massiv fotometrik detektor (DAD) yoki massa selektiv detektor (MS) bilan yuqori samarali suyuqlik xromatografiyasi (HPLC).
  - 6.9.3 Tegishli aniqlash bilan yupqa qatlamli xromatografiya (TLC) yoki yuqori samarali yupqa qatlamli xromatografiya (HPTLC).
  - 6.9.4 DAD bilan kapillyar elektroforez (CE).
- Izoh - Uskunaning tavsifi A ilovada keltirilgan.

## 7 Reaktivlar

Agar boshqacha ko'rsatilmagan bo'lsa, analitik darajadagi kimyoviy moddalar qo'llaniladi.

### 7.1 Natriy gidroksidi.

**7.2 Natriy ditionitning suvli eritmasi**,  $p = 200\text{ mg/ml}^{1)}$ , yangi tayyorlangan, yopiq idishda 1 h turgandan keyin darhol foydalanish uchun.

### 7.3 Natriy gidroksid eritmasi, $w = 2\%$ <sup>2)</sup>

### 7.4 n-geksan.

### 7.5 tert-butil metil efir.

### 7.6 Natriy xlorid.

### 7.7 4-aminoazobenzol, o'ta toza.

### 7.8 Gaz xromatografiyasi (IS) uchun ichki standartlar, masalan:

- IS 1: naftalin-d 8 (CAS №: 1146-65-2);
- IS 2: 2, 4, 5-trikloroanilin (CAS №: 636-30-6);
- IS 3: benzidin-d 8 (CAS №: 92890-63-6);
- IS 4: antratsen-d 10 (CAS №: 1719-06-8).

### 7.9 Standart eritmalar

#### 7.9.1 tert-butilmetil efirdagi ichki standart (IS) eritmasi, $p = 10,0\text{ }\mu\text{g/ml}$ .

7.9.2 Tajriba jarayonini tekshirish va metanoldagi **4-aminoazobenzolning kalibrlash eritmalarini** tayyorlash uchun 4-aminoazobenzolning kalibrlash eritmasi,  $p = 500\text{ }\mu\text{g/ml}$ .

## 8 Namuna olish

Namuna olish ISO 2418 ga muvofiq amalga oshiriladi, charm namunalarini silliqlash ISO 4044 ga muvofiq amalga oshiriladi. Agar ISO 2418 ga muvofiq namuna olish imkoni bo'lmasa (masalan, tayyor mahsulotlardan - poyabzal, kiyim-kechak va boshqalardan olish), u holda namuna olish usuli namunalari sinov bayonnomasida tavsiflanishi kerak. Yelimning barcha izlari mexanik ravishda olib tashlanishi kerak.

<sup>1)</sup>  $p$  = massa konsentratsiyasi

<sup>2)</sup>  $w$  = massa ulushi (massa bo'yicha foiz)

Agar namuna ko'p rangli naqshli patchwork charm mahsulotidan olingan bo'lsa, iloji bo'lsa, turli rangdagi namunalar alohida tahlil qilinadi. Turli xil sifatli charmlardan tayyorlangan mahsulotlar uchun har xil sifatdagi charm namunalari alohida tahlil qilinadi.

## **9 Tartib-taomil**

### **9.1 Yog'sizlantirish**

Og'irligi 1,0 g dan ortiq bo'lgan charm, bo'laklarga bo'lingan (maydoni 25 mm<sup>2</sup>) yoki maydalangan charm namunasi 50 ml sig'imli yopiq idishga (6.1) joylashtiriladi, 20 ml n-geksan (7.4) bilan ultratovushli hammomda (6.6) haroratda  $(40 \pm 2) ^\circ\text{C}$  20 min davomida ishlov beriladi.

Charm namunasidan n-geksan qatlamini tushiring. Dekanatsiya paytida charm zarralarini yo'qotishdan qochish kerak. Dekanatsiyadan so'ng darhol namunani avvalgidek, n-geksanning 20 ml qismi bilan ishlang. Qolgan n-geksanni ochiq idishdan kamida bir kechada bug'lanadi.

### **9.2 Reduktiv bo'linish**

Namunga 9,0 ml natriy gidroksid eritmasidan (7.3) soling. Reaksiya idishini mahkam yoping va kuchli silkiting. Charm materialining barcha tolalari namlangan bo'lishi kerak.

Keyin shprints (6.8) yordamida 1,0 ml natriy ditionitning suvli eritmasidan (7.2) qo'shing.

Namuna va qaytaruvchi eritma kuchli chayqatiladi va 30 min aniq vaqt oralig'ida  $(40 \pm 2) ^\circ\text{C}$  haroratda saqlanadi. Keyin xona haroratiga ( $20 ^\circ\text{C}$  dan  $25 ^\circ\text{C}$  gacha) 1 min davomida suv yoki kerak bo'lganda muz, suv va tuzning sovutish aralashmasi bilan sovutib oling.

### **9.3 4-aminoazobenzolni ajratish va konsentratsiyasi**

Reaksiya eritmasiga 5,0 ml tert-butilmetil efir (7.5) yoki 5,0 ml ichki standart eritma (7.9.1) qo'shing. Shundan so'ng, 7,0 g natriy xlorid (7.6) qo'shing va aralashmani 45 daqiqa davomida chayqatish chastotasi  $f = 5 \text{ s}^{-1}$  (6.7) bilan doimiy ravishda chayqatiladi. Fazalarni to'liq ajratish uchun aralash chayqalgandan keyin sentrifuga qilinadi.

Sovutish va chayqatish o'rtasidagi kechikish vaqti 5 min dan oshmasligi kerak.

Keyingi tahlil uchun tert-butil metil efir fazasining alikvotini darhol yopilgan mos flakonga o'tkazing. 6.9-bandda keltirilgan xromatografik usullar bilan 4-aminoazobenzolni aniqlash va aniqlashni bajaring.

TAVSIYA - Ba'zi analitik usullar 9.3-bandda olingan ekstrakti konsentratsiyalashni yoki uni boshqa mos erituvchiga (masalan, metanol) o'tkazishni talab qilishi mumkin. Ekstraksiya qilingan tert-butilmetil efir fazasini past bosim va  $50 ^\circ\text{C}$  dan yuqori bo'lmagan haroratda vakuumli aylanadigan bug'latgichda taxminan 1,0 ml (quruqlikka qadar emas) ga konsentratsiyalash tavsiya etiladi. Keyin qolgan erituvchini vakuumsiz, inert gazning yumshoq oqimi yordamida juda ehtiyotkorlik bilan olib tashlang.

#### **Izohlar**

1 Erituvchini olib tashlash (vakuumli aylanadigan bug'latgichda konsentratsiya, quruqlikka bug'lanish) nazoratsiz bajarilsa, 4-aminoazobenzolning sezilarli yo'qotilishiga olib kelishi mumkin.

2 Mumkin bo'lgan hollarda, erituvchining o'zgarishiga yo'l qo'ymaslik kerak, chunki matritsa ta'siri tufayli tahlil paytida analitning sezilarli yo'qotilishi mumkin.

### **9.4 Kalibrlash eritmasi**

0,1 ml 4-aminoazobenzol kalibrlash eritmasiga (7.9.2) 5,0 ml tert-butilmetil efir (7.5) yoki 5,0 ml ichki standart eritma (7.9.1) qo'shing. Ushbu aralashma kalibrlash uchun ishlatiladi, chunki bu usul yordamida fazalarni ajratishdan 4-aminoazobenzolning tiklanishi 95 % dan 100 % gacha.



### 9.5 Analitik tizimni sinovdan o'tkazish

Ushbu tartib-taomilni tekshirish uchun 0,1 ml 4-aminoazobenzol kalibrlash eritmasi (7.9.2) 9.2 va 9.3 ga muvofiq qayta ishlanadi. 4-aminoazobenzolning ekstraksiya darajasi kamida 60 % bo'lishi kerak.

### 9.6 Xromatografik tahlil

4-aminoazobenzolni aniqlash 6.9-bandda keltirilgan xromatografik usullar yordamida amalga oshirilishi mumkin. Boshqa tasdiqlangan usullardan ham foydalanish mumkin. 4-aminoazobenzolni miqdoriy aniqlash HPLC/DAD yoki GC/MS usuli yordamida amalga oshiriladi. Agar gaz xromatografiyasidan foydalanilsa, tegishli ichki standartlar (7.8) qo'llaniladi.

## 10 Natijalarni baholash

4-aminoazobenzol miqdori odatda kompyuter dasturi yordamida hisoblanadi. Hisoblash. tepalik joylari yordamida qo'lda amalga oshirilishi mumkin.

### 10.1 Ichki standart yordamida hisoblash

4-aminoazobenzolning konsentratsiyasi quyidagi formuladan foydalanib, namunaning kilogrammiga milligramda (mg/kg) massa ulushi, u/ sifatida hisoblanadi:

$$w = \rho_c \times \frac{A_s \times A_{ISC} \times V}{A_c \times A_{ISS} \times m_E}$$

bu yerda

$\rho_c$  - kalibrlash eritmasidagi 4-aminoazobenzolning mkg/ml konsentratsiyasi;

$A_s$  - namuna eritmasida 4-aminoazobenzolning maksimal maydoni, maydon birliklarida;

$A_c$  - kalibrlash eritmasida 4-aminoazobenzolning eng yuqori maydoni, maydon birliklarida;

$A_{ISS}$  - namunali eritmadagi ichki standartning eng yuqori maydoni, maydon birliklarida<sup>3)</sup>;

$A_{ISC}$  - kalibrlash eritmasidagi ichki standartning eng yuqori maydoni, maydon birliklarida<sup>4)</sup>;

$V$  - 9.3 ga muvofiq namunaning hajmi (yakuniy namuna hajmi), millilitrda (ml);

$m_E$  - charm namunasining massasi, gramm (g).

### 10.2 Ichki standartsiz hisoblash

4-aminoazobenzolning konsentratsiyasi quyidagi formuladan foydalanib, namunaning kilogrammiga milligramda (mg/kg) massa ulushi, u/ sifatida hisoblanadi:

$$w = \rho_c \times \frac{A_s \times V}{A_c \times m_E}$$

<sup>3)</sup> GC/MS yordamida miqdorni aniqlash uchun.

<sup>4)</sup> GC/MS yordamida miqdorni aniqlash uchun.

Bu yerda

$P_c$  - kalibrlash eritmasidagi 4-aminoazobenzolning konsentratsiyasi, mikrogramda millilitr ( $\mu\text{g/ml}$ );

$A_s$  - namuna eritmasidagi 4-aminoazobenzolning eng yuqori maydoni, maydon birliklarida;

$A_c$  - kalibrlash eritmasidagi 4-aminoazobenzolning eng yuqori maydoni, maydon birliklarida;

$V$  - 9.3 ga muvofiq namunaning hajmi (yakuniy namuna hajmi), millilitrda (ml); bu erda: 5 ml;

$m_E$  - charm namunasining massasi, gramm (g).

### 10.3 Usulning ishonchliligi

Usulning ishonchliligi to'g'risidagi ma'lumotlar B ilovada keltirilgan.

## 11 Sinov bayonnomasi

Sinov bayonnomasi ushbu rasmiy usulga murojaat qilishi va quyidagi ma'lumotlarni o'z ichiga olishi kerak:

- a) ushbu standartga havola;
- b) namunaning turi, kelib chiqishi va belgilanishi (agar ulardan foydalanilgan bo'lsa, to'liq bo'lmagan namuna);
- v) namuna olingan sana va tahlil qilingan sana;
- d) namuna olish tartibi;
- e) aniqlash usuli va miqdorini aniqlash usuli;
- f) 4-aminoazobenzolning konsentratsiyasi va aniqlash chegarasi kabi analitik natijalar kilogramm boshiga milligramm ( $\text{mg/kg}$ ). Natijalarni talqin qilishda ehtiyot bo'lish kerak 30  $\text{mg/kg}$  dan kam bo'lgan 4-aminoazobenzol qiymatini olish (C ilovaga qarang).

**A ilova**  
(ma'lumot uchun)

**Xromatografik tahlillar**

**A.1 Dastlabki izoh**

Laboratoriyalarning instrumental jihozlari (6.9) har xil bo'lishi mumkinligi sababli, xromatografik tahlillar uchun umumiy qo'llaniladigan ko'rsatmalar berilmaydi. Quyidagi parametrlar muvaffaqiyatli sinovdan o'tkazildi va foydalanildi.

**A.2 Yuqori samarali suyuqlik xromatografiyasi (HPLC) (miqdoriy tartib-taomil)**

**A.2.1 Yuqori samarali suyuqlik xromatografiyasi/diodli massiv detektor (HPLC-DAD)**

Eluent 1: metanol;

Eluent 2: 1000 ml suvda 0,575 g ammoniy dihidrogenfosfat + 0,7 g disodiy gidrogenfosfat, pH = 6,9;

Statsionar faza: Zorbax SB-Phenyl®<sup>5)</sup> (5 µm); (250 × 4,6) mm;

Oqim tezligi: (0,7 dan 1,0) ml/min;

Gradient: A.1-jadvalga qarang.

**A.1-jadval — Gradient dasturi**

<b>Vaqt min</b>	<b>Eluent 1 %</b>	<b>Eluent 2 %</b>
0	0	100
5	10	90
10	10	90
27	68	32
29	100	0

Ustun harorati: 30 °C;

Inyeksiya hajmi: 10,0 µl;

Aniqlash: DAD, spektrograf;

Miqdori: 240 nm, 280 nm va 305 nm va 380 nm da.

**A.2.2 Yuqori samarali suyuqlik xromatografiyasi/massa selektiv detektor (HPLC/DAD/MS)**

Eluent 1: asetonitril;

Eluent 2: ammoniy asetat 1000 ml suvda, 5 mmol, pH 3,0;

Statsionar faza: Zorbax Eclipse XDB C18<sup>6)</sup> (3,5 µm); (50 × 2,1) mm;

Oqim tezligi: 300 µl/min;

Gradient: A.2-jadvalga qarang;

<sup>5)</sup> Zorbax SB-Phenyl® tijoratda mavjud bo'lgan mos mahsulotga misoldir. Ushbu ma'lumot ushbu hujjat foydalanuvchilari uchun qulaylik sifatida taqdim etilgan va bu mahsulot ISO tomonidan tasdiqlanmaydi.

<sup>6)</sup> Zorbax Eclipse XDB C18 tijoratda mavjud bo'lgan mos mahsulotga misoldir. Ushbu ma'lumot ushbu hujjat foydalanuvchilariga qulaylik yaratish uchun berilgan va bu mahsulot ISO tomonidan tasdiqlanmaydi.

**A.2-jadval — Gradient dasturi**

<b>Vaqt min</b>	<b>Eluent 1 %</b>	<b>Eluent 2 %</b>
0	10	90
1,5	20	80
7,5	90	10

Ustun harorati 40 °C;

Inyeksiya hajmi: 2,0 µl;

Aniqlash: to'rt kutupli va/yoki ion tutqichli massa detektor, skanerlash rejimi va/yoki MS qiz ion MSni aniqlash; DAD: to'lqin uzunliklari uchun A.2.1 ga qarang;

Spray gaz: azot (shisha / generator);

Ionizatsiya: API elektrosprey musbat, parchalanuvchi 120 V.

**A.3 Kapilyar gaz xromatografiyasi (GC-MS) (miqdoriy tartib-taomil)**

Kapilyar ustun: ZB-5-(Zebron)<sup>7)</sup>, uzunligi: 30 m, ichki diametri: 0,25 mm, plyonka qalinligi: 0,25 µm

Injektor tizimi: ajralmas;

Injektor harorati: 250 °C;

Tashuvchi gaz: geliy;

Harorat dasturi: 50 °C (3 min), 50 °C dan 280 °C gacha (15 °C/min), 280 °C (6 min);

Inyeksiya hajmi: 1,0 µl, bo'linmasdan 2 min;

Aniqlash: MS

**A.4 Kapilyar elektroforez (CE-DAD) (miqdoriy tartib-taomil)**

250 µl namuna eritmasi (9.3) 50 µl HCl (c = 0,01 mol/l) bilan aralashtiriladi va membranali filtdan (0,2 µm) o'tkaziladi. Bu eritma kapilyar zona elektroforezi yordamida tahlil qilinadi.

Kapilyar 1: 56 cm, qoplamasiz, ichki diametri 50 µm, kengaytirilgan yorug'lik yo'li bilan;

Kapilyar 2: 56 cm, polivinil spirti (PVA) bilan qoplangan, ichki diametri 50 µm, kengaytirilgan yorug'lik yo'li;

Bufer eritmasi: fosfat bufer eritmasi (c = 50 mmol/l), pH 2,5;

Ustun harorati: 25 °C;

Kuchlanish: 30 kV;

Inyeksiya vaqti: 4 s;

Yuvish vaqti: 5 s;

Aniqlash: DAD spektrografi 214 nm, 254 nm.

**A.5 Yupqa qatlamli xromatografiya (TLC) (miqdoriy tartib-taomil); HPTLC yoki TLC faqat yarim kantitativ tasdiqlash uchun****A.5.1**

Plitalar (HPTLC): floresans indikatorli silikagel 60 F254, (20 × 10) cm;

Qo'llaniladigan hajm: (2–5) µl, nuqta qo'llaniladi;

Mobil erituvchi 1: xloroform/sirka kislotasi (90 + 10) hajmda qism.

<sup>7)</sup> ZB-5-(Zebron) tijoratda mavjud bo'lgan mos mahsulotga misoldir. Ushbu ma'lumot ushbu hujjat foydalanuvchilariga qulaylik yaratish uchun berilgan va bu mahsulot ISO tomonidan tasdiqlanmaydi.

**A.5.2**

Plitalar (TLC): silikagel 60, floresan indikator F254 bilan, (20 × 20) cm;

Qo'llaniladigan hajm: 10,0 µl, chiziq sifatida qo'llaniladi;

Mobil erituvchi 2: xloroform / etil asetat / sirka kislotasi (60 + 30 + 10) hajm qismlari;

Mobil erituvchi 3: xloroform/metanol (95 + 5) hajmdagi qismlar;

Mobil erituvchilar 2 va 3: plitalarni quritmasdan ketma-ket.

**A.5.3**

Aniqlash: 1. ultrabinafsha (UV) chiroq;

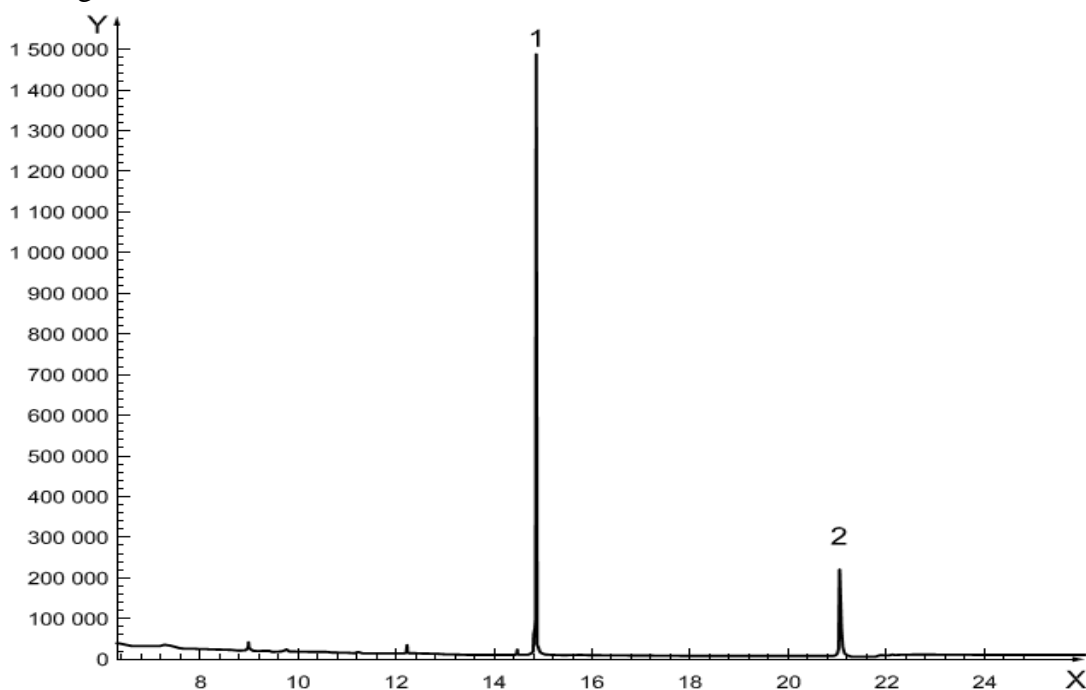
2. 2 va 3 reagentlar bilan ketma-ket ishlov berishdan so'ng, reaksiya vaqti taxminan 5 min;

1-reaktiv: HCL tarkibidagi 0,1 % NaNO<sub>2</sub> (c = 1 mol/l);

2-reaktiv: KOH tarkibidagi 0,2 % α -naftol (c = 1 mol/l);

**A.6 Xromatogramma va spektrlarga misollar**

Xromatogramma va spektrlarga misollar A.1 dan A.4 gacha bo'lgan rasmlarda ko'rsatilgan.



Bu yerda

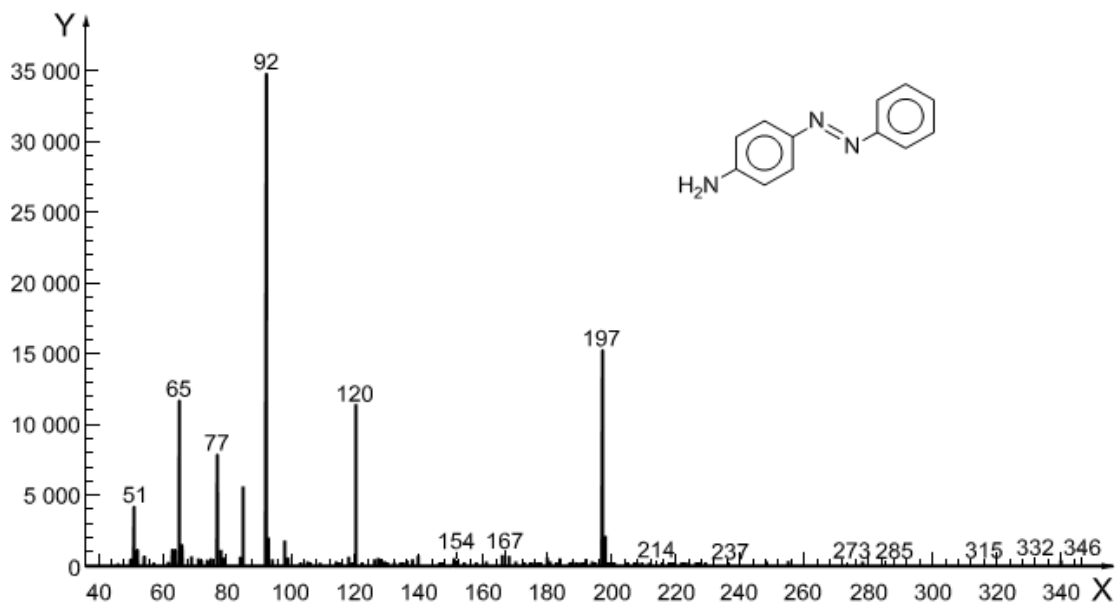
X vaqt

Y ortiqcha

1 ichki standart

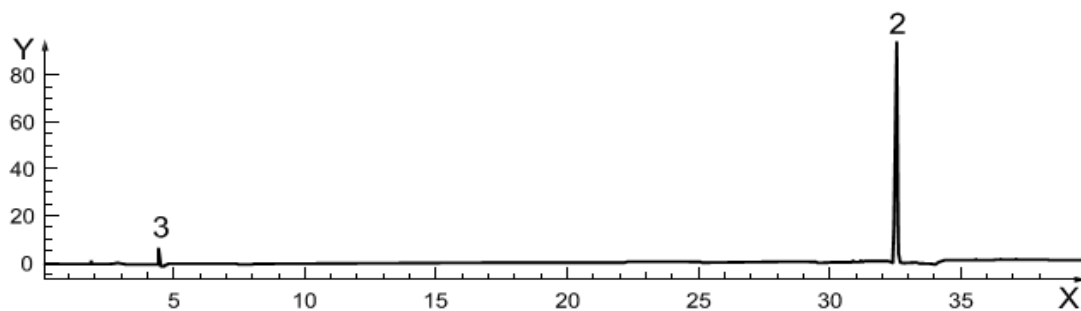
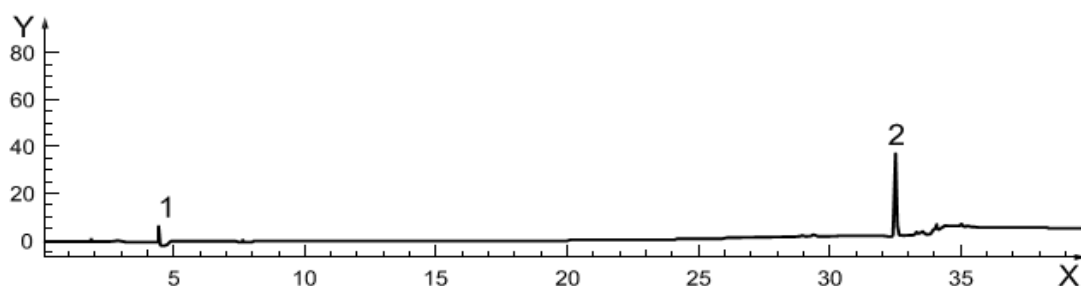
2 4-aminoazobenzol

**A.1 – Rasm. 4-aminoazobenzol GC/MS ning umumiy ion oqimi xromatogrammasi**



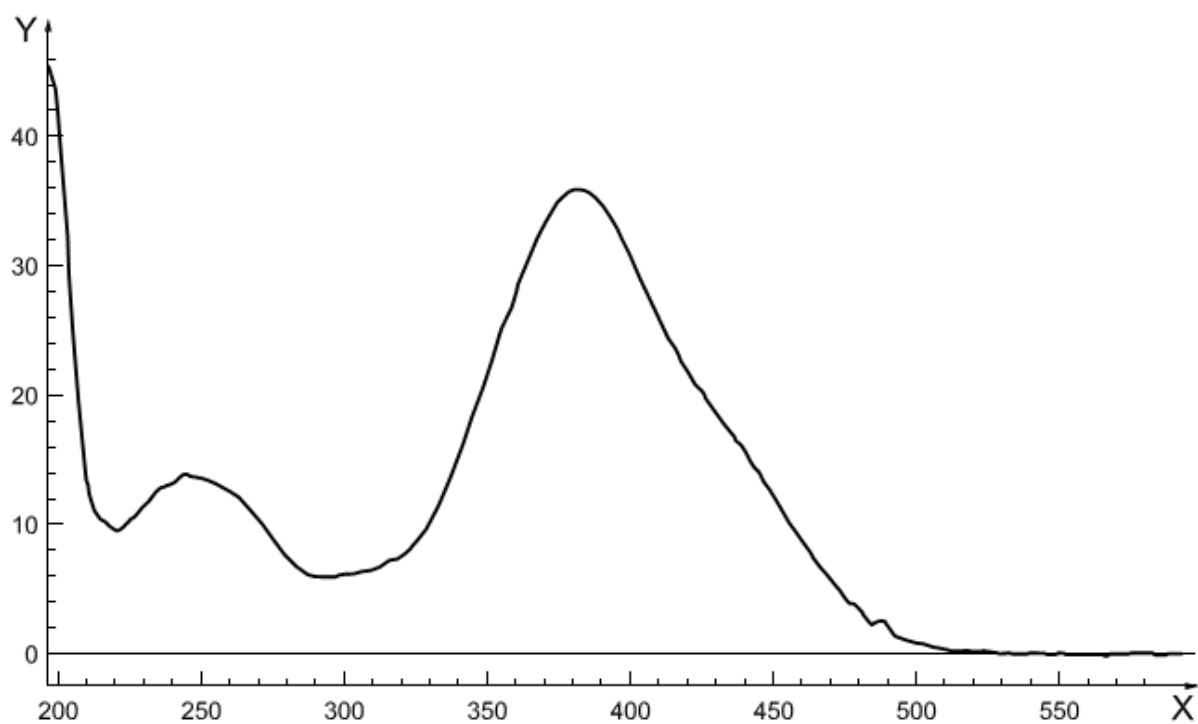
Bu yerda  
X m/z  
Y ortiqcha

#### A.2 – Rasm. GC/MS 70 eV spektri va 4-aminoazobenzolning tuzilishi



Bu yerda  
X min  
Y mAU  
1 DAD A, Sig = 240  
2 4-aminoazobenzol  
3 DAD B, Sig = 380

#### A.3 – Rasm. 4-aminoazobenzol HPLC/DAD ning xromatogrammasi; 240 nm va 380 nm da aniqlash



Bu yerda

X mn

Y mAU

**A.4-Rasm. 4-aminoazobenzolning HPLC/DAD spektri**

**B ilova**

(ma'lumot uchun)

**Usulning ishonchliligi**

B.1-jadvalda teridagi 4-aminoazobenzolni aniqlash uchun olib borilgan laboratoriyalararo sinovlar keltirilgan.

**B.1-jadval — Laboratoriyalararo sinovlar natijalari. Teri tarkibidagi  
4-aminoazobenzolning hosil bo'lgan darajasini aniqlash<sup>[1]</sup>**

**B.1-jadval - Laboratoriyalararo sinov - Aniq ma'lumotlar**

Parametr	Analitik tartib-taomil	
	GC/MS	HPLC
Ishtirokchi laboratoriyalar soni	10	11
Chiqib ketishlar soni	2	2
Cheklovlarni bartaraf etgandan keyin laboratoriyalar soni	8	9
O'rtacha qiymat, $\bar{x}$ , mg/kg	81,9	91,2
Takrorlanuvchanlik, $r$ , mg/kg	21,4	27,1
Takrorlanuvchanlikning standart og'ishi, $s_r$ , mg/kg	7,6	9,7
Qaytariluvchanlik, $R$ , mg/kg	32,5	35,9
Qaytariluvchanlikning standart og'ishi, $s_R$ , mg/kg	11,6	12,5

Ushbu rasmiy usul Germaniya BVL kompaniyasining "Taqiqlangan azo bo'yoqlar tahlili" ishchi guruhi tomonidan ishlab chiqilgan va 11 ishtirokchi bilan halqali testda tekshirilgan.

a) Halqa sinovi natijalarining takrorlanuvchanligi va qaytariluvchanligini baholashda quyidagilarni hisobga olish kerak:

1) Halqa sinovi shuni ko'rsatdiki, rang beruvchining qaytaruvchi agentga nisbati va qaytaruvchining yoshi agent miqdoriy natijaga hal qiluvchi ta'sir ko'rsatishi mumkin. Shuning uchun reduktiv bo'linishni 9.2-bandda tavsiflangan shartlarga qat'iy rioya qilgan holda bajarish tavsiya etiladi (vaqt, harorat va miqdor haqida ma'lumot).

2) Yana bir muhim fakt suyuqlik/suyuqlik ekstraksiyasi, masalan. 4-aminoazobenzolning azo-bog'lanish parchalanishining keyingi reaksiyasini oldini olish uchun suvli va organik fazalarni ajratish. Shuning uchun 9.3-bandda ko'rsatilgan shartlarga aniq rioya qilish qat'iy tavsiya etiladi.

b) halqani sinash uchun charm namunasi kesilgan va rangsiz charm bilan aralashtirilgan odatiy tovardan olingan. Shunday qilib, materialning bir hilligini kamaytirish mumkin.

c) Boshqa tegishli ichki standartlarni qo'llash GC/MSD protsedurasining yuqori ishonchliligiga olib kelishi mumkin. Biroq, bu atama halqa testini baholashda hisobga olinmadi.



**C ilova**

(ma'lumot uchun)

**Baholash bo'yicha qo'llanma. Analitik natijalarni sharhlash**

Ominlarning juda oz miqdorda olinishi noto'g'ri ijobiy natijalarga olib kelishi mumkinligi sababli, REACH 1907/2006 Nizomning XVII ilovasi namuna materialining 30 mg/kg chegara qiymatini belgilaydi. Bu qiymat faqat matritsa va rang bo'yicha bir hil bo'lgan namunaviy material uchun amal qiladi, lekin heterojen tarkibdagi aralash namunaga emas.

Agar 4-aminoazobenzolning aniqlangan miqdori 30 mg/kg dan ortiq bo'lsa, ma'lum bir azo rang beruvchi ishlatilgan deb taxmin qilish kerak. 30 mg/kg dan past bo'lsa, hozirda ishlatiladigan bo'yoqlarning turi va/yoki tozaligi yoki foydalanilgan boshqa xom ashyo kabi qo'shimcha ma'lumotlarsiz ba'zi azo bo'yoqlardan foydalanish to'g'risida ishonchli bayonot berish mumkin emas.

Shu nuqtai nazardan, tahliliy natijalarni quyidagicha hisobot qilish tavsiya etiladi:

**4-aminoazobenzolning hosil bo'lgan darajasida « 30 mg/kg**

– O'tkazilgan tahlillarga ko'ra, taqdim etilgan tovarda o'zlarining azoguruh/slarini reduktiv bo'linish yo'li bilan 4-aminoazobenzol chiqarishi mumkin bo'lgan azo bo'yoq moddalari aniqlanmagan.

**4-aminoazobenzolning hosil bo'lgan darajasi > 30 mg/kg**

– O'tkazilgan tahlillarga ko'ra, taqdim etilgan tovar REACH 1907/2006 Nizomning XVII-ilovasida taqiqlangan azo bo'yoqlardan foydalangan holda ishlab chiqarilgan yoki ishlov berilgan deb taxmin qilinadi.

**Bibliografiya**

[1] Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB B 82.02-9:2006-09 / BVL B 82.02-9:2006-09 Berichtigung 2008-04 – Nachweis der Verwendung von Azofarst, die 4-Aminoazobenzol freisetzen können

[2] Kimyoviy moddalarni ro‘yxatga olish, baholash, ruxsat berish va cheklash bo‘yicha Yevropa Parlamenti va Kengashning (REACH) 1907/2006-sonli Nizomi (EC), XVII ilova

**Bibliografik ma’lumotlar**

SUT 59.140.30