

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 13643:2023

Xuất bản lần 1

**MỸ PHẨM – PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH –
ĐỊNH TÍNH CÁC CHẤT MÀU BỊ CẤM BẰNG PHƯƠNG
PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO (HPLC)**

*Cosmetics – Analytical methods – Identification of prohibited colourants by
high-performance liquid chromatography (HPLC)*

HÀ NỘI – 2023

Lời nói đầu

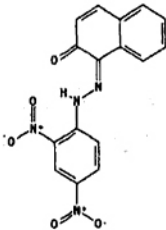
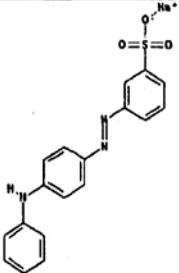
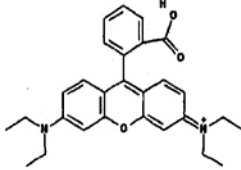
TCVN 13643:2023 được xây dựng trên cơ sở tham khảo ACM 002 - *Identification of prohibited colourants in cosmetic products by TLC and HPLC*

TCVN 13643:2023 do Viện Kiểm nghiệm Thuốc thành phố Hồ Chí Minh biên soạn, Bộ Y tế đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Lời giới thiệu

Chất màu là phụ gia thường được sử dụng trong một số sản phẩm mỹ phẩm, mặc dù chiếm tỷ lệ nhỏ nhưng lại quan trọng tạo màu sắc, vẻ đẹp cho sản phẩm. Các chất màu gồm có chất màu vô cơ và hữu cơ, có từ nhiều nguồn khác nhau và không phải tất cả đều được phép sử dụng trong mỹ phẩm. Vì an toàn cho người sử dụng, khối ASEAN đã quy định một số các chất màu bị cấm trong Phụ lục chất không được dùng trong mỹ phẩm (Phụ lục II), trong đó có Pigment Orange 5 (PO5), Metanil Yellow (MY) và Rhodamine B (RB).

Bảng 1- Các chất màu cấm trong mỹ phẩm

Tên	Công thức phân tử	CI number	Danh pháp IUPAC	Cấu trúc phân tử
Pigment Orange 5 (PO5)	$C_{16}H_{10}N_4O_5$	12075	1-[(2,4-dinitrophenyl) diazenyl] naphthalen-2-ol	
Metanil Yellow (MY)	$C_{18}H_{14}N_3NaO_3$ S	13065	sodium;3-[(4-anilinophenyl) diazenyl]benzenesulfonate	
Rhodamine B (RB)	$C_{28}H_{31}ClN_2O_3$	45170 & 45170 : 1	[9-(2-carboxyphenyl)-6-(diethylamino)xanthen-3-ylidene]-diethylazanium chloride.	

Một số phương pháp định tính chất màu bị cấm bằng sắc ký lớp mỏng và sắc ký lỏng hiệu năng cao theo được diễn trong và ngoài nước.

Phương pháp phân tích này sử dụng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao đầu dò PDA hoặc tương đương định tính các chất màu trên trong sản phẩm mỹ phẩm.

Mỹ phẩm – Phương pháp phân tích – Định tính các chất màu bị cấm bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

Cosmetics – Analytical methods – Identification of prohibited colourants by high-performance Liquid chromatography (HPLC)

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp định tính các chất màu bị cấm sau đây trong mỹ phẩm.

Bảng 2- Thông tin các chất màu phân tích

Tên chất màu	Số C.I.
1. Pigment Orange 5	12075
2. Metanil Yellow	13065
3. Rhodamine B	45170 và 45170:1

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn này. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi, bổ sung (nếu có).

TCVN 4851:1989 (ISO 3696:1987), *Nước dùng để phân tích trong phòng thí nghiệm - Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử*

3 Nguyên tắc

Các chất màu bị cấm trong các sản phẩm mỹ phẩm được chiết và được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) với đầu dò PDA hoặc tương đương.

4 Thuốc thử

Tất cả thuốc thử được sử dụng phải là loại tinh khiết phân tích, dùng cho sắc ký lỏng hiệu năng cao hoặc có chất lượng tương đương.

CẢNH BÁO: Công việc phân tích phải được tiến hành trong môi trường phòng thử nghiệm phù hợp, được trang bị bảo hộ cá nhân (ví dụ: kính bảo hộ, quần áo bảo hộ lao động, găng tay).

4.1 Dicloromethan

4.2 Methanol

4.3 *N,N* - dimethylformamid

4.4 *n*-Hexan

4.5 Nước

4.6 Acid orthophosphoric

4.7 Tetrabutylamonium (TBA) hydroxyd 20 % trong nước

4.8 Kali hydroxyd

4.9 Dung môi pha mẫu, được chuẩn bị bằng cách trộn hỗn hợp *N,N*-dimethylformamid (4.3) – acid orthophosphoric (4.6) theo tỷ lệ (95:5).

4.10 Pha động, dung dịch TBA hydroxyd 0,005 M – nước (75:25)

Dung dịch TBA hydroxyd 0,005 M được chuẩn bị như sau: Hòa 65 mL dung dịch TBA hydroxyd (4.7) với nước (4.5) vừa đủ 100 mL, chuyển dung dịch vào cốc, thêm 2,8 g KOH (4.8) và khuấy cho tan hoàn toàn, chỉnh đến pH = 7 với acid orthophosphoric (3.6) được dung dịch TBA hydroxyd 0,5 M. Lấy chính xác 10 mL dung dịch TBA hydroxyd 0,5 M pha loãng thành 1 lít với methanol (4.2). Dung dịch sẽ bị đục để cho tủa lắng xuống trong vài h. Lọc qua màng Lọc PTFE 0,45 µm (5.2).

4.11 Ether dầu hòa, (khoảng sôi 40 + 60 °C hoặc 60 + 80 °C)

4.12 Chất chuẩn

4.12.1 Pigment Orange 5

4.12.2 Metanil Yellow và Rhodamine B

5 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm thông thường và cụ thể như sau:

5.1 Hệ thống máy sắc ký lỏng hiệu năng cao với đầu dò PDA hoặc tương đương được trang bị bơm, hệ thống bơm mẫu tự động, bộ điều nhiệt cho cột, detector và phần mềm xử lý số liệu

5.2 Màng lọc PTFE, kích thước lỗ lọc 0,45 µm hoặc tương đương

5.3 Màng lọc nylon, kích thước lỗ lọc 0,45 µm hoặc tương đương

5.4 Máy trộn vortex hoặc bể siêu âm

5.5 Bể cách thủy

5.6 Giấy lọc Whatman

5.7 Bình định mức, loại A với các dung tích khác nhau

6 Cách tiến hành

6.1 Chuẩn bị dung dịch chuẩn

6.1.1 Pigment Orange 5 (0,1 mg/mL)

Cân chính xác khoảng 10 mg Pigment Orange 5, chính xác đến 0,01 mg vào bình định mức 100 mL (5.7). Thêm 50 mL dicloromethan (4.1) hoặc dung môi pha mẫu (4.9). Siêu âm 30 min, điền đến vạch bằng dung môi tương ứng.

6.1.2 Metanil Yellow và Rhodamin B (0,1 mg/mL)

Cân chính xác khoảng 10 mg chuẩn vào bình định mức 100 mL (5.7). Thêm 50 mL methanol (4.2) hoặc *N,N* - dimethyl formamid (4.3) hoặc dung môi pha mẫu (4.9). Siêu âm 5 min, điền đến vạch bằng dung môi tương ứng.

6.2 Chuẩn bị dung dịch thử

6.2.1 Mẫu dạng mỹ phẩm có màu

Cân khoảng 1,000 g mẫu thử, chính xác đến 0,1 mg, thêm chính xác 20 mL dung môi pha mẫu (4.9). Siêu âm 5 min. Nếu cần, đun nóng trong bể cách thủy (5.5) khoảng 90 °C trong 30 min hoặc cho đến khi mẫu thử phân tán.

Lưu ý: Nếu mẫu nghi ngờ có chứa Pigment Orange 5, có thể tiến hành chiết với dicloromethan (4.1).

Đối với các mẫu thử dạng dầu, chiết xuất phần chất béo 2 lần với 5 mL *n*-hexan (4.4) mỗi lần. Gộp các dịch chiết *n*-hexan. Nếu dịch *n*-hexan có màu, chiết lại với 2 mL dung môi pha mẫu (4.9). Loại bỏ lớp *n*-hexan.

Lọc lớp dung môi pha mẫu đã chiết qua màng lọc màng lọc nylon 0,45 µm (5.3).

6.2.2 Mẫu dạng sản phẩm tẩy rửa và các mỹ phẩm thân nước

Cân chính xác khoảng 1,000 g mẫu thử (tùy thuộc vào Lượng màu có trong mẫu) chính xác đến 0,1 mg. Thêm 20 mL dung môi pha mẫu (4.9) và đun nóng trong bể cách thủy (5.5) khoảng 90 °C trong 10 min. Để nguội đến nhiệt độ phòng và Lọc qua màng Lọc PTFE 0,45 µm (5.2).

Lượng dầu thừa có thể Loại bỏ bằng cách chiết với 40 mL ether dầu hòa (4.11).

Lưu ý: Nếu màu xuất hiện trong Lớp ether dầu hòa, cho thấy sự có mặt các chất màu tan trong dầu, giữ lớp này và bốc hơi đến cạn.

6.3 Điều kiện sắc ký

- Pha động: Dung dịch TBA hydroxyd 0,005 M – nước (75 : 25)
- Nhiệt độ buồng cột: 30 °C.
- Tốc độ dòng: 1 mL/min
- Detector PDA hoặc tương đương bước sóng phát hiện 435 nm và 535 nm
- Khoảng bước sóng: 275 + 760 nm
- Thể tích tiêm mẫu: 10 µL
- Thời gian chạy: 35 min

7 Đánh giá kết quả

7.1 So sánh thời gian lưu và phổ hấp thụ UV-Vis của pic trong sắc ký đồ của dung dịch mẫu thử với pic trong sắc ký đồ của dung dịch chuẩn tương ứng.

7.2 Nếu thời gian lưu của pic trong sắc ký đồ của dung dịch mẫu thử với pic trong sắc ký đồ của dung dịch chuẩn khác biệt không quá 2 % và phổ hấp thụ UV-Vis của pic trong dung dịch thử phải tương thích với pic trong dung dịch chuẩn cho phép kết luận sự có mặt của chất màu chuẩn tương ứng.

Lưu ý

- Phổ hấp thụ UV-Vis của pic tương ứng trong dung dịch thử với phổ hấp thụ UV-Vis của pic trong dung dịch chuẩn có chỉ số tương đồng không ít hơn 90 %.
- Nếu một chất màu nghi ngờ có mặt, thêm chất màu chuẩn vào trong mẫu thử. Trên sắc ký đồ của mẫu thử thêm chuẩn phải cho 1 pic duy nhất của chất màu nghi ngờ có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic chất màu này thu được từ dung dịch chuẩn.
- Có thể cần thử nghiệm xác nhận thêm bằng phương pháp phổ khối.

8 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm:

- a) Tất cả thông tin cần thiết để nhận biết mẫu;
- b) Tất cả thông tin cần thiết để nhận biết phòng thí nghiệm thực hiện thử nghiệm;
- c) Viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) Ngày và quy trình lấy mẫu (nếu biết);
- e) Ngày nhận mẫu phòng thí nghiệm;
- f) Ngày kết thúc thử nghiệm;

g) Kết quả thu được và đơn vị biểu thị kết quả;

h) Bất kỳ thao tác nào không được qui định trong tiêu chuẩn này, hoặc được xem là tùy chọn, cùng với mọi tình huống bất thường có thể ảnh hưởng đến kết quả thử nghiệm.

i) Nhận dạng và chữ ký của người chịu trách nhiệm đối với báo cáo thử nghiệm.

Phụ lục A

(Tham khảo)

Thông tin phương pháp HPLC

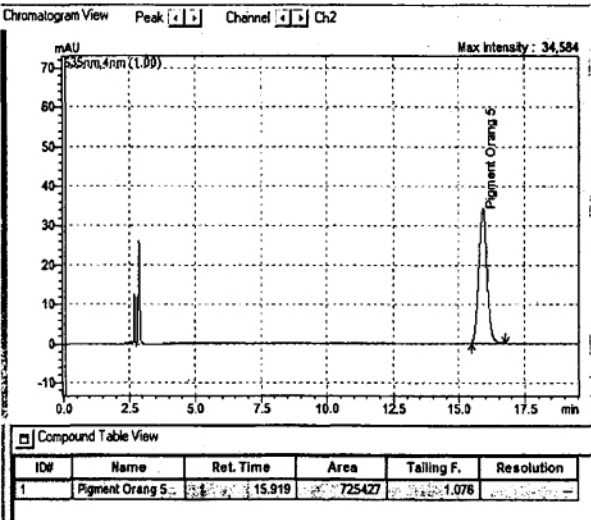
Bảng A.1- Bước sóng phát hiện tối ưu và thời gian lưu của các chất màu chuẩn

Tên chất màu	Số C.I.	Bước sóng phát hiện	Thời gian lưu ước tính (min)
1. Pigment Orange 5	12075	535 nm	13
2. Metanil Yellow	13065	435 nm	3
3. Rhodamine B	45170 và 45170:1	535 nm	6

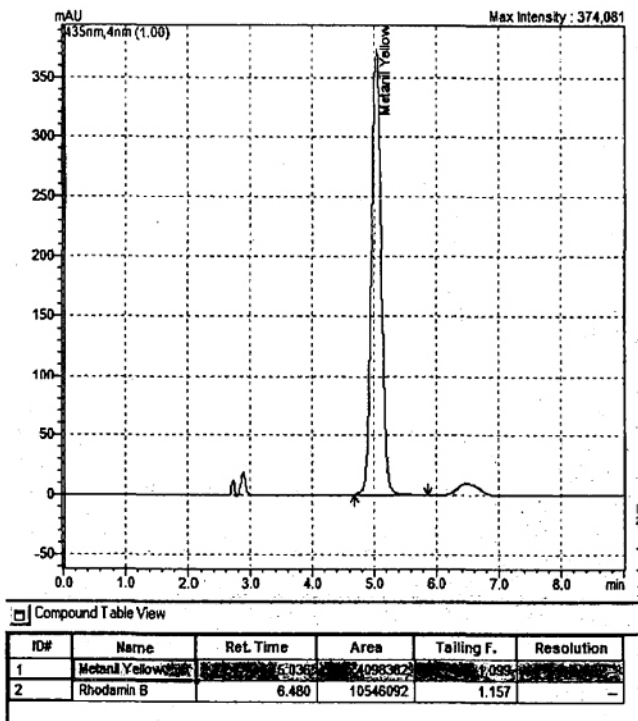
Bảng A.2- Giới hạn phát hiện (LOD)

Tên chất màu	Mỹ phẩm có màu (µg/g)	Mỹ phẩm các sản phẩm tẩy rửa (µg/g)
1. Pigment Orange 5	153	32
2. Metanil Yellow	70	6
3. Rhodamine B	800	80

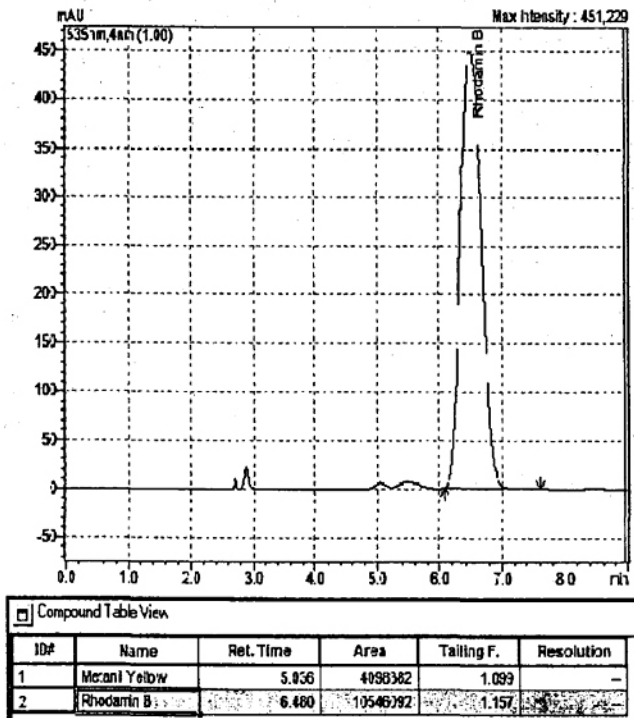
- Pigment Orange 5, Metanil Yellow và Rhodamine B được liệt kê trong Annex II – Danh mục các chất bị cấm trong sản phẩm mỹ phẩm.



Hình A.1- Sắc kí và thông tin pic Pigment Orange 5



Hình A.2- Sắc kí và thông tin pic Metanil Yellow



Hình A.3- Sắc kí và thông tin pic Rhodamine B

Phụ lục B

(Tham khảo)

Phương pháp định tính các chất màu bị cấm bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng (TLC)

B.1 Phạm vi áp dụng

Phương pháp này dùng để định tính các chất màu bị cấm ở bảng 2 trong mỹ phẩm.

B.2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau đây là rất cần thiết khi áp dụng phương pháp này. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các bản sửa đổi, bổ sung (nếu có).

B.3 Nguyên tắc

Các chất màu bị cấm trong các sản phẩm mỹ phẩm được chiết và xác định bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng (TLC).

B.4 Thuốc thử

Tất cả thuốc thử được sử dụng phải là loại tinh khiết phân tích hoặc có chất lượng tương đương

CẢNH BÁO: Công việc phân tích phải được tiến hành trong môi trường phòng thử nghiệm phù hợp, được trang bị bảo hộ cá nhân (ví dụ: kính bảo hộ, quần áo bảo hộ lao động, găng tay).

B.4.1 Dung dịch amoni hydroxyd 28%

B.4.2 n-Butanol

B.4.3 Dicloromethan

B.4.4 Ethyl acetat

B.4.5 Ethanol 96 % (tt/tt)

B.4.6 Acid acetic băng

B.4.7 Isobutanol

B.4.8 Isopropanol

B.4.9 Methanol

B.4.10 N,N-Dimethylformamid

B.4.11 Acid orthophosphoric 85 %

B.4.12 Ether dầu hòa, (khoảng sôi $40 + 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ hoặc $60 + 80\text{ }^{\circ}\text{C}$)

B.4.13 n-Hexan

B.4.14 Dung môi pha mẫu, được chuẩn bị bằng cách trộn N,N-dimethylformamid (4.10) – acid orthophosphoric (B.4.11) theo tỷ lệ (95:5)

B.4.15 Hệ dung môi khai triển, mẫu thử và mẫu chuẩn sẽ được phân tích bằng TLC sử dụng các hệ dung môi được liệt kê dưới đây:

B.4.15.1 Dùng cho các chất màu tan trong dầu

DS1: Dicloromethan (hay methylen clorid)

B.4.15.2 Dùng cho các chất màu tan trong nước

DS2: Ethyl acetat – methanol – [dung dịch amoni hydroxyd 28% trong nước (3:7)] (15:3:3). Dung dịch pha ngay trước khi sử dụng.

DS3: Ethanol – nước – isobutanol – dung dịch amoni hydroxyd 28% (31:32:40:1).

DS4: Isopropanol – dung dịch amoni hydroxyd 28% (100:25)

DS5: n-butanol – ethanol – nước – acid aceticbăng (60:10:20:0,5)

DS6: Ethyl acetat – n-butanol – dung dịch amoni hydroxyd 28% (20:55:25)

B.4.16 Chất chuẩn

B.4.16.1 Pigment Orange 5

B.4.16.2 Metanil Yellow và Rhodamin B

B.5 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm thông thường và cụ thể như sau:

B.5.1 Bàn mỏng TLC, silica gel 60 F254, 20 cm x 20 cm; bề dày 0,25 mm (Merck hoặc tương đương)

B.5.2 Bình sắc ký, có kích thước phù hợp với bàn mỏng

B.5.3 Mao quản chấm sắc ký – micropipet, ($1 \pm 5\text{ }\mu\text{L}$)

B.5.4 Giấy sắc ký (giấy bảo hòa bình sắc ký)

B.5.5 Màng lọc PTFE, kích thước lỗ lọc $0,45\text{ }\mu\text{m}$ hoặc tương đương

B.5.6 Máy lắc (vortex)

B.5.7 Đèn soi UV, bước sóng 254 nm

B.5.8 Bể cách thủy

B.5.9 Giấy lọc Whatman

TCVN 13643:2023

B.5.10 Cân phân tích, có thể cân chính xác đến 0,1 mg; 0,01 mg

B.5.11 Bình định mức, loại A với các dung tích khác nhau

B.5.12 Pipet thủy tinh, loại A với các dung tích khác nhau

B.6 Cách tiến hành

B.6.1 Chuẩn bị dung dịch chuẩn

B.6.1.1 Dung dịch Pigment Orange 5 (0,1 mg/ml)

Cân chính xác khoảng 10 mg Pigment Orange 5, chính xác đến 0,01 mg, vào bình định mức 100 mL (B.5.11). Thêm 50 ml dicloromethan (B.4.3) hoặc dung môi pha mẫu (B.4.14). Siêu âm 30 min, bổ sung đến thể tích bằng cùng dung môi.

B.6.1.2 Dung dịch Metanil Yellow và Rhodamine B (0,1 mg/ml)

Cân chính xác khoảng 10 mg Metanil Yellow hoặc Rhodamine B riêng biệt, chính xác đến 0,01 mg, vào bình định mức 100 mL (B.5.11). Thêm 50 ml methanol (B.4.9) hoặc *N,N*-dimethylformamid (B.4.10) hoặc dung môi pha mẫu (B.4.14). Siêu âm 5 min, bổ sung đến thể tích bằng cùng dung môi tương ứng.

B.6.2 Chuẩn bị dung dịch thử

B.6.2.1 Mẫu dạng mỹ phẩm có màu

Cân khoảng 1,000 g mẫu thử, chính xác đến 0,1 mg, thêm 20 ml dung môi pha mẫu (B.4.14). Siêu âm 5 min. Nếu cần, đun nóng trong bể cách thủy (B.5.8) khoảng 90 °C trong 30 min hoặc cho đến khi mẫu thử phân tán.

Lưu ý: Nếu mẫu nghi ngờ có chứa Pigment Orange 5, có thể tiến hành chiết với dicloromethan (B.4.3).

Đối với các mẫu thử dạng dầu, chiết xuất phần chất béo 2 lần với 5 mL *n*-hexan (B.4.13) mỗi lần. Gộp các dịch chiết *n*-hexan. Nếu dịch *n*-hexan có màu, chiết lại với 2 mL dung môi pha mẫu (B.4.14). Loại bỏ lớp *n*-hexan.

Lọc lớp dung môi pha mẫu qua màng lọc PTFE 0,45 µm (B.5.5). Sử dụng dịch lọc cho việc chấm lên bản mỏng.

B.6.2.2 Mẫu dạng sản phẩm tẩy rửa và các mỹ phẩm thân nước

Cân khoảng 1,000 g mẫu thử (tùy thuộc vào lượng màu có trong mẫu) chính xác đến 0,1 mg. Thêm 20 mL *N,N*-dimethyl formamid (B.4.10) và đun nóng trong bể cách thủy (B.5.8) khoảng 90 °C trong 10 min. Để nguội đến nhiệt độ phòng và lọc qua màng lọc PTFE 0,45 µm (B.5.5). Các chất màu hữu cơ sẽ tan trong dung môi pha mẫu.

Lượng dầu có thể loại bỏ bằng cách chiết với 40 mL ether dầu hỏa (B.4.12). Lớp dung môi pha mẫu được bốc hơi đến khô trên bề điều nhiệt. Nếu màu xuất hiện trong lớp ether dầu hỏa, cho thấy sự có mặt các chất màu tan trong dầu, giữ lớp này và bốc hơi đến khô.

Lưu ý: Để tinh chế sạch hơn, dung dịch màu có thể được nạp lên bản TLC nhiều nhất có thể. Triển khai bản mỏng bằng hệ DS1 (B.4.15.1) để loại dầu. Triển khai tiếp với hệ DS2 (B.4.15.2) để tách các chất màu tan trong nước.

Lấy các băng màu khỏi bản mỏng và để riêng.

Chiết lại các chất màu trong silica gel bằng methanol (B.4.9), lọc và bốc hơi đến cạn.

B.6.3 Tiến hành sắc ký

B.6.3.1 Mẫu dạng mỹ phẩm có màu

Cho giấy sắc ký vào bình triển khai. Bảo hòa bình với hệ dung môi thích hợp. Chấm lên vạch xuất phát của bản mỏng.

- 5 µL mẫu chuẩn.
- 5 µL mẫu thử.
- Tất cả các hệ dung môi, trừ dicloromethan, được triển khai ở nhiệt độ phòng cho đến khi dung môi di chuyển được khoảng 15 cm từ vạch xuất phát.

Lưu ý: Với dicloromethan, triển khai bản mỏng đến khi dung môi di chuyển được khoảng 11 cm kể từ vạch xuất phát. Lấy bản mỏng và để khô ở nhiệt độ phòng.

B.6.3.2 Mẫu dạng sản phẩm tẩy rửa và các mỹ phẩm thân nước

Hòa tan cần thu được (B.6.2.2) trong 0,5 + 1 mL methanol, lọc qua màng lọc PTFE 0,45 µm (B.5.5). Chấm 5 µL mẫu chuẩn và mẫu thử lên bản mỏng. Triển khai với hệ dung môi thích hợp và để khô ở nhiệt độ phòng.

Lưu ý:

- Với chất màu tan trong nước (Metanil Yellow và Rhodamine B), có thể sử dụng hệ DS2 đến DS6.
- Với chất màu tan trong dầu (Pigment Orange 5), sử dụng hệ DS1. Hệ DS2 có thể dung trong sàng lọc ban đầu.

B.7 Đánh giá kết quả

B.7.1 Tính giá trị R_f cho mỗi vết bằng công thức sau đây:

$$R_f = \frac{a}{b}$$

Trong đó:

a: khoảng cách từ điểm xuất phát đến tâm của vết.

b: khoảng cách đường đi của dung môi.

B.7.2 So sánh các vết thu được từ mẫu thử với các vết mẫu chuẩn tương ứng về trị số R_f và màu sắc soi dưới ánh sáng thường và đèn soi UV, bước sóng 254 nm (B.5.7).

- Trường hợp dương tính: Mẫu thử phải cho vết có màu sắc và R_f tương ứng với vết của mẫu chuẩn đối chiếu.

B.7.3 Thông tin tham khảo

Bảng B.1- So sánh các vết thu được từ mẫu thử với các vết mẫu

Tên chất màu	Số CI	Màu sắc của vết	R _f ước tính				
			DS1	DS2	DS3	DS4	DS5
1. Pigment Orange 5	CI 12075	Cam	0,4				
2. Metanil Yellow	CI 13065	Vàng		0,4	0,9	0,7	0,6
3. Rhodamine B	CI 45170	Hồng sáng		0,8	0,8	0,7	0,4

Bảng B.2- Giới hạn phát hiện (LOD) phương pháp TLC

Chất màu	Mỹ phẩm có màu (µg/g)	Các sản phẩm tẩy rửa (µg/g)
1. Pigment Orange 5	133 ÷ 400	0,4 ÷ 4
2. Metanil Yellow	33 ÷ 100	0,1 ÷ 1
3. Rhodamine B	266 ÷ 800	0,8 ÷ 8