

II

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

COMMISSIONE

SECONDA DIRETTIVA DELLA COMMISSIONE

del 14 maggio 1982

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

(82/434/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 dalla direttiva 79/661/CEE⁽²⁾, in particolare l'articolo 8, paragrafo 1,

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

considerando che è opportuno stabilire il più rapidamente possibile tutti i metodi di analisi necessari ; che una prima tappa verso tale meta è stata raggiunta con la prescrizione di taluni metodi nella direttiva 80/1335/CEE della Commissione⁽³⁾, e che il passaggio alla seconda tappa è segnato dalla prescrizione dei metodi d'identificazione degli agenti ossidanti e di dosaggio del perossido di idrogeno nei prodotti per la cura

dei capelli, d'identificazione e di dosaggio semiquantitativo di taluni coloranti d'ossidazione nelle tinture per capelli, d'identificazione e di dosaggio dei nitriti, d'identificazione e di dosaggio della formaldeide libera, di dosaggio della resorcina negli shampoo e nelle lozioni per capelli, di dosaggio del metanolo in rapporto all'etanolo ed al propanolo-2 ;

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 adottano le misure necessarie affinché, nei controlli ufficiali dei prodotti cosmetici

- l'identificazione degli agenti ossidanti e il dosaggio del perossido di idrogeno nei prodotti per la cura dei capelli,
- l'identificazione e il dosaggio semiquantitativo di taluni coloranti d'ossidazione nelle tinture per capelli,
- l'identificazione e il dosaggio dei nitriti,
- l'identificazione e il dosaggio della formaldeide libera,

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

⁽²⁾ GU n. L 192 del 31. 7. 1979, pag. 35.

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

- il dosaggio della resorcina negli shampoo e nelle lozioni per capelli,
- il dosaggio del metanolo in rapporto all'etanolo ed al propanolo-2,

siano effettuati secondo i metodi descritti nell'allegato.

Articolo 2

Gli Stati membri mettono in vigore le disposizioni legislative, regolamentari ed amministrative necessarie per conformarsi alla presente direttiva entro e non oltre il 31 dicembre 1983. Essi ne informano immediatamente la Commissione.

Articolo 3

Gli Stati membri sono destinatari della presente direttiva.

Fatto a Bruxelles, il 14 maggio 1982.

Per la Commissione

Karl-Heinz NARJES

Membro della Commissione

ALLEGATO

I. IDENTIFICAZIONE DI ALCUNI OSSIDANTI E DOSAGGIO DEL PEROSSIDO DI IDROGENO NEI PRODOTTI PER LA CURA DEI CAPELLI

SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

La determinazione iodometrica del perossido di idrogeno nei prodotti cosmetici è possibile in assenza di altri ossidanti, che reagiscono con gli ioduri formando iodio. Pertanto, prima di procedere alla determinazione iodometrica del perossido di idrogeno, è necessario rilevare e identificare gli altri ossidanti eventualmente presenti. Questa identificazione si suddivide in due fasi: la prima fase riguarda i persolfati, i bromati e il perossido di idrogeno, la seconda il perossido di bario.

A. IDENTIFICAZIONE DEI PERSOLFATI, DEI BROMATI E DEL PEROSSIDO DI IDROGENO

1. PRINCIPIO

Il persolfato di sodio, di potassio e di ammonio, il bromato di potassio e di sodio, nonché il perossido di idrogeno — derivato o meno dal perossido di bario — vengono identificati per cromatografia discendente su carta con l'impiego di due solventi di sviluppo.

2. REATTIVI

Tutti i reagenti devono essere di purezza analitica.

2.1. Soluzioni acquose di riferimento allo 0,5 % (m/v) dei seguenti composti:

2.1.1. Persolfato di sodio

2.1.2. Persolfato di potassio

2.1.3. Persolfato di ammonio

2.1.4. Bromato di potassio

2.1.5. Bromato di sodio

2.1.6. Perossido di idrogeno

2.2. Eluente A: etanolo 80 % (v/v)

2.3. Eluente B: benzene — metanolo — alcole isoamilico — acqua (34-38-18-10 v/v)

2.4. Reattivo A: soluzione acquosa di ioduro di potassio al 10 % (m/v)

2.5. Reattivo B: salda d'amido all'1 % (m/v)

2.6. Reattivo C: acido cloridrico al 10 % (m/m)

2.7. Acido cloridrico 4 N.

3. APPARECCHIATURE E STRUMENTI

3.1. Carta per cromatografia (Whatman n. 3 e n. 4 o equivalente)

3.2. Micropipetta da 1 µl

3.3. Matracci tarati da 100 ml

3.4. Filtri a pieghe

3.5. Normali attrezzature per l'esecuzione della cromatografia discendente su carta.

4. TRATTAMENTO DEL CAMPIONE

4.1. Prodotti solubili in acqua

Per ciascun campione preparare due soluzioni sciogliendo rispettivamente 1 e 5 g del prodotto in 100 ml di acqua. Per effettuare la cromatografia su carta descritta al punto 5, utilizzare 1 µl di ciascuna di queste due soluzioni.

4.2. Prodotti poco solubili in acqua

4.2.1. Pesare 1 e 5 g del campione, sospenderli in 50 ml di acqua, aggiungere acqua fino a 100 ml e mescolare. Filtrare le due sospensioni per filtro a pieghe (3.4) ed utilizzare 1 µl di ciascuno dei due filtrati per effettuare la cromatografia su carta descritta al punto 5.

4.2.2. Preparare per ciascun campione due altre sospensioni di 1 e 5 g in 50 ml di acqua, acidificare con acido cloridrico diluito (2.7), portare a volume di 100 ml con acqua e mescolare. Filtrare le sospensioni per filtro a pieghe (3.4) ed utilizzare 1 µl di ciascuno dei due filtrati per effettuare la cromatografia su carta descritta al punto 5.

4.3. Creme

Omogeneizzare rispettivamente 5 e 20 g di ciascun prodotto in 100 ml di acqua ed utilizzare le sospensioni per effettuare la cromatografia su carta descritta al punto 5.

5. PROCEDIMENTO

5.1. Versare in due recipienti per cromatografia discendente su carta una determinata quantità dei solventi di sviluppo A (2.2) e B (2.3). Saturare i recipienti con i vapori dei solventi almeno per 24 ore.

5.2. Depositare su ciascun punto di partenza di una striscia di carta per cromatografia (Whatman n. 3 o equivalente) di 40 × 20 cm (3.1) o di altro formato idoneo 1 µl di una delle soluzioni di campione e di riferimento preparate secondo i punti 4 e 2.1, e lasciar evaporare il solvente all'aria.

5.3. Mettere la striscia di carta (5.2) nella vaschetta riempita con solvente A (5.1) e cromatografare fino a che il fronte di sviluppo abbia percorso 35 cm (circa 15 ore).

5.4. Ripetere le operazioni descritte ai punti 5.2 e 5.3 con carta per cromatografia (Whatman n. 4 o equivalente) (3.1) e con solvente B. Cromatografare fino a che il fronte di sviluppo abbia percorso 35 cm (circa 5 ore).

5.5. Dopo lo sviluppo togliere le strisce di carta dai recipienti e lasciarle essiccare all'aria.

5.6. Rilevare le macchie spruzzando :

5.6.1. il reattivo A (2.4) e subito dopo il reattivo B (2.5). Sul cromatogramma appaiono dapprima le macchie dei persolfati e quindi le macchie di perossido di idrogeno. Segnare queste macchie con una matita,

5.6.2. il reattivo C (2.6) sui cromatogrammi ottenuti secondo il punto 5.6.1. La presenza di bromati è indicata da macchie grigio-blu sui cromatogrammi.

5.7. Nelle condizioni sopra indicate per i solventi A (2.2) e B (2.3), i valori R_f delle soluzioni di riferimento (2.1) sono i seguenti :

	Solvente A (2.2)	Solvente B (2.3)
Persolfato di sodio	0,40	0,10
Persolfato di potassio	0,40	0,02 + 0,05
Persolfato di ammonio	0,50	0,10 + 0,20
Bromato di sodio	0,40	0,20
Bromato di potassio	0,40	0,10 + 0,20
Perossido di idrogeno	0,80	0,80

B. IDENTIFICAZIONE DEL PEROSSIDO DI BARIO

1. PRINCIPIO

La presenza di perossido di bario è messa in evidenza

- come perossido di idrogeno mediante acidificazione del campione (A. 4.2),
- per identificazione degli ioni bario.

In assenza di persolfati (A), si aggiunge acido solforico diluito ad una parte della soluzione di campione acida (B. 4.1), in modo da formare un precipitato bianco di solfato di bario. La presenza di ioni di bario nella soluzione di campione (B. 4.1) è confermata mediante cromatografia su carta eseguita nel modo indicato al precedente punto 5.

In caso di presenza simultanea di perossido di bario e di persolfati (B. 4.2) : dopo fusione alcalina e soluzione in acido cloridrico si rivela la presenza di ioni bario mediante cromatografia su carta e/o mediante precipitazione allo stato di solfati.

2. REATTIVI

- 2.1. Metanolo
- 2.2. Acido cloridrico concentrato al 36 % (m/m)
- 2.3. Acido cloridrico 6 N
- 2.4. Acido solforico 4 N
- 2.5. Rodizonato disodico
- 2.6. Cloruro di bario ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- 2.7. Carbonato di sodio anidro
- 2.8. Soluzione acquosa di cloruro di bario all'1 % (m/v)
- 2.9. Eluente metanolo — acido cloridrico concentrato al 36 % — acqua (80 — 10 — 10 v/v)
- 2.10. Rivelatore, soluzione acquosa di rodizonato disodico allo 0,1 % (m/v) ; preparare la soluzione subito prima dell'uso.

3. APPARECCHIATURE E STRUMENTI

- 3.1. Micropipetta da 5 μl
- 3.2. Crogioli di platino
- 3.3. Palloni tarati da 100 ml
- 3.4. Carta per cromatografia (Schleicher e Schüll 2043 b o equivalente). Porre la carta per una notte nella vaschetta per cromatografia discendente su carta (A. 3.5) contenente il solvente B. 2.9, e successivamente asciugarle
- 3.5. Filtri a pieghe
- 3.6. Normali apparecchiature per la cromatografia ascendente su carta.

4. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

- 4.1. **Prodotti non contenenti persolfati**
 - 4.1.1. Omogeneizzare o disciogliere 2 g del prodotto in 50 ml d'acqua e portare il pH della soluzione al massimo a 1 per mezzo di acido cloridrico (B. 2.3).

4.1.2. Versare la soluzione o la sospensione in un pallone tarato da 100 ml, portare a segno con acqua e mescolare. Utilizzare questa soluzione per effettuare la cromatografia su carta descritta al punto 5 e per identificare il bario mediante precipitazione come solfato.

4.2. Prodotti contenenti persolfati

4.2.1. Omogeneizzare o disciogliere 2 g del prodotto in 100 ml di acqua e filtrare.

4.2.2. Aggiungere al residuo essiccato da 7 a 10 volte il suo peso di carbonato di sodio (B. 2.7), mescolare e riscaldare la miscela in un crogiolo di platino (B. 3.2) fino a fusione, per una mezz'ora.

4.2.3. Raffreddare alla temperatura ambiente, sospendere il prodotto della fusione in 50 ml di acqua e filtrare (B. 3.5).

4.2.4. Sciogliere nell'acido cloridrico 6 N (B. 2.3) e portare con acqua a 100 ml. Utilizzare questa soluzione per effettuare la cromatografia su carta descritta al punto 5 e per identificare il bario mediante precipitazione come solfato.

5. PROCEDIMENTO

5.1. Mettere in una vaschetta per cromatografia ascendente su carta una certa quantità di solvente (B. 2.9) e saturare la vaschetta per almeno 15 ore.

5.2. Su un foglio di carta per cromatografia, pretrattato come indicato al punto B. 3.4, depositare in tre punti alla partenza 5 µl rispettivamente delle soluzioni di cui ai punti B. 4.1.2 e B. 4.2.4 e della soluzione di riferimento (B. 2.8).

5.3. Fare asciugare le deposizioni all'aria, e cromatografare verticalmente finché il fronte di sviluppo abbia percorso 30 cm.

5.4. Togliere la carta dalla vaschetta e farla essiccare all'aria.

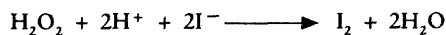
5.5. Rivelare le macchie sul cromatogramma, spruzzando la carta con il reattivo B. 2.10.

In presenza di bario appaiono sul cromatogramma macchie rosse con un Rf di 0,10 circa.

C. DOSAGGIO DEL PEROSSIDO DI IDROGENO

1. PRINCIPIO

La determinazione iodometrica del perossido di idrogeno è basata sulla seguente reazione :



Tale reazione si svolge lentamente, ma è possibile accelerarla aggiungendo molibdato di ammonio. L'iodio formatosi viene determinato per titolazione con tiosolfato di sodio e permette di determinare il tenore di perossido di idrogeno.

2. DEFINIZIONE

Il tenore di perossido di idrogeno del campione, determinato nel modo descritto in appresso, viene espresso in percentuale di massa del prodotto.

3. REATTIVI

Tutti i reagenti devono essere di purezza analitica.

3.1. Acido solforico 2 N

3.2. Ioduro di potassio

3.3. Molibdato di ammonio

3.4. Soluzione di tiosolfato di sodio 0,1 N

- 3.5. Soluzione di ioduro di potassio al 10 % (m/v). Preparare la soluzione subito prima dell'uso
- 3.6. Soluzione di molibdato di ammonio al 20 % (m/v)
- 3.7. Salda di amido all'1 % (m/v)

4. APPARECCHIATURE E STRUMENTI

- 4.1. Becher di vetro da 100 ml
- 4.2. Burette da 50 ml
- 4.3. Palloni tarati da 250 ml
- 4.4. Cilindri graduati da 25 e 100 ml
- 4.5. Pipette tarate da 10 ml
- 4.6. Beute da 250 ml

5. PROCEDIMENTO

- 5.1. In un becher da 100 ml pesare una quantità (m) del prodotto, equivalente a circa 0,6 g di perossido di idrogeno. Travasare quantitativamente in un pallone tarato da 250 ml con l'aiuto di una piccola quantità di acqua, portare a volume con acqua e mescolare.
- 5.2. Pipettare 10 ml della soluzione di campione (5.1) in una beuta da 250 ml (4.6) e aggiungere successivamente 100 ml di acido solforico 2N (3.1), 20 ml di soluzione di ioduro di potassio (3.5) e tre gocce di soluzione di molibdato di ammonio (3.6).
- 5.3. Titolare immediatamente lo iodio formatosi con tiosolfato di sodio 0,1 N (3.4) e, subito prima di raggiungere il punto di equivalenza, aggiungere alcuni ml di salda di amido come indicatore. Rilevare il consumo di tiosolfato di sodio 0,1 N in ml (V).
- 5.4. Secondo il procedimento indicato ai punti 5.2 e 5.3, effettuare una prova in bianco sostituendo i 10 ml di soluzione di campione con 10 ml di acqua. Rilevare il consumo in ml di tiosolfato di sodio 0,1 N nella prova in bianco (V₀).

6. CALCOLO

Calcolare il tenore del prodotto in perossido di idrogeno in percentuale di massa (% m/m) mediante la seguente formula :

$$\% \text{ di perossido di idrogeno} = \frac{(V - V_0) \times 1,7008 \times 250 \times 100}{m \times 10 \times 1\,000} \text{ uguale}$$

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

in cui :

m = la quantità in grammi del prodotto esaminato (5.1),

V₀ = il consumo in ml di soluzione di tiosolfato 0,1 N nella prova in bianco (5.4),

V = il consumo in ml di soluzione di tiosolfato 0,1 N nella titolazione della soluzione di campione (5.3).

7. RIPETIBILITÀ ⁽¹⁾

Per un tenore in perossido di idrogeno di circa il 6 % la differenza tra i risultati di due dosaggi paralleli effettuati su un medesimo campione non deve superare lo 0,2 %.

⁽¹⁾ Secondo la norma ISO 5725.

II. IDENTIFICAZIONE E DOSAGGIO SEMIQUANTITATIVO DI ALCUNI COLORANTI DI OSSIDAZIONE NELLE TINTURE PER CAPELLI

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Questo metodo permette l'identificazione e il dosaggio semiquantitativo nelle tinture per capelli in forma di crema o di liquido delle seguenti sostanze :

Sostanze	Simbolo
<i>Diaminobenzeni</i>	
1-2 diaminobenzene (o. fenilendiamina)	(OPD)
1-3 diaminobenzene (m. fenilendiamina)	(MPD)
1-4 diaminobenzene (p. fenilendiamina)	(PPD)
<i>Diaminotolueni</i>	
3-4 diaminotoluene (o. toluilendiamina)	(OTD)
2-4 diaminotoluene (m. toluilendiamina)	(MTD)
2-5 diaminotoluene (p. toluilendiamina)	(PTD)
<i>Diaminofenoli</i>	
2-4 diaminofenolo	(DAP)
<i>Idrochinone</i>	
1-4 diidrossibenzene	(H)
<i>α-Naftolo</i>	
	(α N)
<i>Pirogallolo</i>	
1-2-3 triidrossibenzene	(P)
<i>Resorcina</i>	
1-3 diidrossibenzene	(R)

2. PRINCIPIO

I coloranti di ossidazione sono estratti a pH 10 dalle tinture sotto forma di crema o di liquido mediante etanolo a 96 % e identificati mediante cromatografia in strato sottile; monodimensionale (5) e/o bidimensionale (6).

Per il dosaggio semiquantitativo delle sostanze si raffronta il cromatogramma dei campioni, ottenuti mediante quattro sistemi di sviluppo, con quello delle soluzioni delle sostanze di riferimento cromatografate contemporaneamente.

3. REATTIVI

Tutti i reattivi devono essere di purezza analitica.

- 3.1. Etanolo assoluto
- 3.2. Acetone
- 3.3. Etanolo 96 % (v/v)
- 3.4. Idrossido di ammonio al 25 % ($d_4^{20} = 0,91$)

- 3.5. L(+) acido ascorbico
- 3.6. Cloroformio
- 3.7. Cicloesano
- 3.8. Azoto tecnico
- 3.9. Toluene
- 3.10. Benzene
- 3.11. n-Butanolo
- 3.12. Butan-2-olo
- 3.13. Acido ipofosforoso al 50 %
- 3.14. Reattivo diazoico :
potranno essere utilizzati :
— il 4-nitro-1-benzendiazonio salificato e stabilizzato con lo ione clorobenzensolfonato (per esempio Rosso 2 JN della Francolor o equivalente),
— il 2-cloro-4-nitro-1-benzendiazonio salificato e stabilizzato con lo ione naftalbenzoato (per esempio NNCD Reagent — Ref. n. 74150 della FLUKA o equivalente).
- 3.15. Nitrato d'argento
- 3.16. p-Dimetilaminobenzaldeide
- 3.17. 2-5 Dimetilfenolo
- 3.18. Cloruro ferrico esaidrato
- 3.19. Acido cloridrico 10 % (m/v)
- 3.20. **Sostanze di riferimento**
Le sostanze di riferimento sono quelle indicate al paragrafo 1 « Scopo e campo di applicazione ».
Nel caso degli aminocomposti la sostanza di riferimento deve essere costituita esclusivamente dalla forma cloridrata (mono o di) o dalla forma basica.
- 3.21. **Soluzione di riferimento allo 0,5 % (m/v)**
Preparare una soluzione allo 0,5 % (m/v) di ciascuna delle sostanze di riferimento (3.20).
Pesare 50 mg \pm 1 mg di sostanza di riferimento in un matraccio tarato da 10 ml.
Aggiungere 5 ml di etanolo a 96 % (3.3).
Aggiungere 250 mg di acido ascorbico (3.5).
Alcalinizzare mediante soluzione ammoniacale (3.4) fino a un pH di 10 controllato con cartina indicatrice.
Portare a 10 ml con etanolo a 96 % e mescolare.
Le soluzioni possono essere conservate per una settimana in un luogo fresco riparato dalla luce.
In alcuni casi, al momento di aggiungere acido ascorbico e idrossido di ammonio si può produrre del precipitato. È necessario allora lasciar sedimentare prima di procedere al prelievo.
- 3.22. **Solventi di sviluppo**
- 3.22.1. Acetone — cloroformio — toluene : 35-24-40 (v/v)
- 3.22.2. Cloroformio — cicloesano — etanolo assoluto — idrossido di ammonio 25 % ; 80-10-10-1 (v/v)
- 3.22.3. Benzene — butan-2-olo — acqua : 50-25-25 (v/v). Agitare bene la miscela e prelevare la fase superiore dopo aver decantato alla temperatura di laboratorio (tra 20 e 25 °C).
- 3.22.4. Butanolo-1 — cloroformio e reattivo M : 7-20-23 (v/v). Lasciare decantare accuratamente a 20—25 °C e prendere la fase inferiore.

Preparazione del reattivo M

NH ₄ OH al 25 % (v/v) (3.4)	24 parti (v/v)
Acido ipofosforoso al 50 % (3.13)	1 parte (v/v)
H ₂ O	75 parti (v/v)

Osservazione

I solventi di sviluppo contenenti idrossido di ammonio devono essere agitati bene immediatamente prima dell'uso.

3.23. **Rivelatori**3.23.1. *Reattivo diazoico*

Fare una soluzione acquosa al 5 % (m/v) del reattivo (3.14) prescelto.
Tale soluzione deve essere preparata al momento dell'impiego.

3.23.2. *Reattivo di Ehrlich*

Disciogliere 2 g di p-dimetilamminobenzaldeide (3.16) in 100 ml di acido cloridrico al 10 % (m/v) (3.19).

3.23.3. *2—5 Dimetilfenolo-cloruro ferrico, esaidrato**Soluzione 1:*

sciogliere 1 g di dimetilfenolo (3.17) in 100 ml di etanolo a 96 % (3.3)

Soluzione 2:

sciogliere 4 g di cloruro ferrico esaidrato (3.18) in 100 ml di etanolo a 96 % (3.3)

Al momento della rivelazione si nebulizzano separatamente prima la soluzione 1, poi la soluzione 2.

3.23.4. *Nitrato d'argento ammoniacale*

A una soluzione acquosa al 5 % (m/v) di nitrato d'argento (3.15) aggiungere idrossido di ammonio al 25 % (3.4) fino alla dissoluzione del precipitato. Questo reattivo verrà preparato al momento dell'impiego. Non conservare.

4. **ATTREZZATURA**

4.1. Normale attrezzatura di laboratorio per cromatografia su strato sottile.

4.1.1. Campana o cappa in plastica o vetro costruita in modo da consentire il mantenimento della lastra cromatografica in atmosfera di azoto durante il deposito delle soluzioni fino allo sviluppo. Questa precauzione è necessaria per via della grande ossidabilità di alcuni coloranti.

4.1.2. Siringa da 10 µl, graduata per intervalli di 0,2 µl con un ago a sezione perpendicolare all'asse longitudinale o meglio un « repeating dispenser » da 50 µl montato su supporto in modo da consentire la sistemazione della lastra in atmosfera di azoto.

4.1.3. Lastre pronte per l'uso, di gel di silice, di 0,25 mm di spessore, di dimensioni 20 × 20 cm (Macherey e Nagel, Silice G-HR, con supporto in materiale plastico, o equivalenti).

4.2. Centrifuga da 4 000 giri/minuto.

4.3. Tubi per centrifuga da 10 ml con chiusura mediante tappo a vite.

5. **MODO DI OPERARE**5.1. **Trattamento dei campioni**

Eliminare i primi 2 o 3 centimetri di crema del tubo. In un tubo per centrifuga (4.3) preliminarmente saturato con azoto introdurre:

300 mg di acido ascorbico

3 g di crema o 3 g di liquido omogeneizzato.

Qualora il pH fosse inferiore a 10 aggiungere qualche goccia di idrossido di ammonio al 25 % (3.4) e portare a 10 ml con etanolo a 96 % (3.3).

Omogeneizzare in atmosfera di azoto, tappare, poi centrifugare a 4 000 giri al minuto per 10 minuti.

Utilizzare la soluzione sovrastante.

5.2. Cromatografia**5.2.1. Deposizione della soluzione**

Deporre, in atmosfera di azoto su una lastra cromatografica (4.1.3) su 9 punti di partenza 1 μ l ciascuna delle soluzioni di riferimento descritte.

Queste soluzioni di riferimento sono suddivise nel modo seguente :

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

Deporre quindi sul 10° e sull'11° punto 2 μ l delle soluzioni campione ottenute al punto 5.1. Conservare la lastra in atmosfera di azoto fino al momento in cui viene cromatografata.

5.2.2. Sviluppo

Introdurre la lastra in una vaschetta saturata con uno dei quattro solventi appropriati (3.22) in atmosfera di azoto e lasciare sviluppare a temperatura ambiente (da 20 a 25 °C) e al buio fino a che il fronte del solvente abbia percorso circa 15 cm a partire dalla linea di partenza.

Estrarre la lastra e asciugarla in atmosfera di azoto a temperatura ambiente.

5.2.3. Rivelazione

Nebulizzare subito la lastra con uno dei quattro rivelatori citati al punto 3.23.

5.2.4. Identificazione

Si confrontano gli Rf e i colori ottenuti per il campione con quelli delle sostanze di riferimento.

Sono indicati nella tabella I, a titolo indicativo, gli Rf e le colorazioni ottenute per ciascuna sostanza in funzione dei diversi solventi di sviluppo e dei rivelatori.

In caso di identificazione dubbia si può, talvolta, ottenere una conferma aggiungendo al campione in esame la sostanza di riferimento corrispondente.

5.2.5. Dosaggio semiquantitativo

Si confronta visivamente l'intensità del colore della macchia corrispondente alla sostanza identificata come in 5.2.4 con quella delle macchie corrispondenti a deposizioni di soluzioni della sostanza di riferimento aventi concentrazione nota ed appropriata.

Quando la concentrazione nel campione del componente da analizzare è troppo alta, diluire convenientemente la soluzione da cromatografare ed effettuare un nuovo dosaggio.

TABELLA I

Rf e colorazioni ottenute immediatamente dopo rivelazione

Prodotti di riferimento (3.20)	Solventi di sviluppo				Rivelatori			
	Rf				Colorazioni			
	3.22.1	3.22.2	3.22.3	3.22.4	Reattivo diazoico (3.23.1)	Reattivo di Ehrlich (3.23.2)	Reattivo di dimetilfenolo (3.23.3)	Reattivo di nitrato d'argento (3.23.4)
OPD	0,62	0,60	0,30	0,57	Marrone pallido	—	—	Marrone pallido
MPD	0,40	0,60	0,47	0,48	Marrone violaceo*	Giallo	Marrone pallido	Marrone pallido
PPD	0,20	0,50	0,30	0,48	Marrone	Rosso vivo*	Violetto	Grigio
OTD	0,60	0,60	0,53	0,60	Marrone*	Arancione pallido	Marrone pallido	Marrone-grigio
MTD	0,40	0,67	0,45	0,60	Marrone rosso*	Giallo	Marrone	Nero
PTD	0,33	0,65	0,37	0,70	Marrone	Arancione	Violetto*	Grigio
DAP	0,07	—	0	0,05	Marrone*	Arancione	Violetto	Marrone
H	0,50	0,35	0,80	0,20	—	Arancione	Violetto	Nero*
α N	0,90	0,80	0,90	0,75	Arancione marrone	—	Violetto*	Nero
P	0,37	—	0,67	0,05	Marrone	Violetto chiarissimo	Marrone chiarissimo	Marrone*
R	0,50	0,37	0,80	0,17	Arancione*	Violetto pallido	Marrone chiarissimo	Marrone pallido

Note: 1. L'OPD è rivelato debolmente, l'eluente 3.22.3 deve essere utilizzato per separarlo nettamente dall'OTD.
2. * indica le rivelazione ottimale.

6. ESAME MEDIANTE CROMATOGRAFIA BIDIMENSIONALE SU STRATO SOTTILE

La cromatografia bidimensionale su strato sottile qui descritta rende necessario il ricorso ai reattivi e prodotti supplementari di seguito elencati.

6.1. Sostanze e soluzioni di riferimento

- 6.1.1. β-Naftolo (β-N)
- 6.1.2. 2-Aminofenolo (OAP)
- 6.1.3. 3-Aminofenolo (MAP)
- 6.1.4. 4-Aminofenolo (PAP)
- 6.1.5. 2-Nitro-p-fenilendiamina (2 NPPD)
- 6.1.6. 4-Nitro-o-fenilendiamina (4 NOPD)

Preparare una soluzione allo 0,5 % (m/v) di ciascuna delle suddette sostanze di riferimento, come indicato al punto 3.21.

6.2. Solvente di sviluppo

- 6.2.1. Acetato di etile-cicloesano-idrossido di ammonio al 25 % : 65-35-0,5 (v/v)

6.3. Rivelatore

Sistemare in una vaschetta per cromatografia su strato sottile circa 2 g di iodio, contenuti in un opportuno recipiente e chiudere ermeticamente.

- 6.4. **Cromatografia**
- 6.4.1. Tracciare, come indicato nella figura 1, due linee sullo strato di silice di una lastra cromatografica per strato sottile (4.1.3).
- 6.4.2. In atmosfera di azoto, deporre sul punto di partenza 1 (figura 1) da 1 a 4 μ l di estratto (5.1). La quantità dipende dall'intensità delle macchie ottenute sul cromatogramma (5.2).
- 6.4.3. Deporre, suddivisi tra i punti 2 e 3 (figura 1), i coloranti di ossidazione identificati (o supposti identificati) al punto 5.2. Distanza tra le macchie 1,5 cm. Deporre 2 μ l di ciascuna delle soluzioni di riferimento ad eccezione del DAP di cui è necessario deporre 6 μ l. Operare in atmosfera di azoto (6.4.2).
- 6.4.4. Ripetere l'operazione descritta al punto 6.4.3 per i punti di partenza 4 e 5 (figura 1) e conservare la lastra in atmosfera di azoto fino all'effettuazione della cromatografia.
- 6.4.5. Saturare una vaschetta per cromatografia con azoto e introdurre una quantità appropriata di solvente di sviluppo (3.22.2). Sistemare la lastra (6.4.4) nella vaschetta e cromatografare nella prima direzione d'eluizione (figura 1) al riparo dalla luce. Cromatografare fino al momento in cui il fronte del solvente raggiunga la linea tracciata sullo strato assorbente.
- 6.4.6. Estrarre la lastra dalla vaschetta e sistemarla nell'apparecchiatura (4.1) sotto atmosfera di azoto per almeno 1 ora, allo scopo di allontanare il solvente residuo.
- 6.4.7. Introdurre mediante un cilindro graduato, in una vaschetta dalla quale è stata scacciata completamente l'aria con una corrente di azoto, una quantità appropriata di miscela solvente (6.2.1). In tale vaschetta si sistema la lastrina dopo averla ruotata di 90° rispetto alla prima direzione di sviluppo. Si fa procedere la cromatografia in questa seconda direzione, ed al buio, finché il fronte del solvente non raggiunga la linea tracciata sullo strato di silice. Tale lastrina si asciuga quindi all'aria.
- 6.4.8. Sistemare la lastra per 10 minuti nella vaschetta cromatografica in atmosfera di vapori di iodio (6.3) e interpretare il cromatogramma bidimensionale mediante i valori R_f e del colore delle sostanze di riferimento cromatografate contemporaneamente (tabella II).

Osservazioni

Per ottenere una migliore colorazione delle macchie lasciare la lastrina, dopo lo sviluppo, ad asciugare per trenta minuti all'aria.

- 6.4.9. La presenza di coloranti di ossidazione trovati in 6.4.8 può essere confermata inequivocabilmente ripetendo le operazioni descritte dal punto 6.4.1 al punto 6.4.8 compreso, aggiungendo sul punto di partenza 1, accanto alla quantità di estratto prescritta in 6.4.2, 1 μ l delle sostanze di riferimento identificate in 6.4.8.

Se non viene trovata alcun'altra macchia, per raffronto col cromatogramma ottenuto in 6.4.8, l'interpretazione del cromatogramma 6.4.8 è corretta.

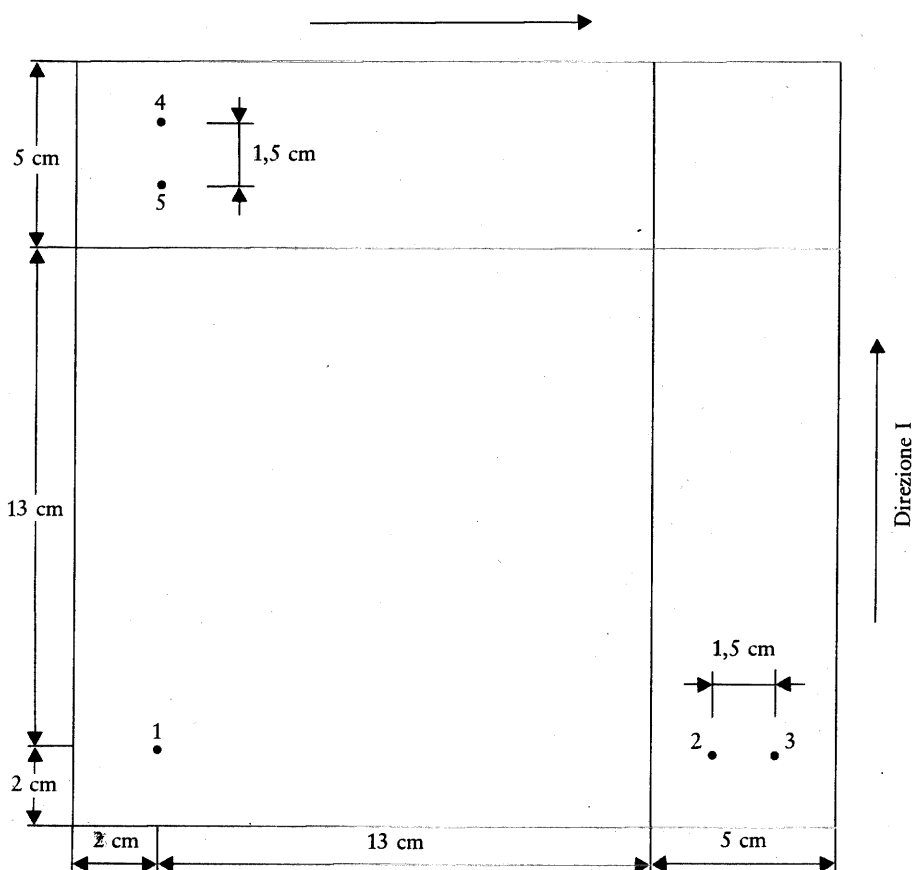
TABELLA II

Colore delle sostanze di riferimento cromatografate e rivelate mediante vapori di iodio

Sostanze di riferimento	Colorazione dopo rivelazione ai vapori di iodio
R	Beige
P	Marrone
α -N	Violetto
β -N	Marrone chiaro
H	Violetto-marrone
MPD	Giallo-marrone
PPD	Violetto-marrone
MTD	Marrone scuro
PTD	Giallo-marrone
DAP	Marrone scuro
AOP	Arancione
MAP	Giallo-marrone
PAP	Violetto-marrone
2-NPPD	Marrone
4-NOPD	Arancione

Figura 1

Direzione II



III. IDENTIFICAZIONE E DOSAGGIO DEI NITRITI

A. IDENTIFICAZIONE

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Il metodo descritto serve all'identificazione dei nitriti nei prodotti cosmetici ; esso è applicabile, in particolare, alle creme, ai prodotti pastosi e ai dentifrici.

2. PRINCIPIO

La rilevazione dei nitriti ha luogo mediante il fenilidrazione della 2-aminobenzaldeide.

3. REATTIVI

Tutti i reattivi devono essere di purezza analitica

3.1. Acido solforico diluito :

diluire 2 ml di acido solforico concentrato ($d_4^{20} = 1,84$) in 11 ml d'acqua distillata.

3.2. Acido cloridrico diluito :

diluire 1 ml di acido cloridrico concentrato ($d_4^{20} = 1,19$) in 11 ml di acqua distillata.

3.3. Metanolo

3.4. Soluzione del fenilidrazione della 2-aminobenzaldeide (reagente Nitrina R) in metanolo.

Pesare 2 g di Nitrina R e introdurla in un pallone tarato da 100 ml. Aggiungere goccia a goccia 4 ml di acido cloridrico diluito (3.2) e mescolare. Portare a volume con metanolo (3.3) e agitare finché la soluzione sia completamente limpida. Conservare la soluzione in un flacone di vetro scuro (4.3).

4. ATTREZZATURA

4.1. Becher da 50 ml

4.2. Pallone tarato da 100 ml

4.3. Flacone di vetro scuro da 125 ml

4.4. Lastra di vetro di 10 × 10 cm

4.5. Spatola di materiale sintetico

4.6. Carta da filtro 10 × 10 cm

5. PROCEDIMENTO

5.1. Spandere uniformemente una parte del campione da esaminare sulla lastra di vetro (4.4). Fare attenzione che lo spessore dello strato non sia superiore a 1 cm.

5.2. Immergere un foglio di carta da filtro (4.6) nell'acqua distillata e depositarlo sul campione facendolo aderire convenientemente per mezzo di una spatola (4.5).

5.3. Attendere circa 1 minuto e versare al centro della carta da filtro:

— 2 gocce di acido solforico diluito (3.1) e poi

— 2 gocce della soluzione di Nitrina (3.4).

5.4. Dopo 5-10 secondi, togliere la carta da filtro ed esaminarla alla luce del giorno. Una colorazione rosso-violetta indica la presenza di nitriti.

Quando il tenore di nitriti è poco elevato, il colore violetto vira al giallo dopo 5-15 secondi. Quando il tenore di nitriti è più elevato, il cambiamento di colore ha luogo soltanto dopo 1-2 minuti.

6. NOTA

L'intensità del colore violetto e il tempo per il viraggio al giallo può dare una indicazione del tenore dei nitriti nel campione.

B. DETERMINAZIONE

1. SCOPO E CAMPO D'APPLICAZIONE

Il metodo descrive il dosaggio dei nitriti nei prodotti cosmetici.

2. DEFINIZIONE

Il tenore in nitriti del campione determinato in base al metodo indicato è espresso come percentuale in massa di nitrito sodico.

3. PRINCIPIO

Dopo diluizione in acqua e chiarificazione del campione, si fa reagire il nitrito presente con solfanilamide e N-1-naftil-etilendiammina. Si sviluppa un colore la cui assorbanza si misura a 538 nm.

4. REATTIVI

Tutti i reattivi devono essere di purezza analitica.

4.1. Reattivi per la chiarificazione (tali reattivi non devono essere utilizzati una settimana dopo la loro preparazione)

4.1.1. Reattivo Carrez I

Sciogliere 106 g di ferrocianuro (II) di potassio, $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$, nell'acqua distillata e portare con acqua a 1 000 ml.

4.1.2. Reattivo Carrez II

Sciogliere 219,5 g di acetato di zinco, $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ e 30 ml di acido acetico glaciale nell'acqua distillata e portare con acqua a 1 000 ml.

4.2. Soluzione di nitrito sodico

In un pallone tarato da 1 000 ml sciogliere 0,500 g di nitrito sodico in acqua distillata e portare a volume. Diluire con acqua 100 ml di questa soluzione madre fino al volume di 500 ml; la concentrazione di questa soluzione è tale che 1,0 ml corrisponde a 10 µg di nitrito di sodio.

4.3. Soluzione di idrossido di sodio 1N

4.4. Soluzione di cloridrato di solfanilammide allo 0,2 %

Sciogliere 2,0 g di solfanilammide in 800 ml di acqua, riscaldando. Lasciar raffreddare e aggiungere 100 ml di HCl concentrato, agitando. Portare con acqua al volume di 1 000 ml.

4.5. Acido cloridrico 5 N

4.6. Reattivo N 1 naftile

La soluzione deve essere preparata il giorno stesso dell'impiego.

Sciogliere 0,1 g di dicloridrato di N-1-naftiletilendiammina in acqua e portare al volume di 100 ml.

5. APPARECCHIATURE

5.1. Bilancia analitica

5.2. Palloni tarati da 100, 250, 500 e 1 000 ml

5.3. Pipette tarate

- 5.4. Cilindri graduati da 100 ml
- 5.5. Filtro a pieghe, esente da nitriti, di 15 cm di diametro
- 5.6. Bagnomaria
- 5.7. Spettrofotometro con celle di 1 cm di percorso ottico
- 5.8. pH metro
- 5.9. Microburette da 10 ml
- 5.10. Becher da 50 ml

6. PROCEDIMENTO

- 6.1. Pesare con la precisione di 0,1 mg, circa 0,5 g (m) del campione omogeneizzato, introdurlo dentro un pallone da 250 ml con acqua distillata calda al volume di 150 ml circa. Tenere a bagnomaria a 80 ° per una mezzora, agitando di tanto in tanto il contenuto.
- 6.2. Lasciare raffreddare il contenuto alla temperatura ambiente e aggiungere successivamente agitando 2 ml del reattivo Carrez I (4.1.1) e 2 ml del reattivo Carrez II (4.1.2).
- 6.3. Portare il pH a 8,3 per mezzo di una soluzione 1 N di idrossido di sodio (4.3). Usare un pH metro per la misurazione del pH della soluzione. Trasferire quantitativamente il contenuto in un matraccio tarato da 250 ml e portare a volume con acqua distillata.
- 6.4. Agitare il contenuto e filtrare su filtro a pieghe (5.5).
- 6.5. Pipettare un'opportuna quantità (V ml) di filtrato limpido, ma in ogni caso non più di 25 ml, in un matraccio tarato da 100 ml e diluire con acqua distillata a 60 ml.
- 6.6. Dopo aver mescolato, aggiungere 10,0 ml di soluzione di acido cloridrico 5 N (4.5). Mescolare e lasciare riposare per 5 minuti. Aggiungere 2,0 ml del reattivo N-1-naftile (4.6), mescolare e lasciar riposare per 3 minuti. Portare con acqua al volume di 100 ml e mescolare.
- 6.7. Preparare un saggio in bianco ripetendo le operazioni descritte in 6.5 e 6.6 senza aggiunta del reattivo N-1-naftile (4.6).
- 6.8. Misurare (5.7) la densità ottica, a 538 nm, della soluzione campione (6.6) in confronto con il « bianco » (6.7).
- 6.9. Leggere sulla curva di taratura (6.10) il tenore in nitrito di sodio in µg per 100 ml di soluzione da misurare (m_1) che corrisponda all'estinzione misurata per il campione (6.8).
- 6.10. Curva di taratura
Preparare, usando la soluzione di nitrito di sodio (4.2) una serie di soluzioni a differenti concentrazioni (0-20-40-60-80-100 µg di sodio nitrito per 100 ml). Dopo reazione, misurare per ognuna di esse l'assorbanza a 538 nm e costruire una curva di taratura.

7. CALCOLO

Calcolare il tenore in nitrito di sodio del campione, come percentuale della massa, per mezzo della seguente formula :

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

in cui :

m = la massa in grammi del campione in esame (6.1),

m_1 = il tenore in nitrito di sodio in microgrammi riscontrato in base alle indicazioni del punto 6.9,

V = il numero di ml di filtrato utilizzato per la misurazione (6.5).

8. RIPETIBILITÀ ⁽¹⁾

Per un contenuto di circa 0,2 % di nitrito di sodio la differenza tra i risultati di due dosaggi paralleli effettuati sul medesimo campione non deve superare lo 0,005 % in valore assoluto.

IV. IDENTIFICAZIONE E DOSAGGIO DELLA FORMALDEIDE LIBERA

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Il metodo descrive l'identificazione ed il dosaggio della formaldeide libera. Esso è applicabile a tutti i prodotti cosmetici ed è articolato in tre punti :

1.1. Identificazione (I)

1.2. Dosaggio colorimetrico con acetilacetone (II)

Questo metodo tuttavia non è applicabile quando la formaldeide è combinata o polimerizzata come nel caso di sostanze che cedano formaldeide.

Se il risultato ottenuto con tale metodo supera la concentrazione massima autorizzata nel prodotto in esame, si deve utilizzare il metodo seguente.

1.3. Dosaggio con bisolfito (III)

Tale metodo evita di tener conto della formaldeide combinata o polimerizzata. Tuttavia interferiscono certe combinazioni labili (per esempio l'esametilentetramina).

Inoltre la determinazione finale, che si compie titrimetricamente, può essere disturbata da parte di sostanze tamponanti.

2. DEFINIZIONE

Il contenuto nel campione di formaldeide libera, determinato secondo questo metodo, viene espresso in percentuale di massa (% m/m).

3. PRINCIPIO

3.1. Parte I — Identificazione

La formaldeide in ambiente di acido solforico dà una colorazione rosa o malva con il reattivo di Schiff.

3.2. Parte II — Dosaggio con acetilacetone

La formaldeide reagisce con acetilacetone, in presenza di acetato di ammonio, per formare la 3,5 diacetil-1,4-diidrotoluidina, che viene estratta con n-butanolo. Si misura a 410 nm l'assorbanza dell'estratto butanologico.

⁽¹⁾ Secondo la norma ISO 5725.

3.3. Parte III — Dosaggio con bisolfito

La formaldeide reagisce con il solfito, in ambiente acido e alla temperatura di 0 °C, per formare un composto di addizione. In questa reazione si liberano dei protoni in quantità stechiometrica rispetto alla formaldeide. La titolazione di tali protoni con soluzione di sodio idrossido rappresenta la base del calcolo per determinare la quantità di formaldeide presente. Una prova in bianco, senza solfito, consente di determinare l'acidità o l'alcalinità del mezzo in esame.

4. REATTIVI

Tutti i reattivi devono essere di purezza analitica.

4.1. Acido acetico glaciale

4.2. Ammonio acetato anidro

4.3. n-Butanolo

4.4. Acido solforico, circa 2 N

4.5. Soluzione di sodio solfito 0,1 M, preparata di fresco

4.6. Reattivo di Schiff

In un becher pesare 100 mg di fucsina e solubilizzarli alla temperatura di 80 °C con 75 ml di acqua.

Raffreddare ed aggiungere 2,5 g di sodio solfito eptaidrato e 1,5 ml di acido cloridrico concentrato (d_4^{20} : 1,19).

Portare a 100 ml. Questo reattivo non è più usabile due settimane dopo la preparazione.

4.7. Reattivo all'acetilacetone

In un matraccio tarato da 1 000 ml solubilizzare :

150 g di ammonio acetato (4.2)

2 ml di acetilacetone distillato di recente sotto pressione ridotta e tale da non presentare assorbanza a 410 nm

3 ml di acido acetico glaciale (4.1)

Portare a volume con acqua (pH della soluzione circa 6,4). Questo reattivo deve essere preparato di recente.

4.8. Soluzione titolata di acido solforico 0,1 N

4.9. Soluzione titolata di sodio idrossido 0,1 N

4.10. Soluzione titolata di iodio 0,1 N

4.11. Soluzione titolata di sodio tiosolfato 0,1 N

4.12. Soluzione di riferimento concentrata di formaldeide

In un matraccio tarato da 1 000 ml, introdurre 5 g di soluzione di formaldeide al 37—40 % e portare a volume con acqua.

Determinazione del titolo in formaldeide di tale soluzione : prelevare 10,00 ml, aggiungere 25,00 ml di soluzione titolata di iodio (4.10) e 10 ml di soluzione di sodio idrossido 1 N. Lasciare a riposo per 5 minuti.

Acidificare con 11 ml di HCl 1 N e titolare l'eccesso di soluzione titolata di iodio (4.10) con la soluzione titolata di sodio tiosolfato (4.11), usando salda d'amido come indicatore.

1,0 ml di soluzione titolata di iodio (4.10) corrisponde a 1,5 mg di formaldeide.

4.13. Soluzione di riferimento di formaldeide

Prelevare 5,0 ml della soluzione concentrata (4.12) in un matraccio tarato da 100 ml e portare a volume con acqua demineralizzata. Prelevare 5,0 ml della suddescritta soluzione e diluirli in un matraccio tarato da 500 ml portando a volume con acqua demineralizzata. 1 ml di quest'ultima soluzione contiene circa 1 µg di formaldeide. Questo titolo va controllato esattamente.

4.14. Soluzione di timolftaleina

Solubilizzare 100 mg di timolftaleina con 100 ml di etanolo 50 % (v/v)

4.15. Reattivo (4.7) preparato nelle medesime condizioni ma privo di acetilacetone

5. APPARECCHIATURA

5.1. Materiale comune di laboratorio

5.2. Filtro « separatore di fasi », Whatman 1 PS o analogo

5.3. Centrifuga

- 5.4. Spettrofotometro
- 5.5. Cellette di vetro con cammino ottico di 1 cm
- 5.6. Potenzimetro munito di registratore
- 5.7. Elettrodi di vetro/calomelano (si raccomanda di usare elettrodi adatti a basse temperature).
6. MODALITÀ OPERATIVE
- 6.1. Identificazione
- 6.1.1. In un becher da 10 ml introdurre circa 2 g di campione
- 6.1.2. Aggiungere 2 gocce di acido solforico (4.4) e 2 ml di reattivo di Schiff (4.6) rigorosamente incolore. Agitare e lasciare a riposo per 5 minuti
- 6.1.3. Se entro 5 minuti si nota una colorazione rosa o malva, la quantità di formaldeide presente è superiore allo 0,01 %. Procedere allora al dosaggio come descritto al punto 6.2 e se necessario 6.3
- 6.2. Dosaggio colorimetrico con acetilacetone
- Preparazione della soluzione del campione da analizzare*
- 6.2.1.1. In un matraccio tarato da 100 ml pesare con la precisione di 0,001 g, una quantità (m espressa in g) di campione da analizzare, tale da contenere circa 150 µg di formaldeide
- 6.2.1.2. Portare a volume con acqua e mescolare
- 6.2.1.3. Porre in una beuta da 50 ml :
10,00 ml di soluzione (6.2.1.2)
5,00 ml di reattivo all'acetilacetone (4.7)
Acqua demineralizzata fino ad un volume totale di 30 ml
- 6.2.2. *Soluzione di riferimento*
Le possibili interferenze di un colore di fondo presente nel campione in esame possono essere eliminate con questa soluzione di riferimento :
Porre in una beuta da 50 ml :
10,00 ml di soluzione (6.2.1.2)
5,00 ml di soluzione (4.13)
Acqua demineralizzata fino ad un volume totale di 30 ml
- 6.2.3. *Soluzione per la prova in bianco*
Porre in una beuta da 50 ml :
5,00 ml di reattivo all'acetilacetone (4.7)
Acqua demineralizzata fino ad un volume totale di 30 ml
- 6.2.4. *Dosaggio*
- 6.2.4.1. Agitare le soluzioni preparate come indicato ai punti 6.2.1.3, 6.2.2 e 6.2.3.
Immergere le beute in un bagnomaria alla temperatura di 60 °C per 10 minuti esatti.
Raffreddare poi ponendo le suddette beute per 2 minuti in un bagno d'acqua ghiacciata.

- 6.2.4.2. Trasferire separatamente il contenuto di ogni beuta in un imbuto separatore da 50 ml, contenente 10,0 ml di n-butanolo (4.3). Lavare ogni beuta con 3-5 ml di acqua ed aggiungere tale soluzione ai rispettivi imbuto separatori. Agitare vigorosamente ogni imbuto separatore per 30 secondi esatti. Lasciare decantare
- 6.2.4.3. Filtrare le fasi organiche con filtro « separatore di fasi » (5.2) nelle cellette di misura (5.5). Si può ugualmente utilizzare una centrifugazione della fase organica (5 000 giri/minuto per 5 minuti)
- 6.2.4.4. Misurare l'assorbanza A_1 a 410 nm della fase organica della soluzione 6.2.1.3 rispetto alla fase organica della soluzione 6.2.2
- 6.2.4.5. Analogamente misurare l'assorbanza A_2 della fase organica della soluzione 6.2.3 rispetto al n-butanolo (4.3)

NB : Queste operazioni devono avvenire entro 25 minuti dall'inizio della termostatazione a 60 °C.

6.2.5. *Curva di taratura*

- 6.2.5.1. Porre in una beuta da 50 ml :
5,00 ml di soluzione di riferimento diluita (4.13)
5,00 ml di reattivo all'acetilacetone (4.7)
Acqua demineralizzata fino ad un volume totale di 30 ml
- 6.2.5.2. Continuare il procedimento analitico come descritto in 6.2.4.5 e misurare l'assorbanza usando n-butanolo (4.3) come riferimento
- 6.2.5.3. Ripetere il procedimento con 10, 15, 20, 25 ml di soluzione standard diluita (4.13)
- 6.2.5.4. Per ottenere il valore del punto 0 (corrispondente all'assorbanza del reattivo) procedere come descritto al punto 6.2.4.5.
- 6.2.5.5. Costruire la curva di taratura dopo sottrazione del valore dell'assorbanza del punto 0 al valore di ogni assorbanza ottenuta ai punti 6.2.5.1 e 6.2.5.3

La legge di Beer è rispettata per una quantità di formaldeide che non superi i 30 µg.

6.3. *Dosaggio con bisolfito*

6.3.1. *Prelievo del campione*

6.3.1.1. Campione da sottoporre ad analisi

In un becher tarato pesare, con la precisione di 0,001 g, una massa di campione (m espresso in g) corrispondente ad una quantità di formaldeide compresa tra 3 e 20 mg

6.3.1.2. Campione di riferimento

Nelle stesse condizioni pesare una quantità analoga (m' espresso in g) dello stesso campione

6.3.2. *Determinazione*

6.3.2.1. Porre in un becher da 100 ml 50,00 ml di soluzione di sodio solfito (4.5) ed aggiungere 10,00 ml di soluzione di acido solforico (4.8). Mescolare

6.3.2.2. Porre il becher in un miscela di ghiaccio e sale portando la temperatura della soluzione 6.3.2.1 a 2 °C

Aggiungere quantitativamente il prelievo di campione m (6.3.1.1)

6.3.2.3. Titolare rapidamente potenziometricamente con soluzione di sodio idrossido (4.9) agitando di continuo e controllando che la temperatura resti costante tra 2 °C e 4 °C (Il punto di neutralità si osserva tra pH 9 e 11. Sia V_1 il volume di soluzione di sodio idrossido (4.9) consumato espresso in ml

- 6.3.3. *Prova in bianco*
 Titolare la soluzione 6.3.2.1 nelle condizioni descritte al punto 6.3.2. Sia V_2 il volume di soluzione di sodio idrossido (4.9) consumato espresso in ml
- 6.3.4. *Prova sul campione riferimento*
 Determinare l'acidità o l'alcalinità del campione in esame per titolazione potenziometrica con soluzione di sodio idrossido (4.9) o di acido solforico (4.8) del prelievo di campione m' (6.3.1.2)
 Sia V' il volume di soluzione di sodio idrossido o di acido solforico utilizzato espresso in ml. V' può essere uguale a 0
- 6.3.5. NB:
 È importante attenersi scrupolosamente alle modalità operative descritte.
 È possibile effettuare il dosaggio in presenza di soluzione di timolftaleina (4.14) come indicatore.

7. CALCOLI

7.1. Dosaggio colorimetrico con acetilacetone

- 7.1.1. Sottrarre il valore di A_2 e A_1 e leggere sulla curva di taratura (6.2.5.5) la quantità C di formaldeide espressa in μg contenuta nella soluzione (6.2.1.1)
- 7.1.2. Il contenuto in formaldeide del campione espresso in percentuale di massa (% m/m) si calcola con la seguente formula :

$$\% \text{ formaldeide} = \frac{C}{10^3 \cdot m}$$

7.2. Dosaggio con bisolfito

Correlare il volume di sodio idrossido (4.9) o di acido solforico (4.8) (V'), consumato nella prova sul campione di riferimento m' (6.3.4) alla massa di campione da analizzare m mediante la seguente formula :

$$v = \frac{v' \cdot m}{m'}$$

Per prodotti neutri $v = 0$

7.2.1. Per prodotti acidi

$$\% \text{ formaldeide} = \frac{0,30 (V_2 - V_1 + v)}{m}$$

7.2.2. Per prodotti alcalini

$$\% \text{ formaldeide} = \frac{0,30 (V_2 - V_1 - v)}{m}$$

- 7.3. Se i risultati dei due metodi differiscono, bisogna prendere in considerazione il valore più basso.

8. RIPETIBILITÀ ⁽¹⁾

Per un contenuto di formaldeide dello 0,2 %, la differenza fra i risultati di due determinazioni parallele effettuate sullo stesso campione non deve superare :

0,005 % per il dosaggio colorimetrico con acetilacetone

0,05 % per il dosaggio con bisolfito.

⁽¹⁾ Secondo la norma ISO 5725.

V. DETERMINAZIONE DELLA RESORCINA NEGLI SHAMPOO E NELLE LOZIONI PER CAPELLI

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Il presente metodo descrive la determinazione gascromatografica della resorcina negli shampoo e lozioni per capelli.

Esso è applicabile per concentrazioni di resorcina in prodotti finiti oscillanti tra 0,1 % e 2 % in massa.

2. DEFINIZIONE

Il titolo di resorcina determinato secondo questo metodo si esprime in percentuale di massa.

3. PRINCIPIO

La resorcina ed il 3,5-diidrossitoluene, aggiunto come standard interno, vengono separati dal campione in esame mediante cromatografia su strato sottile. I due composti vengono poi isolati raschiando via dalla lastrina cromatografica le aree di gel di silice corrispondenti alle loro macchie ed eluendole con metanolo. Infine i composti estratti vengono essiccati, sililati e determinati gascromatograficamente.

4. REATTIVI

Tutti i reattivi devono essere di purezza analitica.

4.1. Acido cloridrico 25 % (m/m)

4.2. Metanolo

4.3. Etanolo 96 % (v/v)

4.4. Lastrine di gel di silice con indicatore di fluorescenza, pronte per l'uso, supportate su fogli di alluminio o plastica, disattivate (dim. 20 × 20 cm). Disattivare nel seguente modo: spruzzare le lastrine con acqua finché assumano un aspetto brillante.

Asciugarle a temperatura ambiente per 1-3 ore.

NB :

Se le lastrine non sono disattivate si può avere una perdita di resorcina per adsorbimento irreversibile sulla silice.

4.5. Solvente di sviluppo: acetone-cloroformio-acido acetico (20-75-5 v/v)

4.6. Soluzione di riferimento di resorcina: solubilizzare 400 mg di resorcina esattamente pesati in 100 ml di etanolo (4.3) (1 ml corrisponde a 4 000 µg di resorcina)

4.7. Soluzione di standard interno: solubilizzare 400 mg di 3,5-diidrossitoluene (DIT) in 100 ml di etanolo (4.3) (1 ml corrisponde a 4 000 µg di DIT)

4.8. Miscela standard: 10 ml di soluzione 4.6 e 10 ml di soluzione 4.7 vengono pipettati in un matraccio tarato da 100 ml. Si porta a volume con etanolo (4.3) e si agita (1 ml corrisponde a 400 µg di resorcina e 400 µg di DIT)

4.9. Agenti sililanti

4.9.1. N, O-bis-(trimetilsilil)trifluoroacetamide (BSTFA)

4.9.2. Esametildisilazano (HMDS)

4.9.3. Trimetilclorosilano (TMCS)

5. APPARECCHIATURA
- 5.1. Attrezzatura comune per cromatografia su strato sottile ed in fase gassosa
- 5.2. Vetreria comune di laboratorio
6. PROCEDIMENTO
- 6.1. Preparazione dei campioni
- 6.1.1. Pesare accuratamente, in un becher da 150 ml, una quantità (M grammi) di prodotto tale da contenere approssimativamente da 20 a 50 mg di resorcina.
- 6.1.2. Acidificare con acido cloridrico (4.1) (circa 2-4 ml). Aggiungere 10 ml (40 mg di DIT) della soluzione di standard interno (4.7) e mescolare.
Trasferire in un matraccio tarato da 100 ml con l'ausilio di etanolo (4.3), portare a volume con lo stesso solvente ed agitare.
- 6.1.3. Depositare 250 µl della soluzione 6.1.2 su di una lastrina di gel di silice disattivata (4.4) su una linea continua di 8 cm di lunghezza. Assicurarsi che tale deposizione sia il più possibile sottile.
- 6.1.4. Depositare nelle medesime condizioni (6.1.3) e sulla stessa lastra 250 µl di miscela standard (4.8).
- 6.1.5. Depositare sempre su questa lastrina, parallelamente alle due deposizioni descritte (6.1.3 e 6.1.4) in due punti diversi 5 µl di ciascuna delle soluzioni 4.6 e 4.7 in modo da facilitare la localizzazione delle macchie dopo lo sviluppo della lastra.
- 6.1.6. Sviluppare la lastrina in una vaschetta non saturata, contenente il solvente di sviluppo 4.5 finché il fronte del solvente non abbia percorso 12 cm dalla linea di partenza (45 minuti). Asciugare la lastrina all'aria e localizzare le macchie della resorcina e del DIT, con la luce di una lampada UV a 254 nm. I due composti hanno all'incirca lo stesso valore di R_f. Delimitare le aree di ciascuna macchia, raschiare via dalla lastrina la silice corrispondente e raccoglierla separatamente in un matraccio da 10 ml.
- 6.1.7. Estrarre la silice che contiene la miscela standard ed il campione da analizzare nel modo seguente: aggiungere 2 ml di metanolo (4.2) ed estrarre per 1 ora con agitazione continua. Filtrare e ripetere l'estrazione per altri 15 minuti con 2 ml di metanolo (4.2).
- 6.1.8. Riunire gli estratti metanolici ed evaporare il solvente lasciando i suddetti estratti in un essiccatore sotto vuoto per una notte in presenza di un opportuno agente essiccante. Non riscaldare
- 6.1.9. Silicare i residui (6.1.8) come indicato in 6.1.9.1 e 6.1.9.2.
- 6.1.9.1. Aggiungere 200 µl di BSTFA (4.9.1) con una microsiringa e lasciare la miscela in un recipiente chiuso per 12 ore a temperatura ambiente.
- 6.1.9.2. Aggiungere successivamente 200 µl di HMDS (4.9.2) e 100 µl di TMCS (4.9.3) con una microsiringa e riscaldare a 60 °C per 30 minuti in un recipiente chiuso. Raffreddare successivamente.
- 6.2. Gascromatografia
- 6.2.1. Condizioni cromatografiche
- La fase stazionaria contenuta nella colonna deve dare un fattore di risoluzione R uguale o superiore a 1,5

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

in cui :

R₁ e R₂ sono i tempi di ritenzione di due picchi espressi in minuti ;

W₁ e W₂ sono le ampiezze degli stessi due picchi, misurate a metà altezza ed espresse in mm ;

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

Le seguenti condizioni operative permettono di ottenere i risultati voluti :

Materiale di costruzione della colonna : tubo di acciaio inossidabile

lunghezza : 200 cm
 diametro interno : ~3 mm
 supporto : Chromosorb WAW 100—120 mesh
 riempimento : OV-17 al 10 %

Rivelatore : ionizzazione di fiamma

Temperature :

colonna : 185 °C
 iniettore : 250 °C
 rivelatore : 250 °C

Gas di trasporto : azoto

Flusso dell'azoto : 45 ml/min.

Il flusso dell'idrogeno e dell'aria, che alimentano il rivelatore, deve essere regolato in base alle specifiche del costruttore.

- 6.2.2. Iniettare per ogni soluzione ottenuta (6.1.9) una quantità compresa tra 1 e 3 µl. Per ogni soluzione ripetere cinque iniezioni. Misurare la superficie dei picchi cromatografici che si ottengono, trovarne la media, e calcolare il rapporto S :

$$S = \frac{\text{superficie del picco della resorcina}}{\text{superficie del picco del DIT}}$$

7. CALCOLO

La concentrazione della resorcina nel campione espressa come percentuale di massa (% m/m) è data dalla seguente formula :

$$\% \text{ (m/m)} = \frac{4}{M} \times \frac{S_{\text{campione}}}{S_{\text{miscela standard}}}$$

in cui:

M è il prelievo del campione espresso in g (6.1.1),
 S_{campione} è la media dei rapporti delle aree dei picchi per la soluzione campione secondo 6.2.2,
 $S_{\text{miscela standard}}$ è la media dei rapporti delle aree dei picchi per la miscela standard secondo 6.2.2.

8. RIPETIBILITÀ ⁽¹⁾

Per un contenuto in resorcina dell'ordine dello 0,5 % (m/m), la differenza fra i risultati di due determinazioni effettuate in parallelo sullo stesso campione, non deve essere superiore allo 0,025 %.

VI. DETERMINAZIONE DEL METANOLO IN RELAZIONE ALL'ETANOLO O ALL'ISOPROPRANOLO

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Questo metodo descrive la determinazione gascromatografica del metanolo in tutti i tipi di prodotti cosmetici compresi i prodotti aerosol. Esso consente di determinare concentrazioni relative comprese tra lo 0 ed il 10 %.

2. DEFINIZIONE

Il titolo in metanolo determinato con questo metodo è espresso in percentuale di massa di metanolo rispetto alla massa di etanolo o di isopropanolo.

3. PRINCIPIO

Il dosaggio si effettua per cromatografia in fase gassosa.

⁽¹⁾ Secondo la norma ISO 5725.

4. REATTIVI
Tutti i reattivi devono essere di purezza analitica.
- 4.1. Metanolo
- 4.2. Etanolo assoluto
- 4.3. Isopropanolo
- 4.4. Cloroformio lavato con acqua per eliminare eventuali alcoli
5. APPARECCHIATURA
- 5.1. Cromatografo in fase gassosa munito di rivelatore a conducibilità termica per campioni aerosol, e di rivelatore a ionizzazione di fiamma per tutti gli altri campioni
- 5.2. Matracci tarati da 100 ml
- 5.3. Pipette da 1, 2, 20 ml
- 5.4. Microsiringhe da 0-100 µl e da 0-5 µl
Per i soli campioni aerosol, siringa speciale da gas con valvola scorrevole (figura 5 del metodo di campionamento) ⁽¹⁾
6. MODALITÀ OPERATIVE
- 6.1. Preparazione dei campioni
- 6.1.1. I prodotti in forma di aerosol sono trattati come indicato nel capitolo II della direttiva 80/1335/CEE, del 22 dicembre 1980 ⁽¹⁾, e quindi analizzati per cromatografia in fase gassosa come descritto al punto 6.2.1.
- 6.1.2. Gli altri prodotti trattati come indicato nel succitato capitolo II, sono diluiti con acqua fino ad una concentrazione compresa tra 1 e 2 % di etanolo o di isopropanolo ed analizzati per cromatografia in fase gassosa come descritto al punto 6.2.2.
- 6.2. Condizioni gascromatografiche
- 6.2.1. Per campioni sotto forma di aerosol
- 6.2.1.1. La colonna gascromatografica viene riempita con Hallcomid M 18 al 10 % supportato su Chromosorb WAW 100-120 mesh. Si usi il rivelatore a conducibilità termica
- 6.2.1.2. La fase stazionaria deve fornire una risoluzione (R) uguale o superiore a 1,5

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

in cui :

- R_1 e R_2 sono i tempi di ritenzione di due picchi espressi in minuti,
 W_1 e W_2 sono le ampiezze degli stessi picchi misurate a metà altezza ed espresse in mm,
 d' è la velocità di scorrimento della carta del registratore espressa in mm/min.

- 6.2.1.3. Le seguenti condizioni permettono di ottenere questi risultati :

Materiale di costruzione della colonna : acciaio inossidabile

lunghezza : 350 cm
 diametro : 3 mm

Rivelatore a conducibilità termica con un'intensità di corrente pari a 150 mA

⁽¹⁾ GU n. L 383 del 31. 12. 1980, pag. 27.

Gas di trascinamento : elio	
pressione di entrata dell'elio :	2,5 bar
flusso dell'elio :	45 ml/min
Temperature :	
iniettore :	150 °C
rivelatore :	150 °C
colonna :	65 °C

6.2.2. Per tutti i campioni (eccetto gli aerosol).

6.2.2.1. La colonna cromatografica si riempie con Chromosorb 105 o con Porapak QS. Si usi il rivelatore a ionizzazione di fiamma.

6.2.2.2. La fase stazionaria deve fornire una risoluzione, R, maggiore o uguale a 1,5

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

in cui :

R_1 e R_2 sono i tempi di ritenzione di due picchi espressi in minuti,

W_1 e W_2 sono le ampiezze degli stessi picchi, misurate a metà altezza, ed espresse in mm,

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

6.2.2.3. Le seguenti condizioni permettono di ottenere questi risultati :

Materiale di costruzione della colonna : acciaio inossidabile

lunghezza : 200 cm

diametro : 3 mm

Sensibilità dell'elettrometro : $8 \cdot 10^{-10}$ A

Gas di trascinamento : azoto

pressione di entrata dell'azoto : 2,1 bar

flusso dell'azoto : 20 ml/min

Per regolare il flusso di idrogeno e di aria che alimentano il rivelatore a ionizzazione di fiamma, seguire le specifiche del fabbricante

Temperature :

iniettore : 150 °C

rivelatore : 230 °C

colonna : 120 °C-130 °C

7. CURVE DI TARATURA

7.1. Nelle condizioni cromatografiche descritte al punto 6.2.1 (fase stazionaria di Hallcomid M 18), si usino le seguenti soluzioni di riferimento. Si preparino queste soluzioni volumetricamente, ma per conoscere le esatte quantità prelevate è più opportuno pesare il recipiente, nel quale si prepara la soluzione di riferimento, immediatamente dopo ogni aggiunta.

Concentrazione relativa espressa in % m/m	Metanolo ml	Etanolo o isopropanolo ml	Aggiunta di cloroformio sino ad un volume di ml
2,5 % circa	0,5	20	100
5,0 % circa	1,0	20	100
7,5 % circa	1,5	20	100
10,0 % circa	2,0	20	100

Iniettare nel gascromatografo da 2 a 3 μ l di ognuna di queste soluzioni secondo quanto descritto al punto 6.2.1. Per ogni soluzione calcolare il rapporto delle aree dei picchi metanolo/etanolo o metanolo/isopropanolo. Tracciare la curva di taratura riportando :

in ascissa : la percentuale di metanolo riferita all'etanolo o all'isopropanolo ;

in ordinata : il rapporto delle aree dei picchi ottenuti metanolo/etanolo o metanolo/isopropanolo.

- 7.2. Nelle condizioni cromatografiche descritte al punto 6.2.2 (fase stazionaria Porapak QS o Chromosorb 105), si usino le seguenti soluzioni di riferimento. Si preparino queste soluzioni volumetricamente, ma, per conoscere esattamente le quantità prelevate, è più opportuno pesare il recipiente, nel quale si prepara la soluzione di riferimento, immediatamente dopo ogni aggiunta

Concentrazione relativa espressa in % m/m	Metanolo μ l	Etanolo o isopropanolo ml	Aggiunta di acqua sino ad un volume di ml
2,5 % circa	50	2	100
5,0 % circa	100	2	100
7,5 % circa	150	2	100
10,0 % circa	200	2	100

Iniettare nel gascromatografo da 2 a 3 μ l di ognuna di queste soluzioni secondo quanto descritto al punto 6.2.2. Per ogni soluzione calcolare il rapporto delle aree dei picchi metanolo/etanolo o metanolo/isopropanolo. Tracciare la curva di taratura riportando :

in ascissa : la percentuale di metanolo riferita all'etanolo o all'isopropanolo ;

in ordinata : il rapporto delle aree dei picchi ottenuti metanolo/etanolo o metanolo/isopropanolo.

- 7.3. Nei due casi le curve di taratura dovranno essere rettilinee.

8. RIPETIBILITÀ ⁽¹⁾

Per contenuti di metanolo del 5 % riferiti all'etanolo o all'isopropanolo, la differenza fra i risultati di due determinazioni parallele effettuate sullo stesso campione non deve superare 0,25 %.

(1) Secondo la norma ISO 5725.