

COMMISSIONE

TERZA DIRETTIVA DELLA COMMISSIONE

del 27 settembre 1983

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

(83/514/CEE)

LA COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE,

visto il trattato che istituisce la Comunità economica europea,

visto 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 83/341/CEE (2), in particolare l'articolo 8, paragrafo 1,

considerando che la direttiva 76/768/CEE prevede l'escusione 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 occorre definire, al più presto, tutti i metodi di analisi necessari; che a tal fine sono già state portate a termine due tappe essendo stati definiti taluni metodi nelle direttive 80/1335/CEE (3) e 82/434/CEE (4) della Commissione; che la fissazione dei metodi di dosaggio del diclorometano e dell'1,1,1-tricloroetano, d'identificazione e di dosaggio dell'idrossi-8-chinolina e del suo solfato, di dosaggio dell'ammoniaca, d'identificazione e di dosaggio del nitrometano, dell'acido tioglicolico nei prodotti per l'arricciatura e la stiratura dei capelli e nei depilatori, nonché dell'esaclo-rofene, di dosaggio del tosylchloramidum natricum

e dei composti fluorati nei dentifrici, d'identificazione e di dosaggio dei composti mercurio-organici, di dosaggio dei solfuri alcalini e alcalino-terrosi costituisce la terza 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,

- il dosaggio del diclorometano e dell'1,1,1-tricloroetano,
- l'identificazione e il dosaggio dell'idrossi-8-chinolina e del suo solfato,
- il dosaggio dell'ammoniaca,
- l'identificazione e il dosaggio del nitrometano,
- l'identificazione e il dosaggio dell'acido tioglicolico nei prodotti per l'arricciatura e la stiratura dei capelli e nei depilatori,
- l'identificazione e il dosaggio dell'esaclo-rofene,
- il dosaggio del tosylchloramidum natricum,
- il dosaggio dei composti fluorati nei dentifrici,
- l'identificazione e il dosaggio dei composti mercurio-organici,

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

(2) GU n. L 188 del 13. 7. 1983, pag. 15.

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

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

— il dosaggio dei solfuri alcalini e alcalino-terrosi, 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 1984.

Essi ne informano immediatamente la Commissione.

Articolo 3

Gli Stati membri sono destinatari della presente direttiva.

Fatto a Bruxelles, addì 27 settembre 1983.

Per la Commissione
Frans ANDRIESEN
Membro della Commissione

ALLEGATO**DOSAGGIO DEL DICLOROMETANO E DELL'1,1,1-TRICLOROETANO****1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE**

Il metodo descritto è adatto al dosaggio di :

- diclorometano (cloruro di metilene),
- 1,1,1-tricloroetano (metilcloroformio),

e si applica a tutti i prodotti cosmetici che possano contenere questi componenti.

2. DEFINIZIONE

Il contenuto del campione in diclorometano e in 1,1,1-tricloroetano dosato con questo metodo è espresso come percentuale di massa.

3. PRINCIPIO

Il dosaggio si effettua per gascromatografia utilizzando il triclorometano come standard interno.

4. REATTIVI

Tutti i reattivi devono essere di purezza analitica.

4.1. Triclorometano (CHCl_3).

4.2. Tetracloruro di carbonio (CCl_4).

4.3. Diclorometano (CH_2Cl_2).

4.4. 1,1,1-tricloroetano (CH_3CCl_3).

4.5. Acetone.

4.6. Azoto puro.

5. ATTREZZATURA

5.1. Normale attrezzatura di laboratorio e per cromatografia in fase gassosa.

5.2. Gascromatografo munito di rivelatore a conducibilità termica.

5.3. Flacone di trasferimento da 50-100 ml (vedi metodi di campionamento 5.3) ⁽¹⁾.

5.4. Siringa da gas adatta a lavorare sotto pressione (vedi metodi di campionamento 5.4.2.2) ⁽¹⁾.

6. MODALITÀ OPERATIVE

6.1. Pesare esattamente il campione in una beuta con tappo. Introdurre una quantità esattamente pesata di triclorometano (4.1) equivalente alla quantità presunta di dicloroetano contenuta nel campione. Omogeneizzare il contenuto della beuta.

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

- 6.2. Utilizzare il metodo di prelievo descritto nei metodi di campionamento (1). Tenere tuttavia conto delle seguenti precisazioni.
- 6.2.1. Introdurre nel flacone di trasferimento (5.3) una quantità di triclorometano (standard interno) (4.1) equivalente alla quantità presunta di diclorometano e di tricloroetano contenuta nel campione. Omogeneizzare il contenuto del flacone. Lavare il volume morto della valvola nel flacone di trasferimento (5.3) con 0,5 ml di tetracloruro di carbonio (4.2) che si lascia evaporare. Determinare la massa di standard interno (4.1) aggiunto, per differenza di pesata del flacone di trasferimento (5.3).
- 6.2.2. Effettuato il riempimento della siringa con il campione, pulire con azoto (4.6) l'imboccatura della siringa per eliminare, prima dell'iniezione nel gascromatografo, ogni residuo di campione.
- 6.2.3. Dopo ogni prelievo, l'imboccatura della valvola o dell'eventuale elemento di trasferimento utilizzato deve essere lavata diverse volte con acetone (4.5) (per mezzo di una siringa ipodermica) e quindi asciugata con azoto (4.6).
- 6.2.4. Per ogni analisi, procedere alle misure su due flaconi di trasferimento diversi. Effettuare cinque misure per flacone.

7. CONDIZIONI CROMATOGRAFICHE

7.1. *Precolonna*

Materiale : acciaio inossidabile.

Lunghezza : 30 cm.

Diametro : 3 mm o 6 mm.

Riempimento : chromosorb identico a quello contenuto nella colonna analitica.

7.2. *Colonna*

La fase stazionaria è costituita da hallcomid M 18 supportato su chromosorb. Essa deve fornire una risoluzione (R) pari almeno a 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 picchi,

W_1 e W_2 : ampiezza dei picchi a metà altezza espressa in mm,

d' : velocità di scorrimento della carta del registratore espressa in mm per minuto.

- 7.3. Le condizioni operative seguenti, date come esempio, consentono di ottenere i risultati voluti :

<i>Colonna</i>	<i>I</i>	<i>II</i>
Materiale :	acciaio inossidabile	acciaio inossidabile
Lunghezza :	350 cm	400 cm
Diametro :	3 mm	6 mm
Supporto :		
chromosorb :	WAW	WAW DMCS-HP
granulometria :	100-120 mesh	60-80 mesh
Fase stazionaria :	Hallcomid M 18 10 %	Hallcomid M 18 20 %
Temperature :		
colonna :	65 °C	75 °C
iniettore :	150 °C	125 °C
rivelatore :	150 °C	200 °C
Gas di trasporto :		
elio, flusso dell'elio :	45 ml/min	60 ml/min
pressione d'ingresso dell'elio :	2,5 bar	2,0 bar
Volume iniettato :	15 µl	15 µl

8. DETERMINAZIONE DEI COEFFICIENTI DI PROPORZIONALITÀ

Preparare in un matraccio la miscela seguente esattamente pesata e tappare ermeticamente :

Diclorometano (4.3) : 30 % m/m

1,1,1-tricloroetano (4.4) : 35 % m/m

Triclorometano (4.1) : 35 % m/m

Tale miscela serve a stabilire i valori dei coefficienti di proporzionalità.

9. CALCOLI

9.1. *Calcolo del coefficiente di proporzionalità di una sostanza « p » rispetto ad una sostanza « a » scelta come standard interno*

Sia per la sostanza « p »

K_p : il suo coefficiente di proporzionalità,

m_p : la sua massa nella miscela,

A_p : l'area del suo picco;

sia per la sostanza « a »

K_a : il suo coefficiente di proporzionalità scelto uguale ad 1,

m_a : la sua massa nella miscela,

A_a : l'area del suo picco :

$$K_p = \frac{m_p \cdot A_a}{m_a \cdot A_p}$$

A titolo di esempio sono stati ottenuti i seguenti valori di coefficiente di proporzionalità assunto che per il triclorometano il coefficiente di proporzionalità sia uguale ad 1 :

Diclorometano : $K_1 = 0,78 \pm 0,03$

1,1,1-tricloroetano : $K_2 = 1,00 \pm 0,03$

9.2. *Calcolo delle percentuali (m/m) di diclorometano e 1,1,1-tricloroetano presenti nei campioni da analizzare*

Siano :

K_1 : coefficiente di proporzionalità del diclorometano,

K_2 : coefficiente di proporzionalità dell'1,1,1-tricloroetano,

m_a : massa in g di triclorometano (4.1) introdotto come standard interno,

m_c : massa in g del campione da analizzare,

A_a : area del picco del triclorometano,

A_1 : area del picco del diclorometano,

A_2 : area del picco dell'1,1,1-tricloroetano.

Le percentuali (m/m) del diclorometano e dell'1,1,1-tricloroetano si calcolano nel modo seguente :

$$\% \text{ (m/m) diclorometano} = \frac{m_a \cdot A_1 \cdot K_1 \cdot 100}{A_a \cdot m_c}$$

$$\% \text{ (m/m) 1,1,1-tricloroetano} = \frac{m_a \cdot A_2 \cdot K_2 \cdot 100}{A_a \cdot m_c}$$

10. RIPETIBILITÀ ⁽¹⁾

Per un contenuto di circa il 25 % (m/m), la differenza tra i risultati di due dosaggi paralleli effettuati sul medesimo campione non deve superare il 2,5 % in valore assoluto.

⁽¹⁾ Secondo la norma ISO 5725.

IDENTIFICAZIONE E DOSAGGIO DELL'IDROSSI-8-CHINOLINA E SUO SOLFATO**1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE**

Il presente metodo descrive l'identificazione e il dosaggio dell'idrossi-8-chinolina e del suo solfato.

2. DEFINIZIONE

Il contenuto del campione in idrossi-8-chinolina determinato secondo il presente metodo è espresso in percentuale di massa di idrossi-8-chinolina.

3. PRINCIPIO**3.1. Identificazione**

Questa viene effettuata per cromatografia su strato sottile.

3.2. Dosaggio

Questo viene effettuato per fotometria, a 410 nm, del complesso di rame ottenuto per reazione con il liquido di Fehling.

4. REATTIVI

Tutti i reattivi devono essere di purezza analitica.

4.1. Idrossi-8-chinolina**4.2. Benzene (vista la tossicità del prodotto, prendere le precauzioni adeguate).****4.3. Cloroformio.****4.4. Soluzione di idrossido di sodio al 50 % m/m.****4.5. Solfato di rame pentaidrato ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$).****4.6. Tartrato doppio di potassio e di sodio.****4.7. Acido cloridrico 1N.****4.8. Acido solforico 1N.****4.9. Soluzione di idrossido di potassio 1N.****4.10. Etanolo.****4.11. Butan-1-olo.****4.12. Acido acetico glaciale.**

- 4.13. Acido cloridrico 0,1N.
- 4.14. Celite 545 o prodotto equivalente.
- 4.15. **Soluzioni di confronto**
- 4.15.1. Pesare 100,0 mg di idrossi-8-chinolina (4.1) in un matraccio tarato da 100 ml, disciogliere in poco acido solforico 1N (4.8). Portare a volume con acido solforico 1N (4.8);
- 4.15.2. Pesare 100 mg di idrossi-8-chinolina (4.1) in un matraccio tarato da 100 ml, disciogliere in etanolo (4.10), portare a volume con lo stesso solvente e mescolare.
- 4.16. **Liquido di Fehling**
- Soluzione A**
- In un matraccio tarato da 100 ml pesare 7 g di solfato di rame (4.5). Disciogliere in una piccola quantità d'acqua, portare a volume con acqua e mescolare.
- Soluzione B**
- In un matraccio tarato da 100 ml pesare 35 g di tartrato di potassio e di sodio (4.6) e disciogliere in 50 ml d'acqua. Aggiungere 20 ml di sodio idrossido al 50 % (4.4), portare a volume con acqua e mescolare.
- Immediatamente prima dell'uso, pipettare 10 ml di soluzione A e 10 ml di soluzione B in un matraccio tarato da 100 ml. Portare a volume con acqua e mescolare.
- 4.17. **Solventi di sviluppo**
- Solvente I = Butan-1-olo : acido acetico : acqua (80 : 20 : 20; v/v/v).
- Solvente II = Cloroformio : acido acetico (95 : 5; v/v).
- 4.18. Soluzione all'1 % (m/v) di 2,6-dicloro-4-(cloroimino)cicloesa-2,5-dienone in etanolo (4.10).
- 4.19. Soluzione di sodio carbonato all'1 % (m/v).
- 4.20. Soluzione al 30 % (v/v) di etanolo (4.10) in acqua.
- 4.21. Soluzione di diidrogenoetilendiamminatetraacetato di disodio al 5 % (m/v).
- 4.22. **Soluzione tampone a pH 7**
- Pesare 27 g di KH_2PO_4 e 70 g di $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ in un matraccio tarato da 1 000 ml. Disciogliere, portare a volume e mescolare.
- 4.23. **Lastre di gel di silice pronte per l'uso**
- Spessore dello strato 0,25 mm (Kieselgel 60 Merck o equivalente). Prima dell'uso ogni piastra deve essere vaporizzata con 10 ml del reattivo 4:21 e essiccata a 80 °C.
5. **APPARECCHIATURA**
- 5.1. Matraci a fondo rotondo e collo smerigliato da 100 ml.
- 5.2. Matraci tarati.
- 5.3. Pipette graduate da 10 e da 5 ml.

- 5.4. Pipette da 20, 15, 10 e 5 ml.
 - 5.5. Imbuti separatori da 100, 50 e 25 ml.
 - 5.6. Filtri a pieghe di 9 cm di diametro.
 - 5.7. Evaporatore rotante.
 - 5.8. Refrigerante a ricadere con giunto smerigliato.
 - 5.9. Spettrofotometro.
 - 5.10. Vaschette da spettrofotometria da 1 cm di percorso ottico.
 - 5.11. Agitatore con riscaldamento elettrico.
 - 5.12. Colonne di vetro per cromatografia di 160 mm di altezza e 8 mm di diametro, la parte inferiore delle quali sia provvista di una strozzatura otturata con un tampone di lana di vetro e la parte superiore delle quali sia strutturata in modo da poter effettuare l'eluizione sotto pressione.
6. MODO DI OPERARE
- 6.1. *Identificazione*
 - 6.1.1. *Campioni liquidi*
 - 6.1.1.1. Portare a 7 il pH di una parte del campione da analizzare ed applicarne varie aliquote da 5 e 10 µl su altrettanti punti della linea partenza di una piastra al gel di silice precedentemente trattata come indicato in 4.23.
 - 6.1.1.2. Applicare 10 e 30 µl della soluzione di confronto (4.15.2) su altri due punti della linea di partenza e sviluppare la piastra in uno dei due solventi di sviluppo (4.17).
 - 6.1.1.3. Quando il fronte degli eluenti ha raggiunto 15 cm, portare la piastra a secco a 110 °C (15 minuti). In luce UV (366 nm), le macchie di 8-idrossichinolina sono caratterizzate da una fluorescenza gialla.
 - 6.1.1.4. Vaporizzare la piastra con una soluzione acquosa di carbonato di sodio all'1 % (4.19); essiccare e vaporizzare nuovamente con una soluzione di 2,6-dicloro-4-(cloroimmino)cicloesa-2,5-dienone. L'idrossi-8-chinolina è rivelata da una macchia azzurra.
 - 6.1.2. *Campioni solidi e creme*
 - 6.1.2.1. Sospendere 1 g del campione in 5 ml della soluzione tampone a pH 7 (4.22), trasferirlo quindi con 10 ml di cloroformio (4.3) in un imbuto separatore e agitare. Dopo aver raccolto lo strato di cloroformio, estrarre a due riprese la sospensione acquosa con 10 ml di cloroformio (4.3) per volta. Raccogliere e filtrare gli estratti cloroformici e concentrarli fin quasi a secco in un matraccio a fondo rotondo da 100 ml (5.1) con un evaporatore rotante. Riprendere il residuo in 2 ml di cloroformio ed applicare 10 e 30 µl della soluzione ottenuta su una piastra di gel di silice (4.23), procedendo come indicato al punto 6.1.1.1.
 - 6.1.2.2. Dopo aver applicato 10 e 30 µl di soluzione di confronto (4.15.2), trattare la piastra come indicato ai punti 6.1.1.2, 6.1.1.3 e 6.1.1.4.
 - 6.2. *Dosaggio*
 - 6.2.1. *Campioni liquidi*
 - 6.2.1.1. In un matraccio smerigliato a fondo rotondo da 100 ml pesare 5 g del campione. Pipettare 1 ml di acido solforico 1N (4.8). Concentrare la miscela a pressione ridotta (50 °C) fino a portarla quasi a secco.

- 6.2.1.2 Disciogliere il residuo in 20 ml di acqua calda; trasferire in un matraccio tarato da 100 ml, lavare a tre riprese con 20 ml di acqua per volta, portare a 100 ml con acqua e mescolare.
- 6.2.1.3 Pipettare 5 ml di questa soluzione in un imbuto separatore da 50 ml (5.5). Aggiungere 10 ml di liquido di Fehling (4.16) ed estrarre in tre riprese ogni volta con 8 ml di cloroformio (4.3) il complesso di rame formatosi.
- 6.2.1.4 Raccogliere le fasi cloroformiche filtrate in un matraccio tarato da 25 ml (5.2). Portare a volume con cloroformio (4.3) e agitare; misurare la densità ottica della soluzione gialla a 410 nm rispetto al cloroformio.
- 6.2.2. *Campioni solidi e creme*
- 6.2.2.1. In un matraccio a fondo rotondo da 100 ml (5.1) pesare 0,500 g del campione, aggiungere 30 ml di benzene (4.2) e 20 ml di acido cloridrico 1N (4.7) e far bollire a ricadere il contenuto del matraccio per 30 minuti, agitando.
- 6.2.2.2. Trasferire il contenuto del matraccio in un imbuto separatore da 100 ml (5.5) e lavare con 5 ml di acido cloridrico 1N (4.7). Trasferire la fase acquosa in un matraccio a fondo rotondo (5.1), lavare la fase benzenica con 5 ml di acido cloridrico 1N (4.7) e raccogliere le acque di lavaggio nel pallone a fondo tondo. Proseguire come indicato al punto 6.2.2.4.
- 6.2.2.3. Qualora la presenza di emulsioni ostacoli il proseguimento dell'analisi, l'idrossi-8-chinolina verrà isolata come segue: mescolare 0,500 g del campione con 2 g di celite 545 (4.14), in modo da ottenere una polvere scorrevole. Trasferire la miscela suddivisa in piccole frazioni nella colonna di vetro da cromatografia (5.12).
Ad ogni nuova aggiunta compattare il contenuto della colonna. Dopo aver trasferito nella colonna tutta la miscela campione/celite, eluirla con l'acido cloridrico 0,1N (4.13), in modo da ottenere 10 ml di eluato in 10 minuti circa; se necessario si può procedere a questa eluizione esercitando una leggera sovrappressione con azoto. Durante l'eluizione bisogna accertarsi che la miscela contenuta nella colonna sia sempre coperta dall'acido cloridrico. Trattare i primi 10 ml di eluato come indicato al punto 6.2.2.4.
- 6.2.2.4. Concentrare tutte le fasi acquose (6.2.2.2 o 6.2.2.3) con l'evaporatore rotante a pressione ridotta fino a portarle quasi a secco.
- 6.2.2.5. Disciogliere il residuo in 6 ml di soluzione di sodio idrossido 1N (4.9), aggiungere 20 ml di liquido di Fehling (4.16) e trasferire il contenuto del matraccio in un imbuto separatore da 50 ml (5.5). Lavare il matraccio con 8 ml di cloroformio (4.3) e travasare nell'imbuto separatore. Agitare, filtrare la fase cloroformica e raccoglierla in un matraccio tarato da 50 ml (5.2).
- 6.2.2.6. Ripetere tre volte tale estrazione, utilizzando ogni volta 8 ml di cloroformio (4.3), filtrare le fasi cloroformiche e raccoglierle nel matraccio tarato da 50 ml. Portare a volume con cloroformio e agitare; la densità ottica della soluzione gialla viene misurata a 410 nm rispetto al cloroformio.

7. CURVA DI TARATURA

In matracci a fondo rotondo da 100 ml (5.1), contenenti ciascuno 3 ml di soluzione acquosa di alcole etilico al 30 % (4.20), pipettare rispettivamente 5, 10, 15 e 20 ml della soluzione di confronto (4.15.1) e procedere come indicato al punto 6.2.1.

8. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

8.1. *Campioni liquidi*

$$\text{Idrossi-8-chinolina in \% (m/m)} = \frac{a}{m} \times 100$$

dove :

a : mg di idrossi-8-chinolina rilevati sulla curva di taratura (7),
m (mg) : massa del campione (6.2.1.1).

8.2. *Campioni solidi o creme*

$$\text{Idrossi-8-chinolina in \% (m/m)} = \frac{2a}{m} \times 100$$

dove :

a : mg di idrossi-8-chinolina rilevati sulla curva di taratura (7),
m (mg) : massa del campione (6.2.2.1).

9. RIPETIBILITÀ (1)

Per un tenore dell'ordine dello 0,3 % di idrossi-8-chinolina le differenze tra i risultati di due dosaggi paralleli effettuati sullo stesso campione non deve superare 0,02 %.

DOSAGGIO DELL'AMMONIACA

1. SCOPO E APPLICAZIONE

Il metodo descrive il dosaggio dell'ammoniaca libera nei prodotti cosmetici.

2. DEFINIZIONE

Il contenuto di ammoniaca nei campioni, determinato con il presente metodo, è espresso in percentuale in massa di NH₃.

3. PRINCIPIO

Si aggiunge una soluzione di cloruro di bario al prodotto cosmetico in ambiente metanolo-acqua. Questo modo di operare evita il trascinarsi, durante la distillazione in corrente di vapore, di taluni sali di ammonio, quali carbonato, idrogenocarbonato, sali di acidi grassi, ecc., ad eccezione dell'acetato di ammonio.

L'ammoniaca è distillata in corrente di vapore dal filtrato o dal liquido surnatante e dosata per titrimetria indiretta con indicatore o titrimetria diretta per potenziometria.

4. REATTIVI

Tutti i reattivi devono essere di purezza analitica.

4.1. Metanolo.

4.2. Soluzione di cloruro di bario biidrato al 25 % (m/v).

4.3. Soluzione di acido ortoborico al 4 % (m/v).

4.4. Soluzione titolata di acido solforico 0,5N.

4.5. Antischiuma liquido.

4.6. Soluzione titolata di sodio idrossido 0,5N.

4.7. Indicatore: mescolare 5 ml di una soluzione etanolica di rosso metile allo 0,1 % con 2 ml di una soluzione acquosa di blu di metilene allo 0,1 %.

(1) Secondo la norma ISO 5725.

5. APPARECCHIATURA

- 5.1. Apparecchiatura corrente di laboratorio.
- 5.2. Centrifuga e provette da centrifuga con chiusura.
- 5.3. Apparecchio per la distillazione in corrente di vapore.
- 5.4. Potenziografo.
- 5.5. Elettrodo in vetro ed elettrodo di riferimento al dicloruro di dimercurio (calomelano).

6. MODO DI OPERARE

- 6.1. In un pallone tarato da 100 ml, pesare con l'approssimazione di 1 mg una massa (m) del campione corrispondente al massimo a 150 mg di NH₃.
- 6.2. Aggiungere :
10 ml H₂O,
10 ml metanolo (4.1),
10 ml soluzione BaCl₂ (4.2).
Portare a 100 ml con metanolo (4.1).
- 6.3. Omogeneizzare e lasciare per una notte in frigorifero (5 °C).
- 6.4. La soluzione ancora fredda è filtrata o centrifugata in provetta chiusa per 10 minuti in maniera da ottenere un surnatante limpido.
- 6.5. Pipettare 40 ml della soluzione limpida nell'apparecchio (5.3), aggiungere, eventualmente, 0,5 ml di antischiuma (4.5).
- 6.6. Distillare e raccogliere 200 ml di distillato in becher da 250 ml, già contenente 100 ml di H₂SO₄ 0,5N (4.4) e 0,1 ml dell'indicatore (4.7).
- 6.7. Titolare l'acido solforico in eccesso con la soluzione di sodio idrossido 0,5N (4.6).
- 6.8. Nel caso di dosaggio potenziometrico, raccogliere 200 ml di distillato in un becher da 250 ml contenente 25 ml della soluzione di acido ortoborico (4.3) e titolare con acido solforico 0,5N (4.4).

7. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

7.1. *Calcolo nel caso della titolazione di ritorno in presenza di indicatore*

Siano :

V₁ (ml) : il volume della soluzione di NaOH 0,5N (4.6) impiegato,

T₁ : il titolo della soluzione di NaOH 0,5N (4.6),

T₂ : il titolo della soluzione di H₂SO₄ 0,5N (4.4),

m (mg) : la massa del campione (6.1) :

$$\text{NH}_3 \text{ \% (m/m)} = \frac{(10 T_2 - V_1 T_1) \times 17 \times 100}{0,4 m} = \frac{(10 T_2 - V_1 T_1) \times 4250}{m}$$

7.2. Calcolo nel caso di dosaggio potenziometrico diretto

Siano :

V_2 (ml) : il volume delle soluzioni di H_2SO_4 0,5N (4.4) impiegato,

T_2 : il titolo delle soluzioni di H_2SO_4 0,5N (4.4),

m (mg) : la massa del campione (6.1).

$$NH_3 \% (m/m) = \frac{V_2 \times T_2 \times 17 \times 100}{0,4 m} = \frac{V_2 \times T_2 \times 4250}{m}$$

8. RIPETIBILITÀ (1)

Per un contenuto dell'ordine del 6 % di NH_3 la differenza fra i risultati di due dosaggi paralleli effettuati su uno stesso campione non deve superare lo 0,6 %.

IDENTIFICAZIONE E DOSAGGIO DEL NITROMETANO**1. SCOPO E CAMPO D'APPLICAZIONE**

Il metodo si presta all'identificazione ed al dosaggio del nitrometano fino alla concentrazione dello 0,3 % circa nei prodotti cosmetici, distribuiti in aerosol.

2. DEFINIZIONE

Il titolo del nitrometano nel campione, determinato secondo questo metodo, rappresenta la percentuale in massa nel nitrometano rispetto al contenuto totale dell'aerosol.

3. PRINCIPIO

Il nitrometano è identificato colorimetricamente. Il suo dosaggio è realizzato per cromatografia in fase gassosa dopo aggiunta di uno standard interno.

4. IDENTIFICAZIONE**4.1. Reattivi**

Tutti i reattivi devono essere di purezza analitica.

4.1.1. Soluzione di idrossido di sodio 0,5N.**4.1.2. Reattivo di Folin**

Sciogliere in acqua 0,1 g del sale sodico dell'acido 1,2-naftochinon-4-solfonico e diluire a 100 ml.

4.2. Modo di operare

Ad 1 ml del campione aggiungere 10 ml del reattivo 4.1.1 ed 1 ml del reattivo 4.1.2. Una colorazione violetta indica la presenza di nitrometano.

5. DOSAGGIO**5.1. Reattivi**

Tutti i reattivi devono essere di purezza analitica.

(1) Secondo la norma ISO 5725.

- 5.1.1. Cloroformio (standard interno 1).
- 5.1.2. 2,4-Dimetileptano (standard interno 2).
- 5.1.3. Etanolo al 95 %.
- 5.1.4. Nitrometano.
- 5.1.5. *Soluzione di riferimento del cloroformio*
Introdurre 650 mg circa di cloroformio (5.1.1) in un pallone tarato da 25 ml, previamente pesato. Ripesare accuratamente il pallone ed il suo contenuto. Portare a 25 ml con etanolo a 95 % (5.1.3). Pesare di nuovo e calcolare la percentuale in massa del cloroformio contenuto in questa soluzione.
- 5.1.6. *Soluzione di riferimento del dimetileptano*
Va preparato in modo analogo alla soluzione di riferimento del cloroformio. La quantità di 2,4-dimetileptano (5.1.2) da pesare nel pallone tarato da 25 ml è in questo caso di 270 mg circa.
- 5.2. *Apparecchiature*
- 5.2.1. Gascromatografo con rivelatore a ionizzazione di fiamma.
- 5.2.2. Apparecchio per il campionamento di aerosol (bottiglia di trasferimento, microsiringa, raccordi, ecc.), come indicato nel capitolo II dell'allegato della direttiva 80/1355/CEE, del 22 dicembre 1980 (1).
- 5.2.3. Usuale vetreria di laboratorio.
- 5.3. *Modo di operare*
- 5.3.1. *Preparazione del campione*
In una bottiglia di trasferimento da 100 ml, precedentemente tarata, dalla quale sia stata scacciata l'aria secondo il procedimento descritto al paragrafo 5.4 del capitolo II dell'allegato della direttiva 80/1335/CEE, del 22 dicembre 1980, o nella quale sia stato fatto il vuoto, introdurre 5 ml circa di una delle soluzioni degli standard interni (5.1.5 o 5.1.6). Impiegare una siringa di vetro da 10 o 20 ml senza ago, adattata al pezzo di trasferimento secondo la tecnica descritta al paragrafo 5, capitolo II, della direttiva 80/1335/CEE. Pesare di nuovo per determinare la quantità introdotta. Con la stessa tecnica trasferire in questa bottiglia 50 g circa del contenuto del campione di aerosol. Pesare nuovamente per determinare la quantità di campione trasferito e mescolare con cura. Iniettare 10 µl circa impiegando la microsiringa (5.2.2). Effettuare 5 iniezioni.
- 5.3.2. *Preparazione dello standard*
In un pallone tarato da 50 ml, pesare con esattezza 500 mg circa di nitrometano (5.1.4) con 500 mg di cloroformio (5.1.1) oppure 210 mg di 2,4-dimetileptano (5.1.2). Portare a volume con etanolo al 95 % (5.1.3). Mescolare con cura. Porre 5 ml di questa soluzione in un pallone tarato da 20 ml. Portare a volume con etanolo al 95 % (5.1.3). Iniettare 10 µl circa, impiegando la microsiringa (5.2.2). Effettuare 5 iniezioni.
- 5.3.3. *Condizioni della gascromatografia*
- 5.3.3.1. *Colonna*
La colonna è costituita di due parti : la prima contiene dideciltalato su Gas Chrom Q come fase stazionaria, la seconda contiene Ucon 50 HB 280X su Gas Chrom Q come fase stazionaria. Il potere risolutivo R della colonna doppia così preparata deve essere uguale o superiore a 1,5. Esso è dato dall'espressione :

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

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

dove :

r_1 e r_2 sono i tempi di ritenzione, in minuti,

W_1 e W_2 sono le ampiezze dei picchi a metà altezza, in mm,

d' è la velocità della carta, in mm/minuto.

A titolo di esempio, le due colonne seguenti danno il potere risolutivo richiesto.

Colonna A :

Materiale : acciaio inossidabile.

Lunghezza : 1,5 m.

Diametro : 3 mm.

Riempimento : 20 % di didecitalato su Gas Chrom Q, granulometria 100-120 mesh.

Colonna B :

Materiale : acciaio inossidabile.

Lunghezza : 1,5 m.

Diametro : 3 mm.

Riempimento : 20 % Ucon 50 HB 280X su Gas Chrom Q, granulometria 100-120 mesh.

5.3.3.2. Rivelatore

Un'adatta regolazione della sensibilità per l'elettrometro del rivelatore a ionizzazione di fiamma è 8×10^{-10} A.

5.3.3.3. Condizioni di temperatura

Sono stati trovati soddisfacenti i seguenti valori :

Iniettore : 150 °C.

Rivelatore : 150 °C

Colonne : fra 50 e 80 °C, secondo i vari apparecchi.

5.3.3.4. Condizioni relative ai gas

Gas vettore : azoto.

Pressione : 2,1 bar.

Flusso : 40 ml/min.

Alimentazione del rivelatore : secondo le indicazioni del fabbricante.

6. CALCOLI

6.1. *Fattori di risposta del nitrometano, calcolati con riferimento allo standard interno impiegato*

Si indichi con « n » il nitrometano, e siano :

k_n : il relativo fattore di risposta,

m'_n : la relativa massa nella miscela, in g,

s'_n : l'area del relativo picco;

si indichi con « c » lo standard interno (cloroformio o 2,4-dimetileptano), e siano :

m'_c : la relativa massa nella miscela, in grammi,

s'_c : l'area del relativo picco,

si avrà :

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

(k_n è una funzione dell'apparecchio).

6.2. *Concentrazione del nitrometano nel campione*

Si indichi con « n » il nitrometano, e siano :

k_n : il relativo fattore di risposta,

s_n : l'area del relativo picco;

si indichi con « c » lo standard interno (cloroformio o 2, 4-dimetileptano), e siano :

m_c : la relativa massa nella miscela, in g,

s_c : l'area del relativo picco,

M : la massa in g dell'aerosol trasferito.

La percentuale (m/m) di nitrometano nel campione sarà :

$$\frac{m_c}{M} \times \frac{k_n \times s_n}{s_c} \times 100$$

7. RIPETIBILITÀ (1)

Per un contenuto di nitrometano dello 0,3 % (m/m) circa, la differenza fra i risultati di due determinazioni parallele, effettuate sullo stesso campione, non deve superare lo 0,03 %.

IDENTIFICAZIONE E DOSAGGIO DELL'ACIDO TIOGLICOLICO NEI PRODOTTI PER L'ARRICCIATURA E LA STIRATURA DEI CAPELLI E NEI DEPILATORI

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Questo metodo descrive l'identificazione e la determinazione dell'acido tioglicolico nei prodotti per l'arricciatura e la stiratura dei capelli e nei depilatori, in presenza di altre eventuali sostanze riducenti.

2. DEFINIZIONE

Il tenore del campione in acido tioglicolico, determinato secondo questo metodo, è espresso in percentuale di massa di acido tioglicolico.

3. PRINCIPIO

L'acido tioglicolico viene identificato sia per reazione cromatica che per cromatografia su strato sottile. Il dosaggio viene effettuato sia per iodometria che per gascromatografia.

4. IDENTIFICAZIONE

4.1. *Identificazione per via chimica*

4.1.1. *Reattivi*

Tutti i reattivi devono essere di purezza analitica.

4.1.1.1. Cartina reattiva al di(acetato) di piombo.

4.1.1.2. Acido cloridrico diluito 1:1.

4.1.2. *Procedimento*

4.1.2.1. Identificazione dell'acido tioglicolico per reazione cromatica con la cartina al di(acetato) di piombo

Deporre una goccia del campione in esame su una cartina reattiva al di(acetato) di piombo. Una colorazione gialla intensa denota la probabile presenza di acido tioglicolico.

Sensibilità : 0,5 %.

4.1.2.2. Caratterizzazione dei solfuri per formazione di H₂S

Introdurre in un tubo da saggio qualche mg del campione in esame. Aggiungere 2 ml di acqua deionizzata ed 1 ml di acido cloridrico diluito 1:1 (4.1.1.2). Si

(1) Secondo la norma ISO 5725.

sviluppa H₂S, riconoscibile dall'odore caratteristico e dalla formazione di un precipitato nero di PbS su una cartina reattiva al di(acetato) di piombo (4.1.1.1).

Sensibilità : 50 ppm.

4.1.2.3. Caratterizzazione dei solfiti per formazione di SO₂

Procedere come al punto 4.1.2.2. Portare ad ebollizione. L'SO₂ si riconosce dall'odore e dalle proprietà riducenti, ad esempio nei confronti di MnO₄⁻.

4.2. *Identificazione per cromatografia su strato sottile*

4.2.1. *Reattivi*

Tutti i reattivi devono essere di purezza analitica.

4.2.1.1. Acido tioglicolico controllato per via iodometrica : purezza ≥ 98 % (ATG).

4.2.1.2. Acido ditiodiglicolico : purezza ≥ 99 % (ADTG).

4.2.1.3. Acido tiolattico : purezza ≥ 95 % (ATL).

4.2.1.4. Acido 3-mercaptopropionico : purezza ≥ 98 % (AMP).

4.2.1.5. 1-Tioglicerolo : purezza ≥ 98 % (TG).

4.2.1.6. Gel di silice G-HR o lastrina equivalente, pronta per l'impiego, con spessore dello strato di 0,25 mm, attivata a 110 °C circa per circa 30 minuti.

4.2.1.7. Ossido di alluminio F 254 tipo E Merck o equivalente o lastrina equivalente pronta per l'impiego, con spessore dello strato di 0,25 mm, attivata a 110 °C per circa 30 minuti.

4.2.1.8. Acido cloridrico concentrato (d₄²⁰ = 1,19).

4.2.1.9. Acetato di etile.

4.2.1.10. Cloroformio.

4.2.1.11. Etere diisopropilico

4.2.1.12. Tetracloruro di carbonio.

4.2.1.13. Acido acetico glaciale.

4.2.1.14. Soluzione acquosa di ioduro di potassio all'1 % (m/v).

4.2.1.15. Soluzione acquosa di cloruro di platino allo 0,1 % (m/v).

4.2.1.16. Solventi per lo sviluppo

4.2.1.16.1. Acetato di etile, cloroformio, etere diisopropilico-acido acetico concentrato (20:20:10:10) (in volume).

4.2.1.16.2. Cloroformio, acido acetico glaciale (90:20) (in volume).

4.2.1.17. Reattivi di rivelazione

4.2.1.17.1. Immediatamente prima dell'impiego, mescolare volumi uguali della soluzione 4.2.1.14 e della soluzione 4.2.1.15.

4.2.1.17.2. Soluzione di bromo al 5 % (m/v):

Sciogliere 5 g di bromo in 100 ml di tetracloruro di carbonio (4.2.1.12).

4.2.1.17.3. Soluzione di fluorescina 0,1 % (m/v):

Sciogliere 100 mg di fluorescina in 10 ml di etanolo al 95 %.

4.2.1.17.4. Soluzione acquosa al 10 % (m/v) di eptamolibdato di esaammonio.

4.2.1.18. Soluzioni di riferimento

4.2.1.18.1. Soluzione acquosa di acido tioglicolico allo 0,4 % (m/v).

4.2.1.18.2. Soluzione acquosa di acido ditiodiglicolico allo 0,4 % (m/v).

4.2.1.18.4. Soluzione acquosa acido 3-mercaptopropionico allo 0,4 % (m/v).

4.2.1.18.5. Soluzione acquosa di 1-tioglicerolo allo 0,4 % (m/v).

4.2.2. *Apparecchiatura*

Materiale corrente di laboratorio per cromatografia su strato sottile.

4.2.3. *Procedimento*4.2.3.1. *Trattamento dei campioni*

Con qualche goccia di acido cloridrico (4.2.1.8) acidificare fino a pH1 e filtrare (se necessario). In taluni casi, può essere necessario diluire il campione: in questo caso acidificarlo con acido cloridrico (4.2.1.8) prima di effettuare la diluizione.

4.2.3.2. *Sviluppo*

Depositare sulla lastrina 1 µl della soluzione campione 4.2.3.1 e 1 µl di ciascuna delle cinque soluzioni di riferimento (4.2.1.18). Asciugare con cautela le deposizioni con una corrente di azoto e sviluppare la lastrina con i solventi di sviluppo 4.2.1.16.1 o 4.2.1.16.2. Essiccare quindi la lastrina il più rapidamente possibile in corrente di azoto in modo da evitare l'ossidazione dei tioli.

4.2.3.3. *Rivelazione*

Spruzzare la lastrina con il reattivo 4.2.1.17.1 o 4.2.1.17.3 o 4.2.1.17.4. Se la lastrina è stata spruzzata con il reattivo 4.2.1.17.3, porla in una vaschetta di sviluppo saturata con vapori di bromo (4.2.1.17.2) finché le macchie non siano visibili. La rivelazione con il reattivo 4.2.1.17.4 è valida soltanto se il tempo di essiccazione della lastrina non ha superato mezz'ora.

4.2.3.4. *Lettura*

Confrontare i valori degli Rf e il colore delle soluzioni di riferimento con quelli della soluzione campione. Gli Rf medi su strato di gel silice riportati qui di seguito sono dati a titolo indicativo ed hanno soltanto un valore comparativo. In pratica essi dipendono:

- dall'attivazione dello strato al momento della cromatografia,
- dalla temperatura della vaschetta cromatografica.

Tabella degli Rf ottenuti su strato di silice

	Solventi di sviluppo	
	4.2.1.16.1	4.2.1.16.2
Acido tioglicolico	0,25	0,80
Acido tiolattico	0,40	0,95
Acido ditiodiglicolico	0,00	0,35
Acido 3-mercaptopropionico	0,45	0,95
1-tioglicerolo	0,45	0,35

5. *DOSAGGIO (*)*

Il primo dosaggio da effettuare è quello iodometrico.

5.1. *Iodometria*5.1.1. *Principio*

Il dosaggio si effettua ossidando il gruppo SH con I₂ in ambiente acido. L'equazione di reazione è la seguente:

5.1.2. *Reattivi*

Soluzione titolata di iodio 0,1 N.

(*) NB: Il dosaggio dell'acido tioglicolico deve essere effettuato su prodotti non ancora utilizzati, prelevati da contenitori aperti di recente, in modo da evitare qualsiasi ossidazione.

5.1.3. Materiale

Materiale comune di laboratorio.

5.1.4. Procedimento

In una beuta tappata da 150 ml, contenente 50 ml di acqua distillata, pesare esattamente una quantità compresa tra 0,500-1,000 g del campione. Aggiungere 5 ml di HCl 1:1 (4.1.1.2) (pH della soluzione 0) e titolare con la soluzione di iodio 0,1 N (5.1.2) fino a colorazione gialla. Si può usare un indicatore (saldia d'amido, cloroformio).

5.1.5. Calcolo

Il tenore in acido tioglicolico è calcolato secondo la formula :

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

dove :

m è la massa in g dell'aliquota prelevata;

n è il volume in ml di soluzione di iodio 0,1 N (5.1.2) consumato.

5.1.6. Osservazioni

Se il risultato, calcolato in acido tioglicolico, è inferiore dello 0,1 % alle concentrazioni massime autorizzate non occorre procedere ad altri saggi. Se il risultato è uguale o superiore alle concentrazioni massime autorizzate e se l'identificazione ha evidenziato la presenza di altre sostanze riducenti, è invece necessario procedere al dosaggio per gascromatografia.

5.2. Gascromatografia**5.2.1. Principio**

L'acido tioglicolico viene separato dall'eccipiente per precipitazione sotto forma di di(acetato) di cadmio.

L'acido tioglicolico viene metilato con diazometano, che può essere preparato estemporaneamente, o essere già pronto in soluzione eterea. Il derivato metilato che si ottiene viene dosato per gascromatografia impiegando caprilato di metile come standard interno.

5.2.2. Reattivi

Tutti i reattivi debbono essere di purezza analitica.

5.2.2.1. Acido tioglicolico di titolo noto.

5.2.2.2. Acido cloridrico concentrato $d_4^{20} = 1,19$.

5.2.2.3. Metanolo.

5.2.2.4. Soluzione acquosa di di(acetato) di cadmio biidrato al 10 % (m/v).

5.2.2.5. Soluzione metanolica di caprilato di metile al 2 % (m/v).

5.2.2.6. Soluzione tampone acetica pH 5 :

acetato di sodio triidrato : 77 g,

acido acetico glaciale : 27,5 ml,

acqua demineralizzata q.b.a. : 1 l.

5.2.2.7. Soluzione metanolica 3 N di acido cloridrico preparata di recente.

5.2.2.8. N-metil-N nitroso-N'-nitroguanidina.

5.2.2.9. Soluzione di idrossido di sodio 5 N.

5.2.2.10. Soluzione titolata di iodio 0,1 N.

- 5.2.2.11. Etere etilico.
- 5.2.2.12. Soluzione di diazometano preparata a partire dalla N-metil-N-nitroso-p. toluensolfanammide secondo Fieser (Reagents for organic synthesis, Ed. Wiley 1967)
- La soluzione contiene 1,5 g circa di diazometano in 100 ml di etere etilico (5.2.2.11). Il diazometano è un gas tossico e molto instabile; pertanto, è necessario effettuare tutti gli esperimenti sotto una cappa potente ed evitare l'impiego di apparecchi con giunti smerigliati.
- 5.2.3. *Materiale*
- 5.2.3.1. Materiale corrente di laboratorio.
- 5.2.3.2. Apparecchio per la preparazione estemporanea del diazometano (An. Chem. 45, 1973, 2302).
- 5.2.3.3. Apparecchio per la preparazione preliminare del diazometano secondo Fieser.
- 5.2.4. *Preparazione del campione*
- In un tubo da centrifuga da 50 ml, pesare con precisione una massa di campione tale che la quantità presunta di acido tioglicolico sia dell'ordine di 50-70 mg. Con qualche goccia di acido cloridrico concentrato (5.2.2.2), portare a pH 3 circa.
- Aggiungere : 5 ml di acqua demineralizzata,
10 ml di soluzione tampone acetica (5.2.2.6).
- Verificare con cartine indicatrici che il pH sia prossimo a 5. Poi aggiungere 5 ml di soluzione di di(acetato) di cadmio (5.2.2.4).
- Attendere 10 minuti e centrifugare per almeno 15 minuti a 4 000 g. Separare il surnatante. Quest'ultimo può contenere una sostanza insolubile grassa (caso di una crema), la quale peraltro non può essere confusa con il mercapturo di cadmio, riunito in modo compatto sul fondo del tubo.
- Verificare se la precipitazione è completa aggiungendo nel surnatante qualche goccia di soluzione di acetato di cadmio (5.2.2.4). Qualora le precedenti identificazioni abbiano dimostrato l'assenza di sostanze riducenti diverse dai tioli verificare per via iodometrica che la presenza di tioli nel surnatante non superi il 6-8 % della quantità iniziale.
- Nel tubo da centrifuga contenente il precipitato, introdurre 10 ml di metanolo (5.2.2.3), disperdere finemente il precipitato mediante una bacchetta e centrifugare di nuovo per almeno 15 minuti a 4 000 g. Decantare il surnatante e verificare per via iodometrica l'assenza di tioli.
- Effettuare un secondo lavaggio nelle stesse condizioni.
- Sempre nel tubo da centrifuga, aggiungere :
- 2 ml di soluzione di caprilato di metile (5.2.2.5),
 - 5 ml di soluzione di HCL in metanolo (5.2.2.7).
- Sciogliere completamente il mercapturo (può eventualmente sussistere una leggera quantità di sostanza insolubile proveniente dall'eccipiente).
- Si ottiene la soluzione S.
- Su una aliquota di tale soluzione verificare iodometricamente il contenuto in tioli; esso deve risultare uguale almeno al 90 % di quello ottenuto in precedenza (5.1).
- 5.2.5. *Metilazione*
- La metilazione viene effettuata sia estemporaneamente secondo il metodo descritto nel punto 5.2.5.1, sia con una soluzione di diazometano precedentemente preparata (5.2.5.2).
- 5.2.5.1. *Metilazione estemporanea*
- Nell'apparecchio (5.2.3.2) contenente 1 ml di etere etilico (5.2.2.11) introdurre 50 µl della soluzione S. Metilare secondo il metodo (5.2.3.2) con 300 mg circa di

- N-metil-N-nitroso-N'-nitroguandina (5.2.2.8). Dopo 15 minuti verificare che la soluzione eterea contenga un eccesso di diazometano (soluzione gialla) e travasare in un palloncino da 2 ml, chiuderlo ermeticamente e porlo in frigorifero per una notte. Effettuare contemporaneamente 2 metilazioni.
- 5.2.5.2. **Metilazione con la soluzione di diazometano preparata in precedenza**
- In un pallone tappato da 5 ml, introdurre 1 ml di diazometano (5.2.2.12), poi 50 µl della soluzione S. Lasciare in frigorifero per una notte.
- 5.2.6. **Preparazione dello standard**
- Preparare una soluzione standard di acido tioglicolico di titolo noto contenente circa 60 mg di acido tioglicolico in un volume di 2 ml.
- Si ottiene la soluzione E.
- Procedere alla precipitazione, ai dosaggi ed alla metilazione come indicato ai punti 5.2.4 e 5.2.5.
- 5.2.7. **Condizioni della gascromatografia**
- 5.2.7.1. **Colonna**
- Materiale : acciaio inossidabile.
Lunghezza : 2 m.
Diametro : 3 mm.
- 5.2.7.2. **Riempimento**
- Ftalato di didecile al 20 % su Chrom. WAW 80-100 mesh.
- 5.2.7.3. **Rivelatore**
- A ionizzazione di fiamma.
- È opportuno che l'elettrometro del rivelatore a ionizzazione di fiamma sia fissato su una sensibilità di $8 \cdot 10^{-10}$ A.
- 5.2.7.4. **Gas :**
- | | |
|-----------------------------|--|
| gas vettore : azoto : | pressione 2,2 bar,
flusso 35 ml/minuto; |
| gas ausiliario : idrogeno : | pressione 1,8 bar,
flusso 15 ml/minuto. |
- Alimentazione del rivelatore : secondo le indicazioni del fabbricante dell'apparecchio.
- 5.2.7.5. **Temperatura :**
- | | |
|--------------|---------|
| iniettore : | 200 °C, |
| rivelatore : | 200 °C, |
| colonna : | 90 °C. |
- 5.2.7.6. **Registratore :**
- velocità della carta : 5 mm/minuto.
- 5.2.7.7. **Quantità iniettata :** 3 µl.
- Effettuare 5 prove su ciascun campione metilato.
- 5.2.7.8. **Le condizioni cromatografiche sono riportate a titolo indicativo e permettono di ottenere la risoluzione $R \geq 1,5$:**
- $$R = 2 \frac{d'r_2 - d'r_1}{W_1 + W_2}$$
- dove :
- r_1 ed r_2 sono tempi di ritenzione, in minuti,
 W_1 e W_2 sono le ampiezze dei picchi a metà altezza, in mm,
 d' è la velocità della carta in mm/minuto.
- Si consiglia di terminare la cromatografia con una programmazione di temperatura da 90 a 150 °C (10 °C/minuto) per eliminare le sostanze capaci di interferire durante le successive analisi.

5.2.8. *Calcoli*

5.2.8.1. Coefficiente di proporzionalità dell'acido tioglicolico

Esso viene calcolato rispetto all'ottanoato di metile partendo dalla miscela standard.

Siano :

- t : acido tioglicolico,
- k_t : suo coefficiente di proporzionalità,
- m'_t : sua massa (in mg) nella miscela,
- S'_t : superficie del suo picco,
- c : caprilato di metile,
- m'_c : sua massa (in mg) nella miscela,
- S'_c : superficie del suo picco.

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

Questo coefficiente è funzione dell'apparecchiatura.

5.2.8.2. Concentrazione dell'acido tioglicolico nel campione

Siano :

- t : acido tioglicolico,
- k_t : suo coefficiente di proporzionalità,
- S_t : superficie del suo picco,
- c : caprilato di metile,
- m_c : sua massa (in mg) nella miscela,
- S_c : superficie del suo picco,
- M : massa (in mg) della miscela iniziale,

allora la percentuale (m/m) di acido tioglicolico nel campione è uguale a :

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

6. RIPETIBILITÀ ⁽¹⁾

Per un contenuto di acido tioglicolico dell'8 % (m/m) la differenza tra i risultati di 2 dosaggi paralleli, effettuati sullo stesso campione, non deve superare lo 0,8 %.

IDENTIFICAZIONE E DOSAGGIO DELL'ESACLOROFENE**A. IDENTIFICAZIONE**

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Il metodo qui di seguito descritto è applicabile a tutti i prodotti cosmetici.

2. PRINCIPIO

L'esaclorofene contenuto nel campione viene estratto con acetato di etile ed identificato per cromatografia su strato sottile.

3. REATTIVI

Tutti i reattivi devono essere di purezza analitica.

3.1. Acido solforico 8N.

3.2. Celite AW.

3.3. Acetato di etile.

⁽¹⁾ Secondo la norma ISO 5725.

- 3.4. Solvente di sviluppo :
Benzene contenente l'1 % (v/v) di acido acetico glaciale.
- 3.5. Agente rivelatore I :
Soluzione di rodamina B : solubilizzare 100 mg di rodamina B in una miscela costituita da 150 ml di etere etilico, 70 ml di alcol etilico assoluto e 16 ml di acqua.
- 3.6. Agente rivelatore II :
Soluzioni di 2,6-dibromo-4-(cloroimmino)cicloesa-2,5-dienone : solubilizzare 400 mg di 2,6-dibromo-4-(cloroimmino)cicloesa-2,5-dienone in 100 ml di metanolo. Tale soluzione va preparata giornalmente.
Soluzione di carbonato sodico : solubilizzare 10 g di sodio carbonato in 100 ml di acqua distillata.
- 3.7. Soluzione di riferimento :
Preparare una soluzione di esaclorofene allo 0,05 % (m/v) in acetato di etile (3.3).
4. APPARECCHIATURE
- 4.1. Lastrine di gel di silice con indicatore di fluorescenza, di 0,25 mm di spessore.
- 4.2. Materiale comune per cromatografia su strato sottile.
- 4.3. Bagno termostatico capace di contenere una vaschetta cromatografica alla temperatura di 26 °C.
5. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE
- 5.1. Mescolare accuratamente 1 g di campione omogeneizzato con 1 g di celite AW (3.2) ed 1 ml di acido solforico (3.1).
- 5.2. Essiccare a 100 °C per 2 ore.
- 5.3. Il residuo secco così ottenuto viene raffreddato e finemente polverizzato.
- 5.4. Estrarre tale polvere per due volte con 10 ml di etile acetato (3.3), centrifugare dopo ogni estrazione e riunire le soluzioni di acetato di etile (3.3).
- 5.5. Evaporare a 60 °C.
- 5.6. Riprendere il residuo che si ottiene con 2 ml di acetato di etile (3.3).
6. MODALITÀ OPERATIVE
- 6.1. Depositare, su una lastrina per cromatografia (4.1), 2 µl della soluzione del campione in esame (5.6) e 2 µl della soluzione di riferimento (3.7).
- 6.2. Saturare la vaschetta di sviluppo, termostatata a 26 °C, con la miscela di sviluppo (3.4).
- 6.3. Porre la lastrina nella vaschetta e svilupparla per 15 cm con cromatografia ascendente.
- 6.4. Togliere la lastrina ed essicarla in una stufa alla temperatura di 105 °C.
- 6.5. *Rivelazione*
Le macchie corrispondenti all'esaclorofene sulla lastrina sono evidenziate come indicato al punto 6.5.1 o in alternativa al punto 6.5.2.

- 6.5.1. Spruzzare l'agente rivelatore I (3.5) sulla lastrina. Dopo 30 minuti esaminare la lastrina sotto la luce di 254 nm di lunghezza d'onda di una lampada UV.
- 6.5.2. Spruzzare prima la soluzione di 2,6-dibromo-4-(cloroimino)cicloesa-2,5-dienone (agente rivelatore II) e poi la soluzione di sodio carbonato (3.6). Esaminare la lastrina, dopo averla asciugata per 10 minuti a temperatura ambiente, alla luce del giorno.

7. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

7.1. Agente rivelatore I (3.5):

L'esaclorofene si evidenzia come una macchia bluastra su di uno sfondo fluorescente giallo aranciato con un Rf pari a circa 0,5.

7.2. Agente rivelatore II (3.6):

L'esaclorofene si evidenzia come una macchia azzurra su sfondo bianco con un Rf pari a circa 0,5.

B. DETERMINAZIONE QUANTITATIVA

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Il presente metodo è applicabile a tutti i prodotti cosmetici.

2. DEFINIZIONE

La quantità di esaclorofene, presente nel campione, determinata secondo questo metodo è espressa in percentuale di massa di esaclorofene.

3. PRINCIPIO

L'esaclorofene, trasformato in metil derivato, viene dosato per gascromatografia usando un detector a cattura di elettroni. Si adotta il metodo dello standard interno.

4. REATTIVI

Tutti i reattivi devono essere di purezza analitica.

4.1. Acetato di etile.

4.2. N-metil-N-nitroso-p-toluensolfonamide (diazald).

4.3. Etere etilico.

4.4. Metanolo.

4.5. 2-2(-Etossietossi)etanolo (carbitolo).

4.6. Acido formico.

4.7. Soluzione acquosa di idrossido di potassio al 50 % (m/m), preparata giornalmente.

- 4.8. Esano per spettroscopia.
- 4.9. Bromoclorofene (standard n. 1).
- 4.10. 4,4',6,6'-tetracloro-2,2'-tiodifenolo (standard n. 2).
- 4.11. Etere 2,4,4'-tricloro-2-idrossidifenilico (standard n. 3).
- 4.12. Acetone.
- 4.13. Acido solforico 8 N.
- 4.14. Celite AW.
- 4.15. Soluzione in etile acetato di acido formico al 10 % (v/v).
- 4.16. Esaclorofene.
5. APPARECCHIATURE
- 5.1. Normale attrezzatura di laboratorio.
- 5.2. Miniapparecchio per la preparazione del diazometano (Anal. Chem. 45, 2302-3, 1973).
- 5.3. Gascromatografo con rivelatore a cattura di elettroni (63 Ni).
6. MODALITÀ OPERATIVE
- 6.1. *Preparazione delle soluzioni di riferimento*
- La sostanza standard, scelta come riferimento, deve essere tale da non interferire con nessun eccipiente del prodotto da analizzare. Normalmente lo standard n. 1 (4.9) è il più adatto.
- 6.1.1. Pesare accuratamente circa 50 mg di standard n. 1 (4.9) o n. 2 (4.10) o n. 3 (4.11) e 50 mg di esaclorofene (4.16) in un matraccio tarato da 100 ml. Portare a volume con acetato di etile (4.1) (soluzione A). Diluire in un matraccio tarato da 100 ml 10 ml di soluzione A a 100 ml con acetato di etile (4.1) (soluzione B).
- 6.1.2. Pesare accuratamente circa 50 mg di standard n. 1 (4.9) o n. 2 (4.10) o n. 3 (4.11) in un matraccio tarato da 100 ml. Portare a volume con acetato di etile (4.1) (soluzione C).
- 6.2. *Preparazione del campione*⁽¹⁾
- Pesare accuratamente 1 g di campione omogeneizzato e mescolarlo con 1 ml di acido solforico (4.13), 15 ml di acetone (4.12) e 8 g di celite AW (4.14). La sospensione risultante viene essiccata dapprima mediante un trattamento di 30 minuti su un bagnomaria bollente e poi lasciandola per 90 minuti in una stufa ventilata. Raffreddare il residuo finemente polverizzato e trasferirlo in una colonnina di vetro per cromatografia. Eluire con acetato di etile (4.1) e raccoglierne 100 ml. Aggiungere 2 ml di soluzione di standard interno (soluzione C) (6.1.2).

(1) Data la varietà di prodotti nei quali è contenuto l'esacclorofene, è importante come prima cosa verificare il recupero che si ottiene, usando questo metodo, dell'esacclorofene dal campione in esame. Se il recupero è basso, bisogna introdurre alcune modificazioni, ad esempio si può cambiare il solvente (benzene invece di acetato di etile), ecc. Tali modifiche possono essere introdotte previo accordo delle parti interessate.

6.3. *Metilazione del campione*

Raffreddare sia i reattivi che le apparecchiature ad una temperatura compresa tra 0 °C e 4 °C per 2 ore. Nel compartimento esterno dell'apparecchio per la preparazione del diazometano porre 1,2 ml della soluzione ottenuta in 6.2 e 0,1 ml di metanolo (4.4). Nel serbatoio centrale solubilizzare circa 200 mg di diazald (4.2) con 1 ml di carbitolo (4.5) ed 1 ml di etere etilico (4.3). Collegare le varie parti dell'apparecchio, immergere quest'ultimo per metà in un bagno termostatico a 0 °C, ed introdurre nel serbatoio centrale, mediante una siringa, circa 1 ml di soluzione di idrossido di potassio (4.7) preraffreddato. Si deve ottenere un colore giallo persistente.

Se il colore giallo non è persistente, ripetere la metilazione con ulteriori 200 mg di diazald (4.2) ⁽¹⁾.

Dopo 15 minuti togliere l'apparecchio dal bagno termostatico e lasciarlo chiuso a temperatura ambiente per 12 ore. Successivamente aprire l'apparecchio, eliminare l'eccesso di diazometano aggiungendo qualche goccia di soluzione di acido formico in acetato di etile (4.15) e trasferire la soluzione organica in un matraccio tarato da 25 ml. Portare a volume con esano (4.8).

Iniettare 1,5 µl di questa soluzione nel gascromatografo.

6.4. *Metilazione della soluzione standard*

Raffreddare tutti i reattivi e l'apparecchiatura ad una temperatura compresa tra 0 °C e 4 °C per 2 ore. Nel compartimento esterno dell'apparecchio per la produzione del diazometano introdurre :

0,2 ml di soluzione B (6.1.1),
1,0 ml di acetato di etile (4.1),
0,1 ml di metanolo (4.4).

Continuare la metilazione come descritto al punto 6.3.

Iniettare 1,5 µl della soluzione risultante nel gascromatografo.

7. GASCROMATOGRAFIA

La fase stazionaria contenuta nella colonna deve dare un fattore di risoluzione R uguale o superiore a 1,5.

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

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.

Le condizioni operative sotto descritte, date come esempio, consentono di ottenere i risultati voluti :

Materiale della colonna : acciaio inossidabile

Lunghezza : 170 cm

Diametro : 3 mm

Supporto :

chromosorb : WAW

granulometria : 80-100 mesh

Fase stazionaria : OV-17 al 10 %

Temperature:

colonna : 280 °C

iniettore : 280 °C

rivelatore : 280 °C

Gas vettore : azoto esente da ossigeno

flusso dell'azoto : 30 ml/min

pressione di entrata

dell'azoto : 2,3 bar

⁽¹⁾ La persistenza del colore giallo indica la presenza di un eccesso di diazometano indispensabile per assicurare una completa metilazione.

8. ESPRESSIONE DEI RISULTATI**8.1. *Calcolo del coefficiente di proporzionalità dell'esaclorofene***

Il calcolo viene effettuato nei confronti dello standard prescelto in relazione alla miscela standard.

Siano :

h : l'esaclorofene,

K_h : il suo coefficiente di proporzionalità,

m'_h : la sua massa nella miscela espressa in g,

A'_h : l'area del suo picco,

s : lo standard,

m'_s : la sua massa nella miscela espressa in g,

A'_s : l'area del suo picco,

allora

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

8.2. *Calcolo per determinare la quantità di esaclorofene presente nel campione*

Siano :

h : l'esaclorofene,

K_h : il suo coefficiente di proporzionalità,

A_h : l'area del suo picco,

s : lo standard scelto,

m_s : la sua massa nella miscela espressa in g,

A_s : l'area del suo picco,

M : la massa del campione prelevato espressa in g,

allora la percentuale in massa di esaclorofene nel campione sarà data da :

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

9. RIPETIBILITÀ ⁽¹⁾

Per un contenuto di esaclorofene dello 0,1 % (m/m) la differenza fra i risultati di due determinazioni parallele effettuate sullo stesso campione non deve superare 0,005 % in valore assoluto.

DOSAGGIO DEL TOSYLCHLORAMIDUM NATRICUM (CLORAMINA T)**1. CAMPO D'APPLICAZIONE**

Il metodo, qui di seguito descritto, riporta la determinazione della p-toluensolfonclorammide sodica (cloramina T) per mezzo della cromatografia su strato sottile, nei prodotti cosmetici.

⁽¹⁾ Secondo la norma ISO 5725.

2. DEFINIZIONE

Il tenore del campione in cloramina T, determinato col presente metodo, viene espresso come percentuale di massa (m/m).

3. PRINCIPIO

La cloramina T viene idrolizzata quantitativamente a p-toluensolfonammide, mediante ebollizione con acido cloridrico. La quantità di p-toluensolfonammide è determinata fotodensitometricamente dopo cromatografia su strato sottile.

4. REATTIVI

Tutti i reattivi devono essere di qualità analitica.

4.1. p-Toluensolfoncloramme sodica (cloramina T).

4.2. Soluzione di riferimento di p-toluensolfonammide: solubilizzare 50 mg di p-toluensolfonammide in 100 ml di etanolo (4.5).

4.3. Acido cloridrico concentrato 37 % (m/m) $d_4^{20} = 1,18$.

4.4. Etere etilico.

4.5. Etanolo 96 % (v/v).

4.6. Miscele solventi di sviluppo per cromatografia su strato sottile:

4.6.1. n-Butanolo/etanolo (4.5)/acqua (40:4:9; v/v/v) o

4.6.2. Cloroformio/Acetone (6:4; v/v).

4.7. Lastrine pronte per cromatografia su strato sottile al gel di silice senza indicatore di fluorescenza.

4.8. Potassio permanganato.

4.9. Acido cloridrico al 15 % (m/m).

4.10. Reattivo spray di colorazione: soluzione all'1 % (m/v) di o-toluidina in etanolo (4.5).

5. ATTREZZATURA

5.1. Normale attrezzatura di laboratorio.

5.2. Attrezzatura per cromatografia su strato sottile.

5.3. Fotodensitometro.

6. PROCEDIMENTO**6.1. *Idrolisi***

In un pallone da 50 ml si pesa esattamente circa 1 g (m) di campione, aggiungendo poi 5 ml d'acqua distillata e 5 ml di acido cloridrico (4.3), facendo poi bollire a ricadere per un'ora. La sospensione ancora calda si trasferisce immediatamente con acqua in un pallone tarato da 50 ml. Si raffredda e si porta a volume con acqua. Successivamente si centrifuga per almeno 5 minuti a 3 000 giri al minuto e si filtra il surnatante.

6.2. *Estrazione*

6.2.1. Si prelevano 30 ml del filtrato e si estraggono per 3 volte con porzioni di 15 ml di etere etilico (4.4). Gli estratti eteri, se necessario disidratati, vengono raccolti in un pallone tarato da 50 ml e portati a volume con etere etilico (4.4).

6.2.2. Si prelevano 25 ml dell'estratto etero e si essicano in corrente di azoto. Il residuo è ripreso con 1 ml di etanolo (4.5).

6.3. *Cromatografia su strato sottile*

6.3.1. Si depositano in modo puntiforme 20 µl del residuo disciolto in etanolo (6.2) su di una lastrina di gel di silice (4.7).

Nello stesso modo si depositano 8, 12, 16 e 20 µl della soluzione di riferimento di p-toluensolfonammide (4.2).

6.3.2. Si lascia poi sviluppare la lastrina per 15 cm circa nel solvente di sviluppo (4.6.1 o 4.6.2).

6.3.3. Dopo evaporazione totale del solvente (20 minuti in stufa a 110 °C) si immerge la lastrina per 2 o 3 minuti in una atmosfera di vapori di cloro, ottenuta versando circa 100 ml di soluzione di acido cloridrico (4.9) su circa 2 g di potassio permanganato (4.8) in un recipiente ermeticamente chiuso. L'eccesso di cloro si allontana dalla lastrina scaldandola a 100 °C per 5 minuti. Successivamente la lastrina viene spruzzata con il reattivo (4.10).

6.4. *Misura*

Dopo circa un'ora, si misura densitometricamente l'intensità di colorazione delle macchie viola ottenute alla lunghezza d'onda di 525 nm.

6.5. *Costruzione della retta di taratura*

Tracciare la retta di taratura mettendo in relazione le quantità di p-toluensolfonammide depositate (4, 6, 8, 10 µg) e le rispettive altezze dei picchi ottenuti.

7. OSSERVAZIONI

Il metodo può essere controllato sottoponendo al medesimo trattamento del campione in esame (6) soluzioni allo 0,1 % e 0,2 % (m/m) di cloramina T (4.1).

8. CALCOLO

Il tenore del campione in cloramina T, espresso come percentuale di massa, si ricava con la seguente formula :

$$\% \text{ (m/m) di cloramina T} = \frac{1,33 \times a}{60 \times m}$$

dove:

1,33: fattore di conversione p-toluensolfonammide/cloramina T,

a: quantità espressa in μg di p-toluensolfonammide nel campione in esame letta sulla curva di taratura,

m: massa del campione espressa in g.

9. RIPETIBILITÀ ⁽¹⁾

Per un contenuto di cloramina T dell'ordine dello 0,2 % (m/m) la differenza fra i risultati di due determinazioni parallele effettuate sullo stesso campione non deve superare lo 0,03 %.

DOSAGGIO DEI COMPOSTI FLUORURATI NEI DENTIFRICI

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Il metodo si applica alla determinazione del fluoro totale nei dentifrici ed è adatto per quantità che non superino lo 0,25 % in massa.

2. DEFINIZIONE

Il contenuto in fluoro del campione determinato secondo questo metodo si esprime in percentuale di massa.

3. PRINCIPIO

Il fluoro presente come composto fluorurato viene trasformato in trietilfluorosilano (TEFS) per reazione diretta con trietilclorosilano (TECS) in ambiente acido ed estratto simultaneamente con xilene contenente cicloesano come standard interno.

La soluzione ottenuta è analizzata gascromatograficamente.

4. REATTIVI

Tutti i reattivi devono essere di purezza analitica.

4.1. Fluoruro di sodio, essiccato in stufa fino a peso costante alla temperatura di 120 °C.

4.2. Acqua bidistillata o di qualità equivalente.

4.3. Acido cloridrico concentrato $d_4^{20} = 1,19$.

4.4. Cicloesano (CH).

4.5. Xilene, che non mostri sul cromatogramma picchi prima di quello del solvente quando venga cromatografato nelle stesse condizioni dei campioni (6.1).

In caso di necessità lo xilene va purificato per distillazione (5.8).

⁽¹⁾ Secondo la norma ISO 5725.

- 4.6. Trietilclorosilano (TECS Merck o equivalente).
- 4.7. **Soluzioni standard di sodio fluoruro**
- 4.7.1. Soluzione standard concentrata (concentrazione 0,250 mg F⁻/ml). Pesare esattamente 138,1 mg di fluoruro di sodio (4.1) e solubilizzarli con acqua (4.2). Trasferire quantitativamente tale soluzione in un matraccio tarato da 250 ml (5.5), portare a volume con acqua (4.2) ed agitare.
- 4.7.2. Soluzione standard diluita (concentrazione 0,050 mg F⁻/ml) :
Prelevare esattamente 20 ml della soluzione standard concentrata (4.7.1) e portarli in un matraccio tarato da 100 ml (5.5), portare a volume con acqua (4.2) ed agitare.
- 4.8. **Soluzione di cicloesano (standard interno)**
Diluire 1 ml di cicloesano (4.4) con 5 ml di xilene (4.5).
- 4.9. **Soluzione di trietilclorosilano e di standard interno**
Pipettare (5.7) 0,6 ml di trietilclorosilano (4.6) e 0,12 ml della soluzione di standard interno (4.8) in un matraccio tarato da 10 ml. Portare a volume con xilene (4.5) ed agitare. Tale soluzione va preparata quotidianamente.
- 4.10. Acido perclorico 70 % (m/v).
- 4.11. Acido perclorico 20 % (m/v) in acqua (4.2).
5. **APPARECCHIATURA**
- 5.1. Normale attrezzatura di laboratorio e di gascromatografia.
- 5.2. Gascromatografo provvisto di rivelatore a ionizzazione di fiamma.
- 5.3. Omogeneizzatore Vortex o equivalente.
- 5.4. Agitatore tipo Bühler SMB₁ o equivalente.
- 5.5. Matracci tarati da 100 e 250 ml in polipropilene.
- 5.6. Provette da centrifuga in vetro, da 20 ml di volume, con tappi a vite rivestiti in teflon. Provette Sovirel tipo 611-56 o equivalenti. Tali provette e relativi tappi a vite vanno puliti trattandoli varie ore con acido perclorico (4.11) e sciacquandoli bene per 5 volte con acqua (4.2). Infine si essicano in stufa a 100 °C.
- 5.7. Pipette automatiche, con puntali in plastica monouso, in grado di fornire volumi di liquido compresi tra 50 e 200 microlitri.
- 5.8. Apparecchio di distillazione munito di colonna di Schneider a tre bolle o di una colonna di Vigreux equivalente.

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

- 6.1.1. Prelevare un tubo di dentifricio sigillato, aprirlo tagliandolo, trasferire tutto il contenuto in un recipiente di plastica ed omogeneizzare. Conservare in condizioni tali da evitare il deterioramento.
- 6.1.2. In una provetta da centrifuga (5.6), pesare esattamente circa 150 mg (m) di campione, aggiungere 5 ml di acqua (4.2) ed omogeneizzare (5.3).
- 6.1.3. Aggiungere 1 ml di xilene (4.5).
- 6.1.4. Aggiungere goccia a goccia 5 ml di acido cloridrico (4.3) ed omogeneizzare (5.3).
- 6.1.5. Aggiungere 0,5 ml di soluzione di trietilclorosilano e di standard interno (4.9).
- 6.1.6. Chiudere la provetta (5.6) con il tappo a vite, mescolare accuratamente per 45 minuti nell'agitatore (5.4) regolato in modo da fornire 150 colpi al minuto.
- 6.1.7. Centrifugare per 10 minuti ad una velocità tale che si ottenga una netta separazione delle fasi. Aprire, prelevare lo strato organico ed iniettarne 3 µl nella colonna del gascromatografo (5.2).

Osservazione :

L'eluizione di tutti i componenti richiede 20 minuti circa.

- 6.1.8. Ripetere l'iniezione, calcolare il rapporto medio delle aree dei picchi del trietilfluorosilano e del cicloesano (ATEFS/ACH) e leggere sulla curva di taratura (6.3) la corrispondente quantità di fluoruro, espressa in mg (m₁).
- 6.1.9. Calcolare il contenuto totale in fluoruri del campione, espresso in percentuale in massa di fluoruro come indicato al punto 7.

6.2. *Condizioni cromatografiche***6.2.1. Colonna**

Materiale di costruzione : tubo di acciaio inossidabile.

Lunghezza : 180 cm.

Diametro : 3 mm.

Supporto : Gaschrom Q.

Granulometria : 80-100 mesh.

Fase stazionaria : 20 % di olio al silicone DC-200 o equivalente su gaschrom Q, 80-100 mesh.

Tale colonna deve essere condizionata a 100 °C per una notte con un flusso di azoto pari a 25 ml/min.

Tale operazione va ripetuta dopo ogni giornata di lavoro.

Ogni 4 o 5 iniezioni la colonna va altresì ricondizionata riscaldando a 100 °C e per trenta minuti.

Temperature :

colonna : 70 °C,

iniettore : 150 °C,

rivelatore : 250 °C.

Gas di trasporto : azoto.

Flusso del gas di trasporto : 35 ml/min.

6.3. *Costruzione della curva di taratura*

- 6.3.1. In una serie di 6 provette da centrifuga (5.6) pipettare 0, 1, 2, 3, 4 e 5 ml della soluzione standard di fluoruro di sodio diluita (4.7.2).

Portare il volume di ciascuna provetta a 5 ml con acqua (4.2).

- 6.3.2. Procedere come descritto ai punti 6.1.3, 6.1.4, 6.1.5 e 6.1.6.
- 6.3.3. Iniettare 3 µl della fase organica contenuta in ogni provetta nella colonna del gascromatografo (5.2).
- 6.3.4. Ripetere l'iniezione e calcolare il rapporto medio delle aree dei picchi del trietilfluorosilano e del cicloesano (ATEFS/ACH).
- 6.3.5. Riportare in un grafico sulle ordinate i rapporti delle aree dei picchi del trietilfluorosilano e del cicloesano (ATEFS/ACH) misurati come indicato al punto 6.3.4, e sulle ascisse le masse di fluoruro, espresse in mg, contenute nelle soluzioni analizzate (6.3.1). Tracciare la curva di taratura.

7. CALCOLO

La concentrazione di fluoruri totali del campione, espressa come percentuale in massa (% m/m F⁻), è data dalla formula seguente :

$$\% \text{ m/m F}^{-} = \frac{m_1}{m} \times 100$$

dove :

m : quantità di campione analizzata, espressa in mg (6.1.2),

m₁ : quantità di fluoruro, espressa in mg, letta sulla curva di taratura (6.1.8).

8. RIPETIBILITÀ (1)

Per un contenuto di F dell'ordine dello 0,15 % (m/m) la differenza fra i risultati di due determinazioni, effettuate in parallelo sullo stesso campione, non deve essere superiore allo 0,012 % in valore assoluto.

IDENTIFICAZIONE E DOSAGGIO DEI COMPOSTI MERCURIO-ORGANICI

SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Il metodo, qui di seguito descritto, è adatto per identificare e determinare i composti mercurio-organici impiegati come conservanti nei prodotti cosmetici.

In particolare può essere applicato alle analisi del tiomersal (DCI) (2-(etilmercuriotio)benzoato di sodio), del fenilmercurio e dei suoi sali.

A. IDENTIFICAZIONE

1. PRINCIPIO

I composti mercurio-organici vengono complessati sotto forma di ditizonati. Dopo estrazione dei ditizonati con carbonio tetracloruro, si effettua una cromatografia su strato sottile con lastre di gel di silice. I suddetti ditizonati si evidenziano come macchie di colore arancio.

2. REATTIVI

Tutti i reattivi devono essere di qualità analitica.

2.1. Acido solforico 25 % (v/v).

(1) Secondo la norma ISO 5725.

- 2.2. Soluzione di 1,5-difenil-3-tiocarbazone (ditizone): solubilizzare 0,8 mg in 100 ml di carbonio tetracloruro (2.4).
- 2.3. Azoto.
- 2.4. Carbonio tetracloruro.
- 2.5. Sistema solvente per la cromatografia su strato sottile: esano/acetone 90:10 (v/v).
- 2.6. Soluzioni delle seguenti sostanze di riferimento allo 0,001 %:
 - 2-(Etilmercuriotio)benzoato di sodio.
 - Cloruro di etilmercurio o cloruro di metilmercurio.
 - Nitrato o acetato di fenilmercurio.
 - Dicloruro di mercurio o di(acetato) di mercurio.
- 2.7. Lastrine cromatografiche di gel di silice, pronte per l'uso (Merck 5721) o analoghe.
- 2.8. Sodio cloruro.

3. ATTREZZATURA

- 3.1. Normale attrezzatura di laboratorio.
- 3.2. Normale attrezzatura per cromatografia su strato sottile.
- 3.3. Filtro per la separazione delle fasi.

4. PROCEDIMENTO

4.1. Estrazione

- 4.1.1. In una provetta da centrifuga, disperdere 1 g di campione con 20 ml di acqua distillata. Realizzare la massima dispersione riscaldando la provetta in un bagnomaria alla temperatura di 60 °C. Aggiungere 4 g di sodio cloruro (2.8), agitare e raffreddare.
- 4.1.2. Centrifugare almeno 20 minuti alla velocità di 4 500 giri al minuto, per separare la maggior parte della fase solida. Filtrare in un imbuto separatore e aggiungere 0,25 ml di soluzione di acido solforico (2.1).
- 4.1.3. Estrarre più volte con 2 o 3 ml di soluzione di ditizone (2.2), finché l'ultima fase organica rimanga verde.
- 4.1.4. Filtrare su filtro separatore di fasi (3.3) ogni fase organica recuperata.
- 4.1.5. Evaporare a secco con corrente di azoto (2.3) le fasi organiche riunite.
- 4.1.6. Riprendere con 0,5 ml di carbonio tetracloruro (2.4) il residuo ottenuto e depositare immediatamente un'aliquota di questa soluzione come indicato in 4.2.1.

4.2. **Separazione ed identificazione**

4.2.1. Depositare immediatamente su di una lastrina cromatografica di gel di silice (2.7) 50 µl della soluzione (4.1.6). Trattare simultaneamente come indicato al punto 4.1 e seguenti 10 ml delle soluzioni standard (2.6) e depositare sulla stessa lastrina 50 µl delle soluzioni ottenute in 4.1.6.

4.2.2. Sviluppare la piastrina nel solvente (2.5) a una altezza di 15 cm.

I composti mercurio-organici compaiono come macchie colorate, la cui colorazione è stabile a condizione di ricoprire la lastrina subito dopo l'evaporazione del solvente.

I valori di Rf ottenuti sono a titolo indicativo i seguenti :

	Rf	Colore
Tiomersal	0,33	arancio
Cloruro di etilmercurio	0,29	arancio
Cloruro di metilmercurio	0,29	arancio
Fenilmercurio e suoi sali	0,21	arancio
Dicloruro di mercurio	0,10	arancio
Di(acetato) di mercurio	0,10	arancio
1,5-Difenil-3-tiocarbazone	0,09	rosa

B. DETERMINAZIONE QUANTITATIVA1. **DEFINIZIONE**

Il tenore del campione in composti mercurio-organici, determinato secondo il seguente metodo, è espresso in percentuale di massa di mercurio.

2. **PRINCIPIO**

Il metodo consiste in un dosaggio del mercurio totale. È dunque necessario, preventivamente, accertarsi dell'assenza di mercurio inorganico e conoscere quale derivato mercurio-organico sia contenuto nel campione. Dopo mineralizzazione, il mercurio liberato viene dosato per assorbimento atomico senza fiamma.

3. **REATTIVI**

Tutti i reattivi devono essere di qualità analitica.

3.1. Acido nitrico concentrato ($d_4^{20} = 1,41$).

3.2. Acido solforico concentrato ($d_4^{20} = 1,84$).

3.3. Acqua bidistillata.

3.4. Soluzione di potassio permanganato al 7 % (m/v).

3.5. Soluzione di cloruro di idrossilammonio all'1,5 % (m/v).

3.6. Soluzione di perossodisolfato di dipotassio al 5 % (m/v).

- 3.7. Soluzione di dicloruro di stagno al 10 % (m/v).
- 3.8. Acido cloridrico concentrato ($d_4^{20} = 1,18$).
- 3.9. Lana di vetro impregnata con l'1 % di dicloruro di palladio.
4. APPARECCHIATURA
- 4.1. Attrezzatura comune di laboratorio.
- 4.2. Apparecchiatura per la determinazione del mercurio con la tecnica dell'assorbimento atomico senza fiamma (tecnica del vapore freddo), equipaggiata della necessaria vetreria e con lunghezza minima della cella di misura di 10 cm.
5. PROCEDIMENTO
- Prendere tutte le precauzioni necessarie per la ricerca analitica di tracce di mercurio.
- 5.1. *Mineralizzazione*
- 5.1.1. Pesare accuratamente 150 mg circa di campione (m). Aggiungere 10 ml di acido nitrico (3.1). Lasciare digerire per tre ore, in bagnomaria a 55 °C, in un recipiente ermeticamente chiuso, agitando a intervalli regolari. Contemporaneamente effettuare una prova in bianco.
- 5.1.2. Dopo raffreddamento, aggiungere 10 ml di acido solforico (3.2) e collocare nuovamente in bagnomaria a 55 °C per 30 minuti.
- 5.1.3. Porre il recipiente in un bagno di ghiaccio ed aggiungere cautamente 20 ml di acqua (3.3).
- 5.1.4. Aggiungere aliquote di 2 ml di soluzione di potassio permanganato (3.4), finché la soluzione resti colorata e collocare nuovamente in bagnomaria alla temperatura di 55 °C per altri 15 minuti.
- 5.1.5. Aggiungere 4 ml di soluzione di perossodisolfato di dipotassio (3.6) e continuare a riscaldare in bagnomaria a 55 °C per 30 minuti.
- 5.1.6. Lasciar raffreddare e travasare il contenuto del recipiente in un pallone tarato da 100 ml. Lavare il recipiente con 5 ml di soluzione di cloruro di idrossilammonio (3.5) e poi per 4 volte con 10 ml di acqua (3.3). Aggiungere tali fasi acquose al pallone tarato. La soluzione deve essere incolore. Portare poi il volume del pallone tarato a 100 ml di acqua (3.3).
- 5.2. *Dosaggio*
- 5.2.1. Prelevare 10 ml della soluzione da esaminare (5.1.6) e portarli nel recipiente di vetro dell'apparecchio per la determinazione del mercurio (4.2). Diluire con 100 ml di acqua (3.3) ed aggiungere 5 ml di acido solforico (3.2) e 5 ml di soluzione di dicloruro di stagno (3.7). Mescolare dopo ogni aggiunta. Aspettare 30 secondi per ridurre tutto il mercurio ionico allo stato metallico e procedere alla misura (n).
- 5.2.2. Porre della lana di vetro impregnata di dicloruro di palladio (3.9) tra il recipiente di riduzione e la cella di misura dello strumento (4.2). Ripetere l'operazione indicata al punto 5.2.1 e se la misura (n') non è uguale a zero la mineralizzazione è stata incompleta e l'analisi deve essere ripetuta.

6. CALCOLO

Il tenore del campione espresso come mercurio in percentuale di massa è calcolato mediante la seguente formula :

$$\% \text{ di mercurio (m/m)} = \frac{n}{m}$$

dove :

n : la quantità di mercurio espressa in μg letta sullo strumento,

m : la massa espressa in mg del campione prelevato.

7. OSSERVAZIONI

7.1. Per migliorare la mineralizzazione può essere necessario procedere preventivamente ad una diluizione del campione in esame.

7.2. Qualora si sospetti che del mercurio possa essere stato fissato per adsorbimento da parte del substrato, deve essere effettuata una determinazione supplementare con la tecnica dell'arricchimento.

8. RIPETIBILITÀ ⁽¹⁾

Per concentrazioni di mercurio dello 0,007 % (m/m), la differenza fra i risultati di due determinazioni parallele effettuate sullo stesso campione non deve superare lo 0,00035 %.

DOSAGGIO DEI SOLFURI ALCALINI E ALCALINO-TERROSI**1. OGGETTO E CAMPO D'APPLICAZIONE**

Il metodo, di seguito riportato, descrive il dosaggio dei solfuri nei prodotti cosmetici.

La presenza di tioli o di altre sostanze riducenti (solfiti inclusi) non interferisce nel dosaggio.

2. DEFINIZIONE

Il tenore del campione in solfuri, dosato secondo questo metodo, viene espresso in percentuale di massa di zolfo.

3. PRINCIPIO

Dopo acidificazione, l'idrogeno solforato, che si forma, viene trascinato da una corrente di azoto, e successivamente fissato sotto forma di solfuro di cadmio. Tale composto dopo filtrazione e lavaggio viene dosato iodometricamente.

4. REATTIVI

Tutti i reattivi devono essere di qualità analitica.

⁽¹⁾ Secondo la norma ISO 5725.

- 4.1. Acido cloridrico concentrato ($d_4^{20} = 1,19$).
- 4.2. Soluzione titolata di tiosolfato di sodio 0,1 N.
- 4.3. Soluzione titolata di iodio 0,1 N.
- 4.4. Solfuro di disodio.
- 4.5. Di(acetato) di cadmio.
- 4.6. Soluzione di ammonio idrossido concentrata ($d_4^{20} = 0,90$).
- 4.7. Soluzione ammoniacale di di(acetato) di cadmio: trattare 10 g di di(acetato) di cadmio (4.5) con 50 ml di acqua circa, aggiungere la soluzione di ammonio idrossido (4.6), quanto basta a ridisciogliere il precipitato (circa 20 ml) ed aggiungere acqua fino ad un volume di 100 ml.
- 4.8. Azoto.
- 4.9. Soluzione di ammonio idrossido 1 M.

5. MATERIALE

- 5.1. Materiale comune di laboratorio.
- 5.2. Pallone da 100 ml a tre colli smerigliati e normalizzati.
- 5.3. Due beute da 150 ml a collo smerigliato, munite di un dispositivo a tenuta contenente un tubo che vada a pescare sul fondo e di un altro tubo laterale per consentire il passaggio al gas di trascinamento.
- 5.4. Imbutto a gambo lungo.

6. MODALITÀ OPERATIVE

6.1. *Sviluppo dei solfuri*

- 6.1.1. Scegliere un campione da esaminare costituito da un recipiente sigillato. Pesarne nel pallone (5.2) una quantità (m) che corrisponda al massimo a 30 mg di ione solfuro. Introdurre 60 ml di acqua distillata e due gocce di liquido antischiuma.
- 6.1.2. Introdurre 50 ml della soluzione (4.7) in ciascuna delle due beute (5.3).
- 6.1.3. Adattare sul pallone (5.1) un imbutto da carico, un tubo che peschi sul fondo ed un tubo di sviluppo. Collegare il tubo di sviluppo alle beute (5.3), disposte in serie, mediante un tubo in PVC.

Nota :

Tale apparecchiatura deve superare la seguente prova di tenuta: in condizioni identiche a quelle della prova sostituire il prodotto da dosare con 10 ml di una soluzione di riferimento di solfuro di disodio preparata partendo dal composto (4.4) e contenente X mg di solfuro, determinati per via iodometrica. Siano Y i mg di solfuro trovati alla fine dell'operazione. La differenza tra le due quantità X ed Y non deve risultare superiore al 3 %.

- 6.1.4. Fare passare l'azoto (4.8) nell'apparecchiatura alla velocità di flusso di due bolle al secondo, per 15 minuti, per scacciare l'aria contenuta nel pallone (5.2).
- 6.1.5. Riscaldare il pallone (5.2) ad una temperatura di $85\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$.
- 6.1.6. Arrestare il flusso di azoto (4.8) ed aggiungere goccia a goccia dall'imbuto da carico 40 ml di acido cloridrico (4.1).
- 6.1.7. Ristabilire il flusso di azoto (4.8) una volta che sia defluita la quasi totalità dell'acido, lasciandone nell'imbuto da carico un minimo livello per evitare fughe di idrogeno solforato.
- 6.1.8. Dopo 30 minuti sospendere il riscaldamento e lasciar raffreddare il pallone (5.2) continuando a far passare la corrente di azoto (4.8) per almeno 90 minuti.
- 6.2. **Titolazione**
- 6.2.1. Filtrare il solfuro di cadmio formatosi nelle beute (5.3) in un imbuto a gambo lungo (5.4).
- 6.2.2. Lavare le beute (5.3) prima con una soluzione di ammonio idrossido (4.9), che va poi versata sul filtro, e successivamente con acqua distillata utilizzandola per lavare il precipitato trattenuto dal filtro.
- 6.2.3. Terminare il lavaggio del precipitato con 100 ml di acqua.
- 6.2.4. Porre il filtro di carta nella prima beuta (5.3) che ha contenuto il precipitato. Aggiungere 25,0 ml di soluzione titolata di iodio 0,1 N (4.3), 20 ml circa di acido cloridrico (4.1) e 50 ml di acqua distillata.
- 6.2.5. Dosare l'eccesso di iodio con la soluzione titolata di tiosolfato di sodio (4.2) Sia n_2 il numero di ml utilizzato.

7. CALCOLO

Il tenore del campione espresso in percentuale di massa di zolfo è calcolato mediante la seguente formula :

$$\% S (m/m) = \frac{(n_1 x_1 - n_2 x_2) \cdot 32}{20 m}$$

dove :

- n_1 : ml adoperati della soluzione titolata di iodio (4.3),
 x_1 : normalità di questa soluzione,
 n_2 : ml adoperati della soluzione titolata di sodio tiosolfato (4.2),
 x_2 : normalità di questa soluzione,
 m : massa di campione prelevata espressa in g.

8. RIPETIBILITÀ (1)

Per un tenore di solfuri dell'ordine del 2 % (m/m) la differenza tra i risultati di due dosaggi paralleli effettuati sullo stesso campione non deve superare lo 0,2 %.

(1) Secondo la norma ISO 5725.