

II

(Atti per i quali la pubblicazione non è una condizione di applicabilità)

COMMISSIONE

QUARTA DIRETTIVA DELLA COMMISSIONE

dell'11 ottobre 1985

concernente il ravvicinamento delle legislazioni degli stati membri relative ai metodi di analisi necessari per controllare la composizione dei prodotti cosmetici

(85/490/CEE)

LA COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE,
visto il trattato che istituisce la Comunità economica europea,

vista la direttiva 76/768/CEE del Consiglio, del 27 luglio 1976, concernente il ravvicinamento delle legislazioni degli stati membri relative ai prodotti cosmetici ⁽¹⁾, modificata da ultimo dalla direttiva 85/391/CEE ⁽²⁾, in particolare l'articolo 8, paragrafo 1,

considerando che la direttiva 76/768/CEE prevede l'esecuzione di controlli ufficiali dei prodotti cosmetici al fine di accertare che siano osservate le condizioni prescritte dalle disposizioni comunitarie per quanto concerne la composizione dei prodotti cosmetici;

considerando che occorre definire al più presto tutti i metodi di analisi necessari; che a tal fine sono già state portate a termine tre tappe essendo stati definiti taluni metodi nelle direttive 80/1335/CEE ⁽³⁾, 82/434/CEE ⁽⁴⁾ e 83/514/CEE ⁽⁵⁾ della Commissione; che la fissazione dei metodi d'identificazione e di dosaggio del 4-amminobenzoato di glicerolo, di dosaggio del clorobutanolo, d'identificazione e di dosaggio della chinina, d'identificazione e di dosaggio dei solfiti e bisolfiti inorganici, d'identificazione e di dosaggio dei clorati dei metalli alcalini, d'identificazione e di dosaggio dello iodato di sodio costituisce la quarta tappa;

considerando che le misure previste dalla presente direttiva sono conformi al parere del comitato per l'adeguamento al progresso tecnico della direttiva 76/768/CEE,

HA ADOTTATO LA PRESENTE DIRETTIVA:

Articolo 1

Gli stati membri prendono tutte le misure necessarie affinché, all'atto dei controlli ufficiali dei prodotti cosmetici,

- l'identificazione e il dosaggio del 4-amminobenzoato di glicerolo,
 - il dosaggio del clorobutanolo,
 - l'identificazione e il dosaggio della chinina,
 - l'identificazione e il dosaggio dei solfiti e bisolfiti inorganici,
 - l'identificazione e il dosaggio dei clorati dei metalli alcalini,
 - l'identificazione e il dosaggio dello iodato di sodio
- vengano effettuati in conformità dei metodi descritti nell'allegato.

Articolo 2

Gli stati membri mettono in vigore le disposizioni legislative, regolamentari e amministrative necessarie per conformarsi alle disposizioni della presente direttiva entro il 31 dicembre 1986.

Essi ne informano immediatamente la Commissione.

Articolo 3

Gli stati membri sono destinatari della presente direttiva.

Fatto a Bruxelles, l'11 ottobre 1985.

Per la Commissione

Stanley CLINTON DAVIS

Membro della Commissione

⁽¹⁾ GU n. L 262 del 27. 9. 1976, pag. 169.

⁽²⁾ GU n. L 224 del 22. 8. 1985, pag. 40.

⁽³⁾ GU n. L 383 del 31. 12. 1980, pag. 27.

⁽⁴⁾ GU n. L 185 del 30. 6. 1982, pag. 1.

⁽⁵⁾ GU n. L 291 del 24. 10. 1983, pag. 9.

ALLEGATO

IDENTIFICAZIONE E DOSAGGIO DEL 4-AMMINOBENZOATO DI GLICEROLO

A. IDENTIFICAZIONE

1. OGGETTO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Il metodo è destinato ad evidenziare la presenza dell'estere monoglicerico dell'acido 4-amminobenzoico e permette altresì di identificare l'estere etilico dell'acido 4-amminobenzoico (benzocaina DCI) eventualmente presente come impurezza.

2. PRINCIPIO

L'identificazione si effettua mediante cromatografia su strato sottile di gel di silice con indicatore di fluorescenza, ed evidenziazione della funzione aminica primaria libera attraverso la formazione di un colorante azoico sulla lastrina.

3. REATTIVI

Tutti i reattivi devono essere di purezza analitica.

3.1. Miscela solvente: Cicloesano/propan-2-olo/diclorometano stabilizzato: 48:64:9 (v/v/v).

3.2. Solvente di sviluppo: Etere di petrolio (40-60 °C)/Benzene/Acetone/Ammonio idrossido soluzione (concentrazione minima in NH₃ 25 %): 35:35:35:1 (v/v/v/v).

3.3. Rivelatore: Soluzione a):

sodio nitrito: 1,0 g in 100 ml di HCl M (da preparare immediatamente prima dell'uso).

Soluzione b):

2-naftolo: 0,2 g in 100 ml di KOH M.

3.4. Soluzioni di riferimento:

— Estere monoglicerico dell'acido 4-amminobenzoico:
0,050 g in 100 ml della miscela solvente (3.1).

— Estere etilico dell'acido 4-amminobenzoico:
0,050 g in 100 ml della miscela solvente (3.1).

3.5. Lastrine di gel di silice 60 F254, di spessore 0,25 mm, dimensioni 20 × 20 cm, tipo Sil 60G 25 HR/UV 254 o equivalenti.

4. APPARECCHIATURA

4.1. Apparecchiatura comune per cromatografia su strato sottile.

4.2. Bagno ad ultrasuoni.

4.3. Filtri Millipore FH, di porosità 0,5 µm o equivalenti.

5. MODALITÀ OPERATIVE

5.1. Preparazione del campione

Pesare 1,5 g del prodotto da analizzare in una provetta graduata da 10 ml con tappo a smeriglio, portare a 10 ml con la miscela solvente (3.1). Tappare e lasciare per un'ora a temperatura ambiente in un bagno ad ultrasuoni (4.2). Filtrare con filtro Millipore (4.3). Utilizzare il filtrato per la cromatografia.

5.2. Cromatografia su strato sottile

Su di una lastrina (3.5) depositare 10 µl del filtrato (5.1) e 10 µl di ciascuna soluzione di riferimento (3.4). Sviluppare il cromatogramma per 15 cm in una vaschetta previamente saturata con il solvente (3.2).

5.3. Identificazione

5.3.1. Osservare la lastrina alla lunghezza d'onda di 254 nm.

5.3.2. Sulla lastrina perfettamente essiccata, spruzzare la soluzione (3.3.a).

Lasciare asciugare a temperatura ambiente per 1 minuto e spruzzare immediatamente la soluzione (3.3.b).

Essiccare la lastrina in stufa a + 60 °C.

Le macchie appaiono colorate in arancio. R_f dell'estere monoglicerico dell'acido 4-amminobenzoico 0,07; R_f dell'estere etilico dell'acido 4-amminobenzoico 0,55.

B. DOSAGGIO

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Il metodo descrive il dosaggio dell'estere monoglicerico dell'acido 4-amminobenzoico e consente altresì il dosaggio dell'estere etilico dell'acido 4-amminobenzoico. Tale metodo è idoneo al dosaggio di un massimo del 5 % (m/m) dell'estere monoglicerico dell'acido 4-amminobenzoico e dell'1 % (m/m) dell'estere etilico dell'acido 4-amminobenzoico.

2. DEFINIZIONE

Il contenuto in estere monoglicerico dell'acido 4-amminobenzoico e in estere etilico dell'acido 4-amminobenzoico, determinato col presente metodo, è espresso in percentuale di massa (% m/m) del prodotto.

3. PRINCIPIO

Il prodotto da analizzare è opportunamente trattato, ed il dosaggio viene effettuato per cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC).

4. REATTIVI

Tutti i reattivi devono essere di purezza analitica, ed in particolare idonei per la cromatografia liquida ad alta pressione.

4.1. Metanolo.

4.2. Diidrogeno ortofosfato di potassio KH_2PO_4 .4.3. Di(acetato) di zinco diidrato $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.4.4. Acido acetico: $d_{4^{\circ}}^{20^{\circ}} = 1,05$.4.5. Potassio ferrocianuro triidrato $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$.

4.6. Estere etilico dell'acido 4-idrossibenzoico.

4.7. Estere monoglicerico dell'acido 4-amminobenzoico.

4.8. Estere etilico dell'acido 4-amminobenzoico (benzocaina).

4.9. Soluzione tampone 0,02 M: sciogliere 2,72 g di diidrogeno ortofosfato di potassio (4.2) in 1 000 ml di acqua.

4.10. Eluente: Soluzione tampone (4.9)/Metanolo (4.1): 61/39 (v/v). La composizione della fase mobile può essere modificata affinché il fattore di risoluzione R sia $\geq 1,5$.

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

dove:

R_1 e R_2 = tempi di ritenzione espressi in minuti di due sostanze;

W_1 e W_2 = ampiezza degli stessi picchi misurata a metà altezza ed espressa in mm;

d' = velocità di scorrimento della carta del registratore espressa in mm/min.

4.11. Soluzione di riserva di estere monoglicerico dell'acido 4-amminobenzoico: Pesare esattamente circa 40 mg di estere monoglicerico dell'acido 4-amminobenzoico. Introdurli in un pallone tarato da 100 ml. Dissolvere in 40 ml di metanolo (4.1). Portare a volume con la soluzione tampone (4.9) e mescolare.

4.12. Soluzione di riserva di estere etilico dell'acido amminobenzoico: Pesare esattamente circa 40 mg di estere etilico dell'acido amminobenzoico. Introdurli in un pallone tarato da 100 ml. Dissolvere in 40 ml di metanolo (4.1). Portare a volume con la soluzione tampone (4.9) e mescolare.

4.13. Soluzione contenente lo standard interno: Pesare esattamente circa 50 mg di estere etilico dell'acido 4-idrossibenzoico, introdurli in un pallone tarato da 100 ml e solubilizzarli in 40 ml di metanolo (4.1). Portare a volume con la soluzione tampone 0,02 M (4.9) e mescolare.

4.14. Soluzioni di riferimento: Mediante una dissoluzione in 100 ml d'eluente (4.10) preparare quattro soluzioni di riferimento conformemente alla seguente tabella:

Soluzioni di riferimento	Estere monoglicerico dell'acido 4-amminobenzoico		Estere etilico dell'acido amminobenzoico		Estere etilico dell'acido amminobenzoico	
	ml (4.11)	$\mu\text{g/ml}$ (*)	ml (4.12)	$\mu\text{g/ml}$ (*)	ml (4.13)	$\mu\text{g/ml}$ (*)
I	2	8	2	8	10	50
II	4	16	3	12	10	50
III	6	24	4	16	10	50
IV	10	40	5	20	10	50

(*) Questi valori sono dati a titolo indicativo e corrispondono alla pesata esatta delle soluzioni 4.11, 4.12 e 4.13.

NB: Queste soluzioni possono essere ottenute in modi diversi.

- 4.15 Soluzione di Carrez I: Sciogliere 26,5 g di potassio ferrocianuro (4.5) in acqua e portare a volume in pallone tarato da 250 ml.
- 4.16 Soluzione di Carrez II: sciogliere 54,9 g di (acetato) di zinco (4.3) e 7,5 ml di acido acetico (4.4) in acqua e portare a volume in pallone tarato da 250 ml.
- 4.17. Lichrosorb RP-18 o equivalente da 5 µm.

5. APPARECCHIATURA

- 5.1. Materiale comune di laboratorio.
- 5.2. Cromatografo liquido ad alta pressione accoppiato con rivelatore UV a lunghezza d'onda variabile, e camera di termostatazione fissata a 45 °C.
- 5.3. Colonna in acciaio inossidabile:
lunghezza: 250 mm,
diametro interno: 4,6 mm,
riempimento: Lichrosorb RP-18 (4.17).
- 5.4. Bagno ad ultrasuoni.

6. MODALITÀ OPERATIVE

6.1. Preparazione del campione

- 6.1.1. Pesare esattamente circa 1,0 g di campione in un becher da 100 ml e aggiungere 10 ml di metanolo (4.1).
- 6.1.2. Porre per 20 minuti il becher in un bagno ad ultrasuoni (5.4). Travasare la sospensione così ottenuta in un pallone tarato da 100 ml, impiegando al massimo 75 ml di eluente (4.10). Aggiungere successivamente 1 ml di soluzione di Carrez I (4.15) e 1 ml di soluzione di Carrez II (4.16) mescolando dopo ogni operazione. Portare a volume con l'eluente (4.10), mescolare nuovamente e filtrare su filtro di carta a pieghe.
- 6.1.3. Mediante una pipetta introdurre 3,0 ml del filtrato ottenuto al punto 6.1.2 e 5,0 ml della soluzione contenente lo standard interno (4.13) in un pallone tarato da 50 ml.

Portare a volume con l'eluente (4.10) e mescolare. Utilizzare la soluzione così ottenuta per procedere all'analisi cromatografia come descritto al punto 6.2.

6.2. Cromatografia

- 6.2.1. Regolare il flusso della fase mobile (4.10) a 1,2 ml/min, e la temperatura della colonna a 45 °C.
- 6.2.2. Fissare la lunghezza d'onda del rivelatore (5.2) a 274 nm.
- 6.2.3. Iniettare nel cromatografo (5.2) 20 µl della soluzione (6.1.3) e misurare la superficie dei picchi.

6.3. Curve di taratura

- 6.3.1. Iniettare 20 µl di ciascuna delle soluzioni di riferimento (4.14) e misurare la superficie dei picchi.
- 6.3.2. Calcolare i rapporti delle superfici dei picchi dell'estere monoglicerico dell'acido 4-amminobenzoico e dei picchi dello standard interno (4.6) e tracciare la curva di taratura riportando i suddetti rapporti in ordinata e ponendo in ascissa i rapporti in ordinata e ponendo in ascissa i rapporti delle masse corrispondenti.
- 6.3.3. Eseguire lo stesso procedimento per l'estere etilico dell'acido 4-amminobenzoico.

7. CALCOLO

- 7.1. Sulle curve di taratura, ottenute al punto 6.3, leggere i rapporti di massa R_{p1} e R_{p2} corrispondenti ai rapporti tra le superfici dei picchi calcolati come indicato ai punti 6.2.3 e 6.3.1 dove:

R_{p1} = rapporto delle masse dell'estere monoglicerico dell'acido 4-amminobenzoico/estere etilico dell'acido 4-idrossibenzoico;

R_{p2} = rapporto delle masse dell'estere etilico dell'acido 4-amminobenzoico/estere etilico dell'acido 4-idrossibenzoico.

- 7.2. A partire dai rapporti di massa così ottenuti, calcolare il contenuto in estere monoglicerico dell'acido 4-amminobenzoico e dell'estere etilico dell'acido 4-amminobenzoico espresso come percentuale di massa (% m/m), mediante le seguenti formule :

$$g \% (m/m) \text{ di estere monoglicerico dell'acido 4-amminobenzoico} = R_{p1} \times \frac{q}{6p}$$

$$g \% (m/m) \text{ di estere etilico dell'acido 4-amminobenzoico} = R_{p2} \times \frac{q}{6p}$$

dove :

q = quantità in mg di estere etilico dell'acido 4-idrossibenzoico, pesata come descritto al punto 4.13 ;

p = quantità in g di campione, pesata come descritto al punto 6.1.1.

8. RIPETIBILITÀ⁽¹⁾

- 8.1. Per un contenuto uguale al 5 % (m/m) in estere monoglicerico dell'acido 4-amminobenzoico, la differenza tra i risultati di due dosaggi effettuati in parallelo sullo stesso campione non deve superare lo 0,25 %.
- 8.2. Per un contenuto uguale all'1 % (m/m) in estere etilico dell'acido 4-amminobenzoico, la differenza tra i risultati di due dosaggi effettuati in parallelo sullo stesso campione non deve superare lo 0,10 %.

9. OSSERVAZIONI

- 9.1. Prima di iniziare l'analisi è opportuno accertarsi che il campione non contenga composti il cui picco possa coincidere con quello dello standard interno.
- 9.2. Per assicurarsi dell'assenza di interferenze, ripetere la determinazione modificando del 10 % la proporzione di metanolo presente nella fase mobile.

DOSAGGIO DEL CLOROBUTANOLO

1. OGGETTO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Questo metodo è destinato alla determinazione del clorobutanolo fino ad una concentrazione dello 0,5 % (m/m) in tutti i prodotti cosmetici ad eccezione degli aerosol.

2. DEFINIZIONE

Il contenuto di clorobutanolo misurato con questo metodo è espresso come percentuale di massa (% m/m) di prodotto.

3. PRINCIPIO

Dopo appropriato trattamento del campione da analizzare si effettua la determinazione con un metodo gas cromatografico usando 2,2,2-tricloroetanolo come standard interno.

4. REATTIVI

Tutti i reattivi devono essere analiticamente puri.

- 4.1. Clorobutanolo (1,1,1-tricloro-2-metil-propan-2-olo).
- 4.2. 2,2,2-tricloroetanolo.
- 4.3. Alcool etilico assoluto.
- 4.4. Soluzione standard di clorobutanolo : 0,025 g in 100 ml di alcool etilico (4.3).
- 4.5. Soluzione standard di 2,2,2-tricloroetanolo : 4 mg in 100 ml di alcool etilico (4.3).

5. APPARECCHIATURA

- 5.1. Normale apparecchiatura di laboratorio.
- 5.2. Gas cromatografo equipaggiato con detector a cattura di elettroni, alimentato da NI⁶³.

6. METODO

6.1. Preparazione del campione

Pesare accuratamente una quantità di campione compresa tra 0,1 e 0,3 g. Trasferirla in un matraccio tarato da 100 ml. Solubilizzarla con etanolo (4.3), aggiungere 1 ml di soluzione di standard interno (4.5) e portare a volume con etanolo (4.3).

⁽¹⁾ Secondo la norma ISO 5725.

6.2. Condizioni gas cromatografiche

6.2.1. Le condizioni operative devono essere tali da fornire un fatto di risoluzione $R \geq 1,5$ dove:

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

dove:

 R_1 e R_2 = tempi di ritenzione espressi in minuti di due picchi; W_1 e W_2 = ampiezza degli stessi picchi misurata a metà altezza ed espressa in mm; d' = velocità di scorrimento della carta del registratore espressa in mm/min.

6.2.2. Come esempio, le seguenti condizioni forniscono la risoluzione richiesta:

Colonna	I	II
Materiale di costruzione	vetro	acciaio inossidabile
Lunghezza	1,8 m	3 m
Diametro interno	3 mm	3 mm
Fase stazionaria	Carbowax 20 M TPA al 10 % supportato su Gaschrom Q 80 — 100 mesh	OV 17 al 5 % supportato su Chromosorb WAW DMCS 80 — 100 mesh
Condizionamento	2 — 3 giorni a 190 °C	—
Temperatura:		
— iniettore	200 °C	150 °C
— colonna	150 °C	100 °C
— detector	200 °C	150 °C
Gas di trascinamento	Azoto	Argon/Metano (95/5 v/v)
Flusso	35 ml/min	35 ml/min

6.3. Curva di taratura

In cinque matracci tarati da 100 ml aggiungere 1 ml di soluzione standard (4.5) e rispettivamente 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6 ml di soluzione (4.4), portando a volume con etanolo (4.3) ed agitando. Iniettare 1 µl di ognuna di queste soluzioni nel cromatografo nelle condizioni operative descritte al punto 6.2.2 e tracciare la curva di taratura riportando sulle ascisse il rapporto delle masse del clorobutanolo rispetto al 2,2,2-tricloroetano e sulle ordinate il rapporto delle aree dei picchi corrispondenti.

7. CALCOLO

7.1. Calcolare dalla curva di taratura (6.3) la quantità « a », espressa come µg di clorobutanolo, nella soluzione (6.1).

7.2. Il contenuto di clorobutanolo nel campione è calcolato secondo la formula:

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

8. RIPETIBILITÀ⁽¹⁾

Per un contenuto di clorobutanolo uguale allo 0,5 % (m/m) la differenza tra i risultati di due dosaggi effettuati in parallelo sullo stesso campione non deve superare lo 0,01 %.

NB

Se il risultato è uguale o superiore alla concentrazione massima autorizzata, occorre verificare l'assenza di interferenze.

⁽¹⁾ Secondo la norma ISO 5725.

IDENTIFICAZIONE E DOSAGGIO DELLA CHININA

A. IDENTIFICAZIONE

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Questo metodo descrive l'identificazione della chinina negli shampoo e nelle lozioni per capelli.

2. PRINCIPIO

L'identificazione si effettua mediante cromatografia su strato sottile di gel di silice ed evidenziazione della fluorescenza blu a 360 nm della chinina sviluppata in ambiente acido.

Per conferma si può abolire questa fluorescenza per mezzo di vapori di bromo e far comparire una fluorescenza giallastra con vapori di ammoniaca.

3. REATTIVI

Tutti i reattivi devono essere di purezza analitica.

3.1. Lastrina di gel di silice di spessore pari a 0,25 mm, senza indicatore di fluorescenza, di dimensioni pari a 200 mm × 200 mm.

3.2. Solvente di sviluppo: Toluene/etere dietilico/diclorometano/dietilammina: 20:20:20:8 (v/v/v/v)

3.3. Metanolo.

3.4. Acido solforico 96 % (d_{4}^{20} : 1,84).

3.5. Etere dietilico.

3.6. Reattivo di evidenziazione: Aggiungere, con cautela, 5 ml di acido solforico (3.4) a 95 ml di etere dietilico (3.5) in un recipiente refrigerato.

3.7. Bromo

3.8. Ammoniaca 28 % (d_{4}^{20} : 0,90).

3.9. Chinina anidra.

3.10. Soluzione di riferimento: Pesare esattamente circa 100 mg di chinina anidra (3.9) e solubilizzarli con metanolo (3.3) portandoli a volume in un matraccio tarato da 100 ml.

4. APPARECCHIATURA

4.1. Apparecchiatura comune per cromatografia su strato sottile.

4.2. Bagno ad ultrasuoni.

4.3. Filtri Millipore FH 0,5 µm o analoghi con opportuna attrezzatura filtrante.

5. MODALITÀ OPERATIVE

5.1. Preparazione del campione

Pesare con precisione una quantità di prodotto cosmetico tale da contenere circa 100 mg di chinina. Introdurla in un matraccio tarato da 100 ml, solubilizzare e portare a volume con metanolo (3.3).

Lasciare per un'ora a temperatura ambiente in bagno ad ultrasuoni (4.2). Filtrare su filtro (4.3) e usare questo filtrato per la cromatografia.

5.2. Cromatografia su strato sottile

Depositare su lastrina (3.1), 1,0 µl di soluzione di riferimento (3.10) e 1,0 µl di soluzione in esame (5.1). Far camminare il solvente per un tratto di 150 mm in una vaschetta presaturata di vapori di solvente (3.2).

5.3. Evidenziazione

5.3.1. Asciugare la lastrina a temperatura ambiente.

5.3.2. Nebulizzare il reattivo (3.6).

5.3.3. Lasciare asciugare la lastrina per un'ora a temperatura ambiente.

5.3.4. Osservare la lastrina irradiandola con luce UV alla lunghezza d'onda di 360 nm. La chinina compare come una macchia fluorescente di colore blu intenso.

A titolo esemplificativo lo schema seguente riporta gli Rf dei principali alcaloidi della China, sviluppati su gel di silice con il solvente (3.2)

Alcaloidi	Rf
Chinina	0,20
Chinidina	0,29
Cinconina	0,33
Cinconidina	0,27
Idrochinidina	0,17

- 5.3.5 Per ulteriore conferma dell'identificazione della chinina, si esponga per un'ora la lastrina ai vapori di bromo (3.7), la fluorescenza scompare. Esponendo infine la stessa lastrina ai vapori di ammoniaca (3.8.), le macchie ricompaiono con colore bruno, e si riesaminano irradiando con luce UV a 360 nm si evidenzia una fluorescenza giallastra.

Limite di identificazione : 0,1 µg di chinina.

B. DOSAGGIO

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Questo metodo è idoneo per il dosaggio della chinina, e può essere usato per dosare le concentrazioni massime consentite dello 0,5 % (m/m) negli shampoos e dello 0,2 % (m/m) nelle lozioni per capelli.

2. DEFINIZIONE

Il contenuto in chinina misurato con questo metodo è espresso in percentuale di massa (% m/m) di prodotto.

3. PRINCIPIO

Dopo idoneo trattamento il campione è analizzato per cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC).

4. REATTIVI

Tutti i reattivi devono essere analiticamente puri ed idonei per la cromatografia liquida.

4.1. Acetonitrile.

4.2. Diidrogenoortofosfato di potassio KH_2PO_4 .

4.3. Acido ortofosforico 85 % ($d_{40}^{20} : 1,7$).

4.4. Bromuro di tetrametilammonio.

4.5. Chinina anidra.

4.6. Metanolo.

4.7. Soluzione di acido ortofosforico 0,1 M :

solubilizzare 11,53 g di acido ortofosforico (4.3) in 1 000 ml di acqua distillata in matraccio tarato.

4.8. Soluzione di diidrogenoortofosfato di potassio 0,1 M :

solubilizzare 13,6 g di 4.2 in 1 000 ml di acqua distillata in matraccio tarato.

4.9. Soluzione di bromuro di tetrametilammonio 0,1 M :

solubilizzare 15,4 g di 4.4 in 1 000 ml di acqua distillata in matraccio tarato.

4.10. Eluente : Acido ortofosforico 0,1 M (4.7) — diidrogenoortofosfato di potassio 0,1 M (4.8)-tetrametilammonio bromuro 0,1 M (4.9)-acqua per HPLC-acetonitrile (4.1) : 10 : 50 : 100 : 340 : 90 (v/v/v/v/v).

La composizione della fase mobile può essere modificata in modo tale che il fattore di risoluzione R sia $\geq 1,5$

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

ove :

R_1 e R_2 = tempi di ritenzione espressi in minuti di due sostanze ;

W_1 e W_2 = ampiezza degli stessi picchi misurata a metà altezza ed espressa in mm ;

d' = velocità di scorrimento della carta del registratore espressa in mm/min.

4.11. Silice octadecilsilanizzata di granulometria pari a 10 µm.

4.12. Soluzioni standard : in una serie di matracci tarati da 100 ml, pesare rispettivamente con precisione 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 mg di chinina anidra (4.5). Portare a volume con metanolo (4.6) e solubilizzare. Filtrare ogni soluzione su filtro (5.5).

5. APPARECCHIATURA

5.1. Apparecchiatura comune da laboratorio.

5.2. Bagno ad ultrasuoni.

5.3. Cromatografo in fase liquida ad alta risoluzione con detector UV a lunghezza d'onda variabile.

5.4. Colonna in acciaio inossidabile :

lunghezza : 250 mm,

diametro interno : 4,6 mm,

riempimento : silice octadecilsilanizzata (4.11).

5.5. Filtri Millipore FH 0,5 µm o equivalenti con opportuna attrezzatura filtrante.

6. MODALITÀ OPERATIVE**6.1. Preparazione del campione**

Pesare esattamente in un matraccio tarato da 100 ml una quantità di campione tale da contenere circa 10 mg di chinina anidra. Aggiungere 20 ml di metanolo (4.6) e lasciare tale matraccio per 20 minuti in un bagno ad ultrasuoni (5.2). Portare poi a volume con metanolo (4.6). Omogeneizzare la soluzione e filtrarne un'aliquota su filtro (5.5).

6.2. Cromatografia

- Flusso fase mobile (4.10): 1,0 ml/min.
- Lunghezza d'onda del detector (5.3): 332 nm.
- Volume iniettato di soluzione filtrata (6.1): 10,0 µl.
- Misurare l'area dei picchi.

6.3. Retta di taratura

Iniettare, per almeno tre volte, 10,0 µl di ciascuna delle soluzioni di riferimento (4.12), misurare l'area dei picchi ottenuti e calcolarne la media per ogni concentrazione. Tracciare la retta di taratura.

7. CALCOLO

7.1. Sulla retta di taratura (6.3) determinare la quantità in µg di chinina anidra presente nel volume iniettato (6.2).

7.2. La concentrazione in chinina anidra nel campione, espressa come % (m/m), è ottenuta mediante la seguente formula:

$$\% \text{ (m/m) di chinina anidra} = \frac{B}{A}$$

dove:

B = quantità espressa in µg iniettati della soluzione filtrata (6.1.1);

A = massa prelevata del campione in esame (6.1) espressa in g.

8. RIPETIBILITÀ⁽¹⁾

Per un contenuto in chinina anidra uguale allo 0,5 % (m/m), la differenza tra i risultati di due dosaggi effettuati in parallelo sullo stesso campione non deve superare lo 0,02 %.

Per un contenuto in chinina anidra uguale allo 0,2 % (m/m), la differenza tra i risultati di due dosaggi effettuati in parallelo sullo stesso campione non deve superare lo 0,01 %.

IDENTIFICAZIONE E DOSAGGIO DEI SOLFITI E BISOLFITI INORGANICI**SCOPO E CAMPO D'APPLICAZIONE**

Il metodo descrive l'identificazione ed il dosaggio dei solfiti e bisolfiti inorganici nei cosmetici.

Esso è applicabile solo a prodotti che si presentino come una fase alcolica o acquosa e per concentrazioni fino allo 0,2 % di anidride solforosa.

A. IDENTIFICAZIONE**1. PRINCIPIO**

Il campione è riscaldato con acido cloridrico e l'anidride solforosa liberata è identificata tramite l'odore caratteristico o il comportamento di una cartina indicatore.

2. REAGENTI

Tutti i reagenti devono essere di purezza analitica.

2.1. Acido cloridrico (4 M).

2.2. Cartina impregnata di amido e potassio iodato o equivalente.

3. APPARECCHIATURA

3.1. Normale apparecchiatura di laboratorio.

3.2. Beuta da 25 ml raccordata con un breve refrigerante a ricadere.

4. PROCEDIMENTO

4.1. Portare circa 2,5 g di campione nella beuta (3.2) ed aggiungere 10 ml di acido cloridrico (2.1).

4.2. Mescolare e riscaldare all'ebollizione.

4.3. Controllare la presenza di anidride solforosa mediante l'odore o la cartina indicatore (2.2).

⁽¹⁾ Secondo la norma ISO 5725.

B. DETERMINAZIONE

1. DEFINIZIONE

Il contenuto del campione in solfito o bisolfito determinato con questo metodo è espresso come percentuale di massa di anidride solforosa.

2. PRINCIPIO

Dopo acidificazione del campione l'anidride solforosa liberata è distillata in una soluzione di acqua ossigenata. L'acido solforico che si forma è controllato con una soluzione standard di sodio idrossido.

3. REATTIVI

Tutti i reattivi devono essere di qualità analitica.

3.1. Acqua ossigenata 0,2 % (m/v) preparata giornalmente.

3.2. Acido ortofosforico ($d_{4}^{25^{\circ}}$: 1,75).

3.3. Metanolo.

3.4. Sodio idrossido (0,01 M) soluzione a titolo noto.

3.5. Azoto.

3.6. Indicatore : miscela 1 : 1 (v/v) di rosso di metile (0,03 % m/v in etanolo) e blu di metilene (0,05 % m/v in etanolo). Filtrare la soluzione.

4. APPARECCHIATURA

4.1. Normale attrezzatura di laboratorio.

4.2. Apparecchio di distillazione (vedi figura).

5. PROCEDIMENTO

5.1. Pesare accuratamente circa 2,5 g di campione nel pallone di distillazione A (vedi figura).

5.2. Aggiungere 60 ml di acqua e 50 ml di metanolo (3.3) e mescolare.

5.3. Porre 10 ml di soluzione di acqua ossigenata (3.1), 60 ml di acqua e poche gocce di indicatore (3.6) nel recipiente di raccolta D (vedi figura). Aggiungere poche gocce di soluzione di sodio idrossido (3.4) finché l'indicatore viri al verde.

5.4. Ripetere il punto 5.3, per la bottiglia di lavaggio E (vedi figura).

5.5. Montare l'apparecchiatura e far gorgogliare l'azoto (3.5) al flusso di circa 60 bolle al minuto.

5.6. Far gocciolare 15 ml di acido fosforico (3.2) dall'imbuto di carico nel pallone di distillazione A.

5.7. Portare rapidamente all'ebollizione e distillare per 30 minuti.

5.8. Sconnettere il recipiente di distillazione D. Lavare il tubo e titolare con soluzione di sodio idrossido (3.4) finché l'indicatore viri al verde (3.6).

6. CALCOLO

Calcolare il contenuto in solfito o bisolfito in percentuale di massa nel campione mediante la seguente espressione :

$$\% \text{ m/m di anidride solforosa} = \frac{3,2 \text{ MV}}{m}$$

Dove :

M = concentrazione molare della soluzione di sodio idrossido (3.4);

V = volume (in ml) di sodio idrossido (3.4) consumato per la titolazione (5.8);

m = prelievo del campione (5.1), quantità espressa in g.

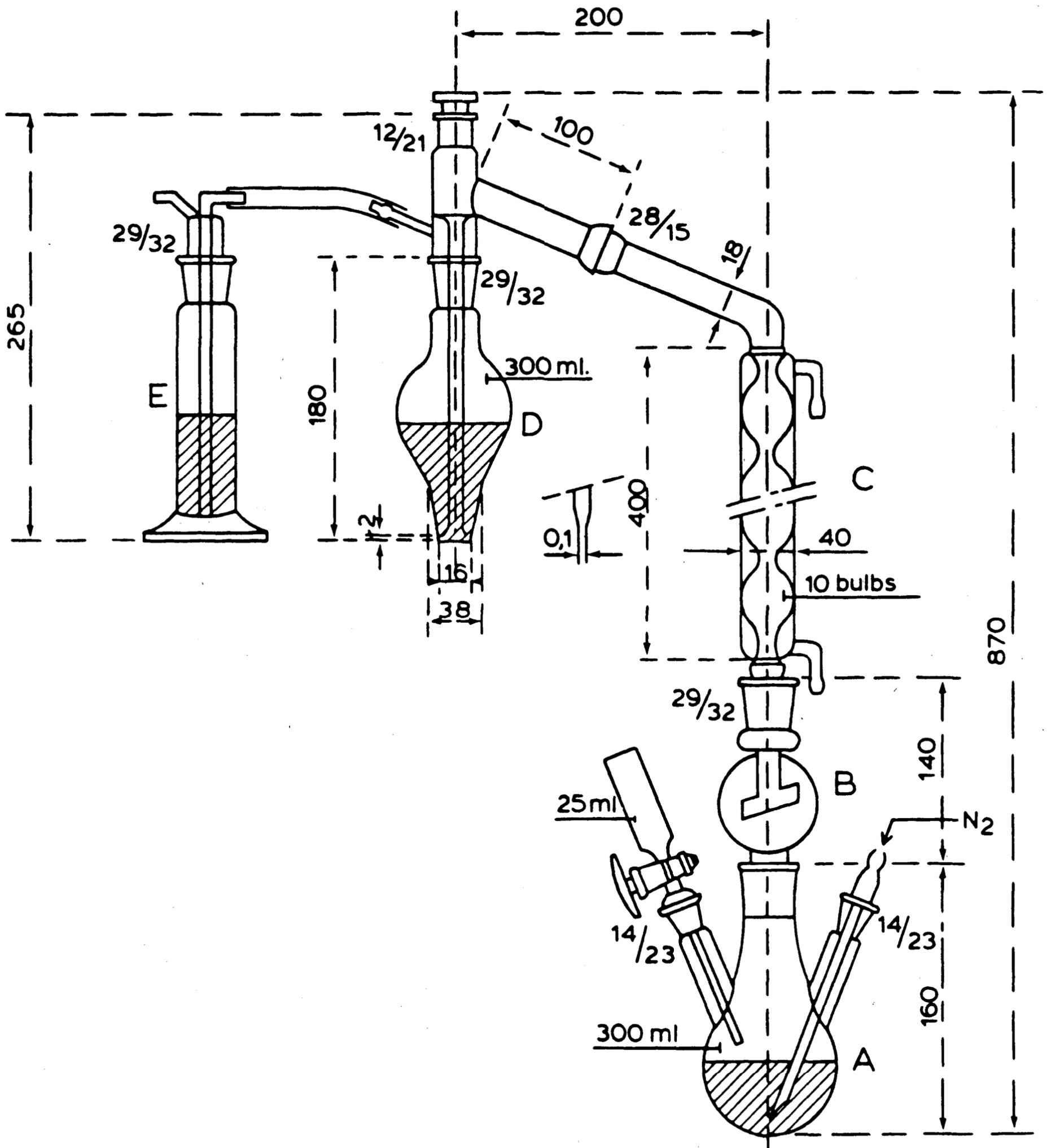
7. RIPETIBILITÀ⁽¹⁾

Per un contenuto dello 0,2 % m/m di anidride solforosa la differenza fra due determinazioni eseguite in parallelo sullo stesso campione non deve essere maggiore dello 0,006 %.

⁽¹⁾ Secondo la norma ISO 5725.

Apparecchio per la distillazione dell'anidride solforosa secondo Tanner

Tutte le dimensioni sono date in millimetri



IDENTIFICAZIONE E DOSAGGIO DEI CLORATI DEI METALLI ALCALINI**FINALITÀ A CAMPO DI APPLICAZIONE**

Il metodo descrive l'identificazione ed il dosaggio dei clorati nei dentifrici e negli altri prodotti cosmetici.

A. IDENTIFICAZIONE**1. PRINCIPIO**

I clorati sono separati dagli altri sali alogenati per cromatografia su strato sottile, e vengono identificati per formazione di iodio ottenuto per ossidazione dallo ioduro di potassio.

2. REATTIVI

Tutti i reattivi devono essere di purezza analitica.

- 2.1. Soluzioni di riferimento : Soluzioni acquose di clorato, bromato, iodato di potassio (0,2 % m/v) preparate di recente.
- 2.2. Solvente di sviluppo : Soluzione di ammoniaca (28 % m/v)/acetone/butanolo (60/130/30 v/v/v).
- 2.3. Soluzione acquosa di ioduro di potassio (1-5 % m/v).
- 2.4. Soluzione di amido (5 % m/v).
- 2.5. Acido cloridrico M.
- 2.6. Lastre per strato sottile di cellulosa, di 0,25 mm di spessore, pronto per l'uso.

3. APPARECCHIATURA

Normale apparecchiatura per la cromatografia su strato sottile.

4. MODALITÀ OPERATIVE

- 4.1. Estrarre 1 g circa del campione con acqua, filtrare e diluire a 25 ml circa.
- 4.2. Deporre 2 µl di soluzione (4.1) sulla lastrina (2.6) e separatamente 2 µl di ciascuna delle soluzioni di riferimento (2.1).
- 4.3. Collocare la lastrina in una vaschetta di sviluppo e svilupparla per tre quarti circa della sua lunghezza mediante il solvente (2.2).
- 4.4. Estrarre la lastrina dalla vasca e lasciar evaporare il solvente.
(NB : L'evaporazione può richiedere fino a due ore).
- 4.5. Spruzzare la lastrina con la soluzione di ioduro di potassio (2.4) e lasciar asciugare per 5 minuti circa.
- 4.6. Spruzzare la lastrina con soluzione di amido (2.4) e lasciar asciugare per 5 minuti circa.
- 4.7. Spruzzare la lastra con acido cloridrico (2.5).

5. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Il clorato si evidenzia dopo circa 30 minuti come una macchia di colore blu (eventualmente bruno). A titolo esemplificativo si riportano nella tabella seguente gli Rf delle sostanze in oggetto.

Sostanze	Rf
Clorato	0,7 — 0,8
Bromato	0,5 — 0,6
Iodato	0,0 — 0,2

Si osservi che bromati e iodati reagiscono immediatamente e non si confondano le macchie dei bromati con quelle dei clorati.

B. DETERMINAZIONE

1. DEFINIZIONE :

Il tenore del campione in clorato determinato secondo questo metodo è espresso in percentuale di massa di clorato.

2. PRINCIPIO

Il clorato viene ridotto con polvere di zinco in ambiente acido. Il cloruro che si forma viene titolato potenziometricamente con soluzione di nitrato d'argento. Una determinazione analoga prima della riduzione consente di rilevare l'eventuale presenza di alogenuri.

3. REATTIVI

Tutti i reattivi devono essere di purezza analitica.

3.1. Acido acetico 80 % (m/m).

3.2. Polvere di zinco.

3.3. Soluzione a titolo noto di nitrato di argento 0,1 M.

4. APPARECCHIATURA

4.1. Apparecchiatura comune di laboratorio.

4.2. Potenziografo provvisto di elettrodo indicatore per l'argento.

5. MODALITÀ OPERATIVE

5.1. Preparazione del campione

In una provetta da centrifuga, pesare con precisione una quantità (m) di campione pari a circa 2 g. Aggiungere 15 ml circa di acido acetico (3.1) e mescolare bene. Dopo 30 minuti centrifugare per 15 minuti a 2 000 g om. Travasare il surnatante in un matraccio tarato da 50 ml, ripetere due volte la centrifugazione aggiungendo 15 ml di acido acetico (3.1) per volta, al residuo. Riunire le soluzioni nel suddetto matraccio tarato. Portare a volume con acido acetico (3.1).

5.2. Riduzione del clorato

Prelevare 20 ml di soluzione (5.1) e aggiungere 0,6 g di polvere di zinco (3.2). Portare all'ebollizione in pallone provvisto di refrigerante a ricadere. Dopo trenta minuti di ebollizione raffreddare e filtrare.

5.3. Determinazione del cloruro

Titolare la soluzione (5.2) con nitrato di argento (3.3) impiegando il potenziografo (4.2). Titolare nelle stesse condizioni 20 ml di soluzione (5.1) con nitrato di argento (3.3).

Se il prodotto contiene derivati del bromo o dello iodio capaci di liberare bromuri e ioduri dopo riduzione, la curva di titolazione avrà vari punti di flesso. In questo caso, il volume della soluzione di Ag NO_3 (3.3) corrispondente al cloruro è rappresentato dalla differenza dei volumi corrispondenti all'ultimo e penultimo punto di flesso. Per confermare i risultati si può aggiungere una quantità nota di cloruro e verificare l'effetto di tale aggiunta sulla curva di titolazione.

6. CALCOLO

Il tenore in clorato del campione (% m/m) è calcolato secondo la seguente formula :

$$\% \text{ clorato m/m} = \frac{20,9 (V - V') M}{m}$$

dove :

V = volume in ml della soluzione di argento nitrato utilizzata per titolare la soluzione (5.2);

V' = volume in ml della soluzione di argento nitrato utilizzata per titolare la soluzione (5.1);

M = molarità della soluzione di argento nitrato;

m = massa in g del campione (5.1).

7. RIPETIBILITÀ (1)

Per un contenuto di clorato compreso tra il 3 ed il 5 % (m/m), la differenza fra i risultati di due determinazioni effettuate in parallelo sullo stesso campione non deve superare 0,07 % m/m.

(1) Secondo la norma ISO 5725.

IDENTIFICAZIONE E DOSAGGIO DELLO IODATO DI SODIO**SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE**

Il metodo descrive il procedimento per identificare e dosare estratti acquosi di prodotti cosmetici contenenti iodato di sodio.

A. IDENTIFICAZIONE**1. PRINCIPIO**

Lo iodato di sodio è separato dagli altri derivati alogenati per cromatografia su strato sottile ed identificato per ossidazione dello ioduro o iodio.

2. REATTIVI

Tutti i reattivi devono essere di purezza analitica.

- 2.1. Soluzioni di riferimento : Soluzioni acquose di potassio clorato, bromato e iodato (0,01 % m/v) preparata di recente.
- 2.2. Fase mobile : Soluzione di ammonio idrossido (28 % m/v)/Acetone/Butanolo (60 : 130 : 30 v/v/v).
- 2.3. Soluzione acquosa di potassio ioduro (5 % m/v).
- 2.4. Salda d'amido (dall'1 al 5 % m/v).
- 2.5. Acido cloridrico M.

3. APPARECCHIATURA

- 3.1. Lastrine per cromatografia su strato sottile di cellulosa di 0,25 mm di spessore.
- 3.2. Attrezzatura normale per cromatografia su strato sottile.

4. PROCEDIMENTO

- 4.1. Estrarre 1 g di campione circa con acqua, filtrare e diluire a 10 ml.
- 4.2. Depositare sulla linea di base di una lastrina (3.1) 2 µl di questa soluzione insieme ad aliquota di 2 µl di ognuno delle tre soluzioni di riferimento (2.1).
- 4.3. Sviluppare per tre quarti della sua lunghezza la lastrina, per cromatografia ascendente, con il solvente (2.2).
- 4.4. Togliere la lastrina dalla vasca e far evaporare il solvente a temperatura ambiente (questa operazione dura 2 ore circa).
- 4.5. Spruzzare la lastrina con soluzione di potassio ioduro (2.3) e far asciugare per circa 5 minuti.
- 4.6. Spruzzare con la soluzione di salda d'amido (2.4) e lasciare asciugare per circa 5 minuti.
- 4.7. Infine spruzzare con acido cloridrico (2.5).

5. VALUTAZIONE

Se lo iodato è presente, una macchia blu (il colore può essere bruno o diventare bruno con il tempo) apparirà immediatamente con un valore di Rf approssimativamente tra 0 e 0,2.

Notare che i bromati reagiscono immediatamente con un Rf di 0,5-0,6 ed i clorati dopo 30 minuti circa con un Rf di 0,7-0,8.

B. DETERMINAZIONE**1. DEFINIZIONE**

Il contenuto in sodio iodato determinato con questo metodo è espresso come percentuale di massa.

2. PRINCIPIO

Il sodio iodato è solubilizzato in acqua e determinato per mezzo della cromatografia liquida ad alta risoluzione, usando in serie una colonna a fase inversa C₁₈ ed una colonna a scambio anionico.

3. REATTIVI

Tutti i reattivi devono essere di purezza analitica e idonei per la cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC).

- 3.1. Acido cloridrico 4 M.
- 3.2. Soluzione di sodio solfito 5 % m/v.
- 3.3. Soluzione di sodio iodato : preparare una soluzione contenente 50 mg di sodio iodato in 100 ml di acqua.
- 3.4. Fosfato acido di potassio.
- 3.5. Fosfato bisodico 2 H₂O.
- 3.6. Fase mobile per HPLC : solubilizzare in un litro di acqua 3,88 g di fosfato acido di potassio (3.4) e 1,19 g di fosfato bisodico (3.5).
Il pH deve essere uguale a 6,2.
- 3.7. Cartine indicatrici universali pH 1-11.

4. APPARECCHIATURA

Normale apparecchiatura di laboratorio.

- 4.1. Filtri di carta rotondi, diametro 110 mm Schleider e Schull n. 575 o equivalenti.
- 4.2. Cromatografo liquido ad alta risoluzione con detector a lunghezza d'onda variabile.
- 4.3. Colonna : lunghezza 120 mm, diametro interno 4,6 mm, numero : due, messe in serie, prima colonna riempita con Nucleosil[®] 5 C₁₈ o equivalente, la seconda con Vydac[™] 301-SB, o equivalente.

5. PROCEDIMENTO

5.1. Preparazione del campione

5.1.1. *Campioni fluidi (Shampoos)*

Pesare accuratamente 1,0 g di campione in una provetta graduata e smerigliata da 10 ml o in un matraccio tarato. Portare a volume con acqua e mescolare. Se necessario filtrare la soluzione. Determinare lo iodato in soluzione per HPLC come descritto al punto 5.2.

5.1.2. *Campioni solidi (Saponi)*

Suddividere finemente una porzione del campione e pesarne accuratamente circa 1 g in un cilindro graduato da 100 ml con tappo a smeriglio. Portare a 50 ml con H₂O ed agitare energicamente per 1 minuto. Centrifugare e filtrare su carta (4.1) o lasciare a riposo la sospensione per almeno una notte. Agitare la sospensione vigorosamente e filtrare su carta (4.2).

Determinare lo iodato nel filtrato per HPLC come descritto al punto 5.2.

5.2. Cromatografia

Flusso della fase mobile : 1 ml/min.

Lunghezza d'onda del detector (4.2) : 210 nm.

Volume iniettato : 10 µl.

Misurare le aree dei picchi.

5.3. Taratura

Prelevare rispettivamente 1,0, 2,0, 5,0, 10,0 e 20,0 ml della soluzione di sodio iodato (3.3) in matracci tarati da 50 ml. Portare a volume e mescolare. Le soluzioni così ottenute contengono 0,01, 0,02, 0,05, 0,10 e 0,20 mg/ml di sodio iodato.

Iniettare 10 µl di ogni soluzione standard di sodio iodato nel cromatografo (4.3). Determinare ciascuna area dei picchi corrispondenti allo iodato e riportarle su un grafico in relazione alle concentrazioni.

6. CALCOLO

Calcolare il contenuto in sodio iodato come percentuale di massa (% m/m) usando la seguente formula :

$$\% \text{ (m/m) di sodio iodato} = \frac{Vc}{10 m}$$

dove :

m = massa in grammi del campione prelevato (5.1);

V = volume totale della soluzione campione in millimetri, ottenuta come descritto al punto (5.1);

c = concentrazione in mg di sodio iodato ottenuta dalla curva di taratura (5.3).

7. RIPETIBILITA' (1)

Per un tenore in sodio iodato pari allo 0,1 % (m/m) la differenza fra i risultati di due determinazioni condotte in parallelo sullo stesso campione non deve superare lo 0,002 %.

8. CONFERMA**8.1. Principio**

In una soluzione acidificata di prodotto cosmetico, lo iodato è ridotto a ioduro per mezzo del solfito e la soluzione ottenuta è esaminata per HPLC. Se dopo trattamento con solfito un picco con il tempo di ritenzione dello iodato scompare, si può ragionevolmente attribuire il picco originale allo iodato.

8.2. Procedimento

Pipettare 5 ml di soluzione ottenuta al punto 5.1 in un recipiente a fondo conico. Portare il pH della soluzione a un valore ≤ 3 con acido cloridrico (3.1); controllare con la cartina (3.7). Aggiungere 3 gocce di soluzione di sodio solfito (3.2) e mescolare. Iniettare 10 μ l di soluzione nel cromatografo (4.2). Confrontare il cromatogramma con quello ottenuto al punto 5 per il medesimo campione.

(1) Secondo la norma ISO 5725.