

SESTA DIRETTIVA 95/32/CE DELLA COMMISSIONE

del 7 luglio 1995

relativa ai metodi di analisi necessari per il controllo della composizione dei prodotti cosmetici

(Testo rilevante ai fini del SEE)

LA COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE,

visto il trattato che istituisce la Comunità 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 94/32/CE della Commissione ⁽²⁾, in particolare l'articolo 8, paragrafo 1,

considerando che la direttiva 76/768/CEE prevede la verifica ufficiale di prodotti cosmetici allo scopo di garantire che siano soddisfatte le condizioni stabilite dalle disposizioni della Comunità riguardanti la composizione dei prodotti cosmetici;

considerando che devono essere definiti quanto prima tutti i metodi di analisi necessari; considerando che alcuni metodi sono già stati adottati con la direttiva 80/1335/CEE ⁽³⁾, modificata dalla direttiva 87/143/CEE ⁽⁴⁾, con la direttiva 82/434/CEE ⁽⁵⁾, modificata dalla direttiva 90/207/CEE ⁽⁶⁾ e con le direttive 83/514/CEE ⁽⁷⁾, 85/490/CEE ⁽⁸⁾ e 93/73/CEE della Commissione ⁽⁹⁾;

considerando che l'individuazione e il dosaggio dell'acido benzoico, dell'acido 4-idrossibenzoico, dell'acido sorbico, salicilico e propionico nei prodotti cosmetici e l'individuazione e il dosaggio di idrochinone, idrochinone monoetiletere, idrochinone monoetiletere e idrochinone monobenziletere nei prodotti cosmetici costituisce la sesta fase;

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

HA ADOTTATO LA PRESENTE DIRETTIVA:

Articolo 1

Gli Stati membri adottano tutte le disposizioni necessarie per garantire che durante il controllo ufficiale dei prodotti cosmetici:

— l'individuazione e il dosaggio dell'acido benzoico, dell'acido 4-idrossibenzoico, dell'acido sorbico, dell'acido salicilico e dell'acido propionico,

— l'individuazione e il dosaggio dell'idrochinone, dell'idrochinone monoetiletere, dell'idrochinone monoetiletere e dell'idrochinone monobenziletere,

siano effettuati conformemente ai metodi stabiliti nell'allegato.

Articolo 2

1. Gli Stati membri pongono in vigore le disposizioni legislative, regolamentari e amministrative necessarie per conformarsi alla presente direttiva entro il 30 settembre 1996. Essi ne informano immediatamente la Commissione.

Quando gli Stati membri adottano tali disposizioni, queste contengono un riferimento alla presente direttiva o sono corredate di un siffatto riferimento all'atto della pubblicazione ufficiale. Le modalità del riferimento sono decise dagli Stati membri.

2. Gli Stati membri comunicano alla Commissione il testo delle disposizioni di diritto interno da essi adottate nel settore disciplinato dalla presente direttiva.

Articolo 3

La presente direttiva entra in vigore il ventesimo giorno successivo alla pubblicazione nella *Gazzetta ufficiale delle Comunità europee*.

Articolo 4

Gli Stati membri sono destinatari della presente direttiva.

Fatto a Bruxelles, il 7 luglio 1995.

Per la Commissione

Emma BONINO

Membro della Commissione⁽¹⁾ GU n. L 262 del 27. 9. 1976, pag. 169.⁽²⁾ GU n. L 181 del 15. 7. 1994, pag. 31.⁽³⁾ GU n. L 383 del 31. 12. 1980, pag. 27.⁽⁴⁾ GU n. L 57 del 27. 2. 1987, pag. 56.⁽⁵⁾ GU n. L 185 del 30. 6. 1982, pag. 1.⁽⁶⁾ GU n. L 108 del 28. 4. 1990, pag. 92.⁽⁷⁾ GU n. L 291 del 24. 10. 1983, pag. 9.⁽⁸⁾ GU n. L 295 del 7. 11. 1985, pag. 30.⁽⁹⁾ GU n. L 231 del 14. 9. 1993, pag. 34.

ALLEGATO

I. INDIVIDUAZIONE E DOSAGGIO DELL'ACIDO BENZOICO, DELL'ACIDO 4-IDROSSIBENZOICO, DELL'ACIDO SORBICO, DELL'ACIDO SALICILICO E DELL'ACIDO PROPIONICO NEI COSMETICI**1. Oggetto e campo di applicazione**

Il metodo ha per oggetto l'individuazione e il dosaggio dell'acido benzoico, dell'acido 4-idrossibenzoico, dell'acido sorbico, dell'acido salicilico e dell'acido propionico nei cosmetici. Con procedure separate sono descritti l'individuazione di questi conservanti, il dosaggio dell'acido propionico e il dosaggio dell'acido 4-idrossibenzoico, dell'acido salicilico, dell'acido sorbico e dell'acido benzoico.

2. Definizione

I contenuti di: acido benzoico, acido 4-idrossibenzoico, acido salicilico, acido sorbico e acido propionico determinati con questo metodo sono espressi come percentuale, rispetto alla massa degli acidi liberi.

A. INDIVIDUAZIONE**1. Principio**

Dopo l'estrazione acido/base dei conservanti, l'estratto è analizzato mediante TLC e derivatizzazione su piastra. A seconda dei risultati ottenuti, l'identificazione è confermata mediante HPLC, oppure — nel caso dell'acido propionico — mediante GC.

2. Reagenti

- 2.1. Tutti i reagenti devono avere il grado di purezza richiesto per analisi. Si dovrà impiegare acqua distillata, oppure acqua di purezza almeno equivalente.
- 2.2. Acetone.
- 2.3. Etere dietilico.
- 2.4. Acetonitrile.
- 2.5. Toluene.
- 2.6. n-Esano.
- 2.7. Paraffina liquida.
- 2.8. Acido cloridrico, 4M.
- 2.9. Idrossido di potassio, 4M in acqua.
- 2.10. Cloruro di calcio, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.
- 2.11. Carbonato di litio, Li_2CO_3 .
- 2.12. 2-Bromo-2'-acetonaftone.
- 2.13. Acido 4-idrossibenzoico.
- 2.14. Acido salicilico.
- 2.15. Acido benzoico.
- 2.16. Acido sorbico.
- 2.17. Acido propionico.

- 2.18. Soluzioni di riferimento
Preparare soluzioni allo 0,1 % (m/v) di ciascuno dei cinque conservanti (da 2.13 a 2.17) in etere dietilico.
- 2.19. Reagente di derivatizzazione
Soluzione allo 0,5 % (m/v) di 2-bromo-2'-acetonafone (2.12) in acetonitrile (2.4) (50 mg/10 ml). Questa soluzione deve essere preparata ogni settimana e conservata in frigorifero.
- 2.20. Soluzione di catalizzazione
Soluzione allo 0,3 % (m/v) di carbonato di litio (2.11) in acqua (300 mg/100 ml). Questa soluzione deve essere preparata al momento.
- 2.21. Solvente di sviluppo
Toluene (2.5)/Acetone (2.2) (20:0,5, v/v).
- 2.22. Paraffina (2.7)/n-Esano (2.6) (1:2, v/v).

3. Apparecchiature

Attrezzature per uso normale di laboratorio.

- 3.1. Bagno ad acqua, in grado di mantenere la temperatura di 60 °C.
- 3.2. Vaschetta di sviluppo.
- 3.3. Fonte di luce ultravioletta, 254 e 366 nm.
- 3.4. Lastra per cromatografia su strato sottile, Kieselgel 60, senza indicatore di fluorescenza, 20 × 20 cm, strato 0,25 mm, con zona di concentrazione da 2,5 × 20 cm. (Merck 11845, o equivalente).
- 3.5. Microsiringa, 10 µl.
- 3.6. Microsiringa, 25 µl.
- 3.7. Forno, in grado di mantenere temperature fino a 105 °C.
- 3.8. Provette in vetro da 50 ml, con tappo a vite.
- 3.9. Filtri di carta, diametro 90 mm, Schleicher & Schull, Weissband n. 5892, o equivalenti.
- 3.10. Cartine universali per il rilevamento del pH, per valori dello stesso compresi tra 1 e 11.
- 3.11. Flaconcini in vetro da 5 ml per campionature.
- 3.12. Evaporatore rotante (Rotavapor o equivalente).
- 3.13. Piastra riscaldante.

4. Procedura

4.1. Preparazione del campione

Pesare circa 1 grammo di campione in una provetta di vetro da 50 ml con tappo a vite (3.8). Aggiungere 4 gocce di acido cloridrico 4M (2.8) e 40 ml di acetone (2.2). Per i prodotti di elevata basicità quali i saponi da toilette, aggiungere 20 gocce di acido cloridrico 4M (2.8). Controllare che il valore del pH sia prossimo a 2, servendosi dell'apposita cartina (3.10). Chiudere la provetta e agitare vigorosamente per un minuto.

Se necessario, per facilitare l'estrazione dei conservanti nella fase di acetone, riscaldare gradualmente la miscela fino a 60 °C, in modo da fare fondere la fase lipidica. Raffreddare la soluzione a temperatura ambiente e filtrare su un filtro di carta (3.9) in una beuta conica. Trasferire 20 ml di filtrato in una beuta conica da 200 ml, aggiungere 20 ml di acqua e mescolare. Regolare il pH

della miscela in prossimità del valore 10, servendosi di idrossido di potassio 4M (2.9). Impiegare l'apposita cartina (3.10) per misurare il pH.

Aggiungere 1 g di cloruro di calcio (2.10) ed agitare vigorosamente. Filtrare sul filtro di carta (3.9) in un imbuto di separazione da 250 ml contenente 75 ml di etere dietilico (2.3) e agitare vigorosamente per un minuto. Dopo separazione, raccogliere lo strato acquoso in una beuta conica. Scartare lo strato di etere. Servendosi dell'apposita cartina (3.10), regolare il pH della soluzione acquosa a circa 2 mediante acido cloridrico 4M (2.8). Aggiungere poi 10 ml di etere dietilico (2.3), chiudere la beuta e agitare vigorosamente per un minuto. Dopo separazione, trasferire lo strato di etere in un evaporatore rotante per film (3.12) e scartare lo strato acquoso.

Far evaporare l'etere e riprendere il residuo in 1 ml di etere dietilico (2.3). Trasferire la soluzione ottenuta in un flaconcino di vetro (3.11).

4.2. Cromatografia su strato sottile

Su ciascuno dei punti di deposito delle soluzioni di riferimento e dei campioni che saranno sottoposti a cromatografia, applicare circa 3 μ l di soluzione di carbonato di litio (2.20) con una microsiringa (3.5) a distanze uguali sulla linea di partenza nella zona di concentrazione di una lastra per TLC (3.4) e procedere all'essiccazione mediante corrente di aria fredda.

Trasferire la lastra per TLC su una piastra (3.13), riscaldata a 40 °C, in modo da mantenere le dimensioni delle macchie quanto più limitate possibile. Con una microsiringa (3.5) applicare 10 μ l di ciascuna delle soluzioni di riferimento (2.18) e la soluzione campione (4.1) sulla linea di partenza della piastra, proprio sui punti esatti in cui è stata applicata la soluzione di carbonato di litio.

Applicare infine circa 15 μ l di reagente di derivatizzazione (2.19) (soluzione di 2-bromo-2'-acetonaftone), anche in questo caso sui punti esatti in cui sono state poste le soluzioni di riferimento/campione e la soluzione di carbonato di litio.

Riscaldare la lastra per TLC in un forno (3.7) a 80 °C per 45 minuti. A raffreddamento avvenuto, sviluppare la lastra in una vaschetta (3.2) dopo averla equilibrata per 15 minuti (senza impiegare rivestimenti in carta da filtro), servendosi di solvente per sviluppo 2.21 (toluene/acetone), fino a quando il fronte del solvente ha raggiunto la distanza di 15 cm (circa 80 minuti).

Asciugare la lastra in una corrente di aria fredda ed esaminare le macchie ottenute servendosi di una lampada UV (3.3). Per migliorare le condizioni di fluorescenza delle macchie meno riuscite, la lastra per TLC può essere immersa in una soluzione di paraffina/n-esano (2.22).

5. Individuazione

Calcolare il valore di R_f per ciascuna macchia.

Paragonare il R_f e il comportamento sotto irraggiamento UV ottenuto per il campione con quello ricavato dalle soluzioni di riferimento.

Formulare una conclusione preliminare riguardo alla presenza e all'identità dei conservanti rilevati. Eseguire l'HPLC descritta al capitolo B, oppure, quando si è accertata la presenza di acido propionico, effettuare la GC descritta nel capitolo C. Paragonare i tempi di ritenzione ottenuti con quelli delle soluzioni di riferimento.

Combinare i risultati desunti dalla TLC e dalla HPLC o dalla GC e basare l'individuazione finale dei conservanti presenti nel campione sui risultati così ottenuti.

B. DOSAGGIO DELL'ACIDO BENZOICO, DELL'ACIDO 4-IDROSSIBENZOICO, DELL'ACIDO SORBICO E DELL'ACIDO SALICILICO

1. Principio

Ad avvenuta acidificazione, il campione viene estratto con una miscela di etanolo ed acqua. Dopo filtraggio, si dosano i conservanti mediante cromatografia in fase liquida ad alta risoluzione.

2. Reagenti

2.1. Tutti i reagenti devono essere della purezza richiesta per analisi e adatti all'HPLC, se del caso. Si dovrà impiegare acqua distillata, o acqua di purezza almeno equivalente.

2.2. Etanolo anidro.

2.3. Acido 4-idrossibenzoico.

- 2.4. Acido salicilico.
 - 2.5. Acido benzoico.
 - 2.6. Acido sorbico.
 - 2.7. Acetato di sodio ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$).
 - 2.8. Acido acetico, $d_4^{20} = 1,05$ g/ml.
 - 2.9. Acetonitrile.
 - 2.10. Acido solforico, 2M.
 - 2.11. Idrossido di potassio in soluzione acquosa, 0,2M.
 - 2.12. Acido 2-metossibenzoico.
 - 2.13. Miscela etanolo/acqua
Mescolare 9 volumi di etanolo (2.2) e 1 volume d'acqua (2.1).
 - 2.14. Soluzione standard interno
Preparare una soluzione contenente circa 1 g di acido 2-metossibenzoico (2.12) in 500 ml di miscela metanolo/acqua (2.13).
 - 2.15. Fase mobile per HPLC
 - 2.15.1. Soluzione tampone: sciogliere 6,35 g di acetato di sodio (2.7) e 20,0 ml di acido acetico (2.8) in 1 litro d'acqua e mescolare.
 - 2.15.2. Preparare la fase mobile mescolando 9 volumi della soluzione tampone di acetato (2.15.1) e 1 volume di acetonitrile (2.9).
 - 2.16. Soluzione madre di conservanti
Pesare con accuratezza circa 0,05 g di acido 4-idrossibenzoico (2.3), 0,2 g di acido salicilico (2.4), 0,2 g di acido benzoico (2.5) e 0,05 g di acido sorbico (2.6) in una provetta graduata da 50 ml e diluire a volume con la miscela etanolo/acqua (2.13). Porre la soluzione in frigorifero. La soluzione è stabile per una settimana.
 - 2.17. Soluzioni standard di conservanti
Prelevare dalla soluzione madre (2.16) rispettivamente: 8,00, 4,00, 2,00, 1,00 e 0,50 ml di liquido e trasferirli in provette graduate da 20 ml. Aggiungere 10,00 ml di soluzione di standard interno (2.14) e 0,5 ml di acido solforico 2M (2.10). Completare a volume con la miscela etanolo/acqua (2.13). Queste soluzioni devono essere preparate al momento.
3. **Apparecchiature**
Apparecchiature per uso normale di laboratorio, se non altrimenti specificato, e:
- 3.1. Bagno ad acqua, regolato a 60 °C.
 - 3.2. Cromatografo in fase liquida ad alta risoluzione, con rilevatore UV a lunghezza d'onda variabile e sistema di iniezione da 10- μl .
 - 3.3. Colonna per analisi
Acciaio inossidabile, lunghezza 12,5-25 cm, diametro interno 4,6 mm, riempita di Nucleosil 5 C18 o equivalente.
 - 3.4. Rilevatore
Filtro di carta, diametro: 90 mm, Schleicher & Schull, Weissband n. 5892, o equivalenti.
 - 3.5. Provette in vetro da 50 ml, con tappo a vite.

- 3.6. Flaconcini di vetro da 5 ml.
- 3.7. Granuli ebulloscopici di carborundum, dimensioni 2-4 mm o equivalenti.
4. **Procedimento**
- 4.1. Preparazione dei campioni
- 4.1.1. Preparazione dei campioni senza aggiunta di soluzione di standard interno
- Pesare 1 g del campione in una provetta di vetro da 50 ml con tappo a vite (3.5). Pipettare 1,00 ml di acido solforico 2M (2.10) e 40,0 ml di miscela etanolo/acqua (2.13) nella provetta. Aggiungere circa 1 g di granuli ebulloscopici (3.7), tappare la provetta e agitare vigorosamente per almeno un minuto, fino a quando si ottiene una sospensione omogenea. Per facilitare l'estrazione dei conservanti nella fase etanolica, porre la provetta per 5 minuti esatti in un bagno (3.1) di acqua a 60 °C.
- Raffreddare immediatamente la provetta sotto acqua corrente fredda e poi lasciare riposare l'estratto a 5 °C per un'ora.
- Filtrare l'estratto con un filtro di carta (3.4). Trasferire circa 2 ml di estratto in un flaconcino (3.6). Far riposare l'estratto a 5 °C ed eseguire il dosaggio mediante HPLC, entro 24 ore dalla preparazione del medesimo.
- 4.1.2. Preparazione del campione con aggiunta di soluzione standard di riferimento interno
- Pesare fino alla terza cifra decimale $1 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$ (a) del campione in una provetta di vetro da 50 ml con tappo a vite (3.5). Pipettare 1,00 ml di acido solforico 2M (2.10) e 30,0 ml di miscela etanolo/acqua (2.13). Aggiungere circa 1 g di granuli bollenti (3.7) e 10,00 ml di soluzione standard di riferimento interno (2.14). Tappare la provetta e agitare vigorosamente per almeno un minuto, fino ad ottenere una sospensione omogenea. Per facilitare l'estrazione dei conservanti nella fase etanolo, porre la provetta per 5 minuti esatti in bagno d'acqua (3.1) mantenuta a 60 °C.
- Raffreddare immediatamente la provetta sotto acqua corrente fredda e far riposare l'estratto a 5 °C per un'ora.
- Filtrare l'estratto su un filtro di carta (3.4). Trasferire circa 2 ml del filtrato così estratto in una fiala di campionatura (3.6). Far riposare l'estratto a 5 °C ed eseguire il dosaggio mediante HPLC entro 24 ore dalla preparazione.
- 4.2. Cromatografia in fase liquida ad alta risoluzione
- Fase mobile: soluzione tampone acetone/acetato (2.15).
- Regolare il flusso della fase mobile attraverso la colonna a 2,0 ml/minuto \pm 0,5 ml/minuto.
- Regolare la lunghezza d'onda del rivelatore a 240 nm.
- 4.2.1. Taratura
- Iniettare 10 μl di ciascuna delle soluzioni standard di conservanti (2.17) nel cromatografo in fase liquida (3.2). Per ciascuna soluzione, determinare i rapporti fra le altezze del picco dei conservanti sotto indagine e l'altezza del picco della soluzione standard di riferimento interno ottenuti dai cromatogrammi. Tracciare, per ciascun conservante, un grafico che esprima il rapporto tra la concentrazione di ciascuna soluzione standard.
- Assicurarsi che si sia ottenuta una risposta lineare per le soluzioni standard nella procedura di taratura.
- 4.2.2. Dosaggio
- Iniettare 10 μl dell'estratto dal campione (4.1.1) nel cromatografo a fase liquida (3.2) e registrare il cromatogramma. Iniettare 10 μl di soluzione standard di conservante (2.17) e registrare il cromatogramma. Paragonare i cromatogrammi ottenuti. Se nel cromatogramma dell'estratto del campione (4.1.1) non si notano picchi aventi approssimativamente lo stesso tempo di ritenzione dell'acido 2-metossibenzoico (standard di riferimento interno raccomandato), iniettare 10 μl di estratto di campione preparato con addizione di soluzione standard di riferimento interno (4.1.2) nel cromatografo in fase liquida e registrare il cromatogramma.
- Se si osserva un picco di interferenza nell'estratto dal campione (4.1.1) nel cromatogramma, avente lo stesso tempo di ritenzione dell'acido 2-metossibenzoico, si dovrà scegliere un'altra soluzione standard di riferimento interno più adatta. (Se si rileva l'assenza dal cromatogramma di uno dei conservanti sotto indagine, sarà possibile impiegare tale conservante come standard interno).
- Assicurarsi che i cromatogrammi ottenuti per una soluzione standard e per la soluzione campione soddisfino le seguenti esigenze:
- la separazione dei picchi della coppia meno ben separata deve essere pari ad almeno 0,90. (Per la definizione di separazione dei picchi, vedi figura 1).

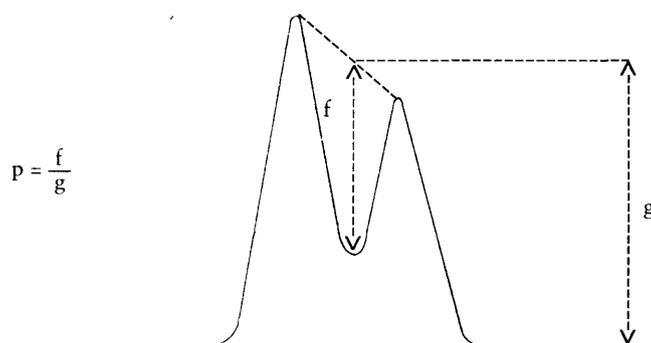


Figura 1: Separazione dei picchi

Se non si ottiene la separazione richiesta, impiegare una colonna più adatta, oppure mettere a punto la composizione della fase mobile fino a soddisfare questa esigenza.

- Il fattore di asimmetria di picco A_s di tutti i picchi ottenuti deve variare tra 0,9 e 1,5 (per la definizione di fattore di asimmetria di picco, vedi figura 2). Per registrare il cromatogramma al fine di determinare il fattore di asimmetria, si raccomanda una velocità della carta pari ad almeno 2 cm/minuto.

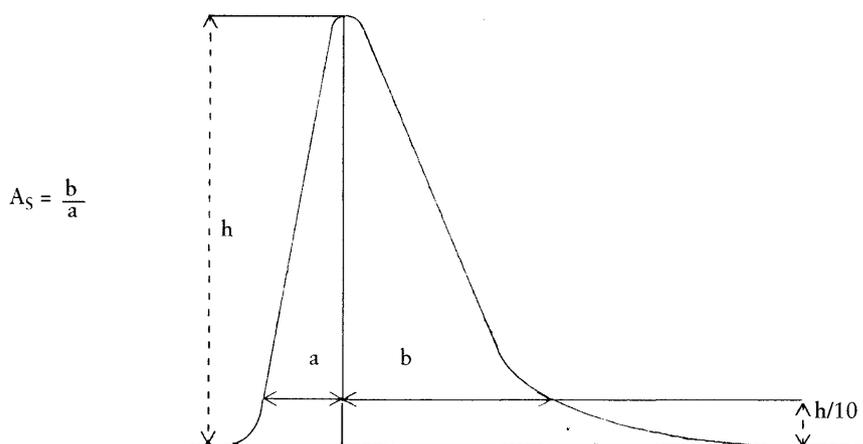


Figura 2: Fattore di asimmetria di picco

- Dovrà essere ottenuta una linea di base stabile.

5. Calcolo

Servirsi dei rapporti fra le altezze dei picchi dei conservanti in esame e l'altezza del picco per l'acido 2-metossibenzoico (standard interno) e del grafico di taratura per calcolare la concentrazione dei conservanti acidi nella soluzione campione. Calcolare il contenuto di acido benzoico, acido 4-idrossibenzoico, acido sorbico e acido salicilico nel campione, come percentuale rispetto alla massa (X_i), in base alla formula seguente:

$$x_i \% (m/m) = \frac{100 \cdot 20 \cdot b}{10^6 \cdot a} = \frac{b}{500 \cdot a}$$

dove

a = massa (g) impiegata per il test (4.1.2).

b = concentrazione ($\mu\text{g/ml}$) del conservante nell'estratto del campione (4.1.2) ottenuto dal grafico di taratura.

6. Ripetibilità ⁽¹⁾

Per un contenuto di acido 4-idrossibenzoico dello 0,40 %, la differenza fra i risultati di due dosaggi in parallelo eseguiti sullo stesso campione non deve superare un valore assoluto pari a 0,035 %.

Per un contenuto di acido benzoico dello 0,50 %, la differenza fra i risultati di due dosaggi eseguiti in parallelo sullo stesso campione non deve superare un valore assoluto pari a 0,050 %.

Per un contenuto di acido salicilico dello 0,50 %, la differenza fra i risultati di due dosaggi eseguiti in parallelo sullo stesso campione non deve superare un valore assoluto pari a 0,045 %.

Per un contenuto di acido sorbico dello 0,60 %, la differenza fra i risultati di due dosaggi eseguiti in parallelo sullo stesso campione non deve superare un valore assoluto pari a 0,035 %.

7. Osservazioni

7.1. I risultati di un ruggedness test eseguito in rapporto al metodo sopra descritto, hanno consentito di stabilire che il quantitativo di acido solforico aggiunto per estrarre gli acidi dal campione ha una importanza critica e che i limiti per il quantitativo di campione preso in esame devono essere mantenuti entro i valori prescritti.

7.2. Se lo si desidera, si potrà impiegare una opportuna precolonna.

C. DOSAGGIO DELL'ACIDO PROPIONICO**1. Oggetto e campo di applicazione**

Il metodo ha per oggetto il dosaggio dell'acido propionico, con una concentrazione massima del 2 % (m/m) nei cosmetici.

2. Definizione

La concentrazione dell'acido propionico, misurata con questo metodo, è espressa come percentuale rispetto alla massa (% m/m) del prodotto.

3. Principio

Dopo l'estrazione dell'acido propionico dal prodotto, si procede al dosaggio mediante gascromatografia, con l'impiego di acido 2-metilpropionico come standard di riferimento interno.

4. Reagenti

Tutti i reagenti devono avere il grado di purezza richiesto per analisi. Si dovrà impiegare acqua distillata, oppure acqua di purezza almeno equivalente.

4.1. Etanolo 96 % (v/v).

4.2. Acido propionico.

4.3. Acido 2-metilpropionico.

4.4. Acido ortofosforico, 10 % (m/v).

4.5. Soluzione di acido propionico

Pesare circa 1,00 g (p) di acido propionico in una provetta graduata da 50 ml e diluire a volume con etanolo (4.1).

4.6. Soluzione standard di riferimento interno

Pesare accuratamente 1,00 g (e) di acido 2-metilpropionico in una provetta graduata e diluire a volume con etanolo (4.1).

⁽¹⁾ ISO 5725.

5. Apparecchiature

- 5.1. Attrezzature per impiego normale di laboratorio, e:
- 5.2. Gascromatografo con rilevatore di ionizzazione di fiamma.
- 5.3. Provetta (20 × 150 mm) con tappo a vite.
- 5.4. Bagno ad acqua a 60 °C.
- 5.5. Siringa in vetro da 10 ml con filtro a membrana (diametro dei pori: 0,45 µm).

6. Procedimento**6.1. Preparazione del campione****6.1.1. Preparazione del campione senza standard interno**

Pesare circa 1 g di campione in una provetta (5.3). Aggiungere 0,5 ml di acido fosforico (4.4) e 9,5 ml di etanolo (4.1).

Tappare la provetta e agitare vigorosamente. Se necessario, porre la provetta in bagno d'acqua a 60 °C (5.4) per 5 minuti, in modo da sciogliere completamente la fase lipidica. Raffreddare rapidamente sotto acqua corrente. Filtrare parte della soluzione su un filtro a membrana (5.5).

Sottoporre a cromatografia il filtrato, nello stesso giorno.

6.1.2. Preparazione del campione con standard interno

Pesare alla terza cifra decimale 1 g ± 0,1 g (a grams) di campione in una provetta (5.3). Aggiungere 0,5 ml di acido fosforico (4.4), 0,50 ml di soluzione standard di riferimento interno (4.6) e 9 ml di etanolo (4.1).

Tappare la provetta e agitare vigorosamente. Se necessario, porre la provetta in bagno d'acqua a 60 °C (5.4) per 5 minuti, in modo da sciogliere adeguatamente la fase lipidica. Raffreddare rapidamente sotto acqua corrente. Filtrare parte della soluzione su un filtro a membrana (5.5).

Sottoporre a cromatografia il filtrato, nello stesso giorno.

6.2. Condizioni per la gascromatografia

Si raccomandano le seguenti condizioni operative:

Colonna

Tipo	acciaio inossidabile
Lunghezza	2 m
Diametro	1/8"
Riempimento	10% SP TM 1000 (o equivalenti) + 1% H ₃ PO ₄ su Chromosorb WAW 100-120 mesh

Temperatura

Iniettore	200 °C
Colonna	120 °C
Rilevatore	200 °C
Gas vettore:	Azoto
Intensità di flusso:	2,5 ml/min.

6.3. Cromatografia**6.3.1. Taratura**

In una serie di provette graduate da 20 ml, pipettare 0,25 — 0,50 — 1,00 — 2,00 e 4,00 ml di soluzione di acido propionico (4.5). Pipettare 1,0 ml di soluzione standard di riferimento interno (4.6) in ciascuna provetta. Diluire a volume con etanolo (4.1) e mescolare. Le soluzioni preparate in questo modo contengono e mg/ml di acido 2-metilpropionico come standard interno (cioè, 1 mg/ml se e = 1 000) e p/4, p/2, p, 2p, 4p mg/ml di acido propionico (cioè: 0,25 — 0,50 — 1,00 — 2,00 — 4,0 mg/ml se p = 1 000).

Iniettare 1 μ l di ciascuna di queste soluzioni e ottenere la curva di taratura tracciando il rapporto delle masse dell'acido propionico e dell'acido 2-metilpropionico sull'asse delle ascisse e il rapporto delle aree di picco corrispondenti sull'asse delle ordinate.

Eseguire 3 iniezioni di ciascuna soluzione e calcolare la media dei rapporti delle aree di picco.

6.3.2. Dosaggio

Iniettare 1 μ l di filtrato del campione 6.1.1. Paragonare il cromatogramma con quello di una delle soluzioni standard (6.3.1). Se un picco evidenzia approssimativamente lo stesso tempo di ritenzione dell'acido 2-metilpropionico, cambiare lo standard interno. Se non si osservano interferenze, iniettare 1 μ l del filtrato del campione 6.1.2 e misurare le aree di picco dell'acido propionico e della soluzione standard di riferimento interno.

Eseguire 3 iniezioni di ciascuna soluzione e calcolare la media dei rapporti delle aree di picco.

7. Calcolo

7.1. In base alla curva di taratura ottenuta secondo il metodo di cui al punto 6.3.1, desumere il rapporto della massa (K) corrispondente al rapporto delle aree dei picchi calcolate secondo il metodo di cui al punto 6.3.2.

7.2. In base al rapporto delle masse così ottenuto, calcolare il contenuto di acido propionico del campione (X) come percentuale rispetto alla massa, servendosi della formula seguente:

$$x \% (m/m) = K \frac{0,5 \cdot 100 \cdot e}{50 \cdot a} = K \frac{e}{a}$$

dove:

K = rapporto calcolato in 7.1

e = massa in grammi dello standard interno pesato secondo il metodo di cui al punto 4.6

a = massa in grammi del campione pesato secondo il metodo di cui al punto 6.1.2.

Arrotondare i risultati alla prima cifra decimale.

8. Ripetibilità ⁽¹⁾

Per un contenuto di acido propionico del 2 % (m/m), la differenza tra i risultati di due dosaggi in parallelo eseguiti sullo stesso campione non deve superare il valore assoluto di 0,12 %.

II. INDIVIDUAZIONE E DOSAGGIO DELL'IDROCHINONE, DELL'IDROCHINONE MONOMETILETERE, DELL'IDROCHINONE MONOETILETERE E DELL'IDROCHINONE MONOBENZILETERE NEI COSMETICI

A. INDIVIDUAZIONE

1. Oggetto e campo di applicazione

Questo metodo descrive l'individuazione e il dosaggio dell'idrochinone, dell'idrochinone monometil etero, dell'idrochinone monoetil etero e dell'idrochinone monobenzil etero (monobenzone) nei cosmetici destinati a schiarire la pelle.

2. Principio

L'idrochinone e i suoi eteri sono individuati mediante cromatografia su strato sottile (TLC).

3. Reagenti

Tutti i reagenti devono essere della purezza richiesta per analisi.

⁽¹⁾ ISO 5725.

- 3.1. Etanolo, 96 % (v/v).
- 3.2. Cloroformio.
- 3.3. Etere dietilico.
- 3.4. Solvente di sviluppo
Cloroformio/Etere dietilico, 66/33 (v/v).
- 3.5. Ammoniaca, 2,5 % (m/m) ($d_4^{20} = 0,91$ g/ml).
- 3.6. Acido ascorbico.
- 3.7. Idrochinone.
- 3.8. Idrochinone monometilere.
- 3.9. Idrochinone monoetilere.
- 3.10. Idrochinone monobenzilere (monobenzene).
- 3.11. Soluzioni di riferimento
Le seguenti soluzioni di riferimento devono essere preparate al momento e rimangono stabili per un giorno.
 - 3.11.1. Pesare 0,05 g di idrochinone (3.7) in una provetta graduata da 10 ml. Aggiungere 0,250 g di acido ascorbico (3.6) e 5 ml di etanolo (3.1). Aggiungere ammoniaca (3.5) fino a ottenere un pH pari a 10 e completare con etanolo (3.1) fino a ottenere un volume di 10 ml.
 - 3.11.2. Pesare 0,05 g di idrochinone monometilere (3.8) in una provetta graduata da 10 ml. Aggiungere 0,250 g di acido ascorbico (3.6) e 5 ml di etanolo (3.1). Aggiungere ammoniaca (3.5) fino a ottenere un pH pari a 10 e completare con etanolo (3.1) fino a ottenere un volume di 10 ml.
 - 3.11.3. Pesare 0,05 g di idrochinone monoetilere (3.9) in una provetta graduata da 10 ml. Aggiungere 0,250 g di acido ascorbico (3.6) e 5 ml di etanolo (3.1). Aggiungere ammoniaca (3.5) fino a ottenere un pH pari a 10 e completare con etanolo (3.1) fino a ottenere un volume di 10 ml.
 - 3.11.4. Pesare 0,05 g di idrochinone monobenzilere (3.10) in una provetta graduata da 10 ml. Aggiungere 0,250 g di acido ascorbico (3.6) e 5 ml di etanolo (3.1). Aggiungere ammoniaca (3.5) fino a ottenere un pH pari a 10 e completare con etanolo (3.1) fino a ottenere un volume di 10 ml.
- 3.12. Nitrato d'argento.
- 3.13. Acido 12-molibdofosforico.
- 3.14. Ferrocianuro di potassio esaidrato.
- 3.15. Cloruro ferrico, esaidrato.
- 3.16. Reagenti spray
 - 3.16.1. Aggiungere ad una soluzione acquosa al 5 % (m/v) di nitrato d'argento (3.12) ammoniaca (3.5) fino ad ottenere la solubilizzazione del precipitato
Attenzione: la soluzione ha carattere instabile ed è esplosiva, per cui deve essere eliminata dopo l'impiego.
 - 3.16.2. Soluzione al 10 % (m/v) di acido 12-molibdofosforico (3.13) in etanolo (3.1).

- 3.16.3 Preparare una soluzione acquosa all'1% (m/v) di ferrocianuro di potassio (3.14) e al 2% (m/v) di cloruro ferrico (3.15).

Mescolare parti uguali di entrambe le soluzioni immediatamente prima dell'impiego.

4. Apparecchiature

Materiale di impiego corrente in laboratorio e:

- 4.1. Attrezzature correnti per TLC.
- 4.2. Lastre per TLC pronte all'uso: silicagel GHR/UV₂₆₄; 20 cm × 20 cm (Machery, Nagel o equivalenti) strato 0,25 mm.
- 4.3. Bagno ad ultrasuoni.
- 4.4. Centrifuga.
- 4.5. Lampada UV, 254 nm.

5. Procedura

5.1. Preparazione del campione

Pesare 3,0 g di campione in una provetta graduata da 10 ml. Aggiungere 0,250 g di acido ascorbico (3.6) e 5 ml di etanolo (3.1). Portare la soluzione al pH 10, impiegando ammoniaca (3.5). Completare con etanolo (3.1) fino a ottenere un volume di 10 ml. Tappare la provetta e omogeneizzare in bagno ad ultrasuoni per 10 minuti. Filtrare su un filtro di carta o centrifugare a 3 000 giri minuto.

5.2. TLC

- 5.2.1. Riempire di solvente per sviluppo (3.4) una vaschetta per cromatografia.
- 5.2.2. Depositare su una lastra 4.2 2 µl delle soluzioni di riferimento (3.11) e 2 µl della soluzione campione (5.1). Sviluppare a temperatura ambiente al riparo dalla luce fino a quando il solvente migri a 15 cm dal punto di partenza.
- 5.2.3. Rimuovere la lastra e asciugare a temperatura ambiente.

5.3. Accertamento

- 5.3.1. Osservare la lastra sotto luce UV a 254 nm e contrassegnare la posizione delle macchie.
- 5.3.2. Spruzzare la lastra con
- reagente al nitrato d'argento (3.16.1), oppure
 - reagente 12-molibdofosforico (3.16.2); riscaldare a circa 120 °C, oppure
 - soluzione di ferrocianuro di potassio e soluzione di cloruro ferrico (3.16.3).

6. Individuazione

Calcolare il valore R_f per ciascuna macchia.

Paragonare le macchie ottenute per la soluzione campione con quelle delle soluzioni di riferimento in rapporto a: loro valori R_f; colore delle macchie sotto irraggiamento UV; colore delle macchie dopo visualizzazione con il reagente nebulizzato.

Eseguire l'HPLC secondo il metodo descritto nel capitolo seguente (B) e paragonare i tempi di ritenzione ottenuti per il (o i) picco (picchi) campione con quelli delle soluzioni di riferimento. Combinare i risultati della TLC e dell'HPLC per l'individuazione della presenza dell'idrochinone e/o dei suoi eteri.

7. Osservazioni

Nelle condizioni descritte, sono stati osservati i seguenti valori di R_f:

idrochinone:	0,32
idrochinone monometil etero:	0,53
idrochinone monoetil etero:	0,55
idrochinone monobenzil etero:	0,58.

B. DOSAGGIO

1. Oggetto e campo di applicazione

Il metodo descrive un procedimento di dosaggio dell'idrochinone, dell'idrochinone monometil etero, dell'idrochinone monoetil etero e dell'idrochinone monobenzil etero nei cosmetici destinati ad ammorbidire la pelle.

2. Principio

Il campione è estratto con una miscela acqua/metanolo, previo leggero riscaldamento in modo da fondere gli eventuali materiali lipidici esistenti. Il dosaggio degli analiti nella soluzione risultante è attuata mediante cromatografia in fase liquida inversa, con rilevamento UV.

3. Reagenti

3.1. Tutti i reagenti devono essere della purezza richiesta per analisi. Dovrà essere impiegata acqua distillata o acqua di purezza almeno equivalente.

3.2. Metanolo.

3.3. Idrochinone.

3.4. Idrochinone monometil etero.

3.5. Idrochinone monoetil etero.

3.6. Idrochinone monobenzil etero (monobenzone).

3.7. Tetraidrofurano, purezza per l'HPLC.

3.8. Miscela acqua/metanolo 1/1 (v/v). Mescolare un volume di acqua e un volume di metanolo (3.2).

3.9. Fase mobile: miscela tetraidrofurano/acqua 45/55 (v/v). Mescolare 45 volumi di tetraidrofurano (3.7) e 55 volumi d'acqua.

3.10. Soluzione di riferimento

Preparare 0,06 g di idrochinone (3.3), 0,08 g di idrochinone monometil etero (3.4), 0,10 g di idrochinone monoetil etero (3.5) e 0,12 g di idrochinone monobenzil etero (3.6) in una provetta da 50 ml. Far sciogliere e completare a volume con metanolo (3.2). Preparare la soluzione di riferimento diluendo 10,00 ml di questa soluzione a 50,00 ml con una miscela acqua/metanolo (3.8). Queste soluzioni devono essere preparate al momento.

4. Apparecchiature

Materiale di impiego corrente in laboratorio e:

4.1. Bagno ad acqua, con possibilità di mantenere una temperatura di 60 °C.

4.2. Cromatografo ad alta risoluzione in fase liquida, con rilevatore UV a lunghezza d'onda variabile e sistema di iniezione da 10 µl.

4.3. Colonna analitica

Colonna cromatografica in acciaio inossidabile, della lunghezza di 250 mm, con diametro interno di 4,6 mm, riempita di fenile Zorbax (fenetilsilano legato chimicamente su Zorbax SIL, con

l'estremità ricoperta di trimetilclorosilano), dimensioni delle particelle $6 \mu\text{m}$, o equivalente. Non impiegare una colonna di guardia, a meno che non sia riempita di fenile o sostanze equivalenti.

4.4. Carta da filtro, diametro 90 mm, Schleicher e Schull, Weissband n. 5892, o equivalenti.

5. Procedura

5.1. Preparazione del campione

Pesare con accuratezza fino alla terza cifra decimale $1 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$ (a) di campione in una beuta graduata da 50 ml. Disperdere il campione in 25 ml di miscela acqua/metanolo (3.8). Tappare la beuta e agitare vigorosamente fino ad ottenere una sospensione omogenea. Agitare per almeno un minuto. Porre la beuta graduata in un bagno ad acqua (4.1) mantenuto a 60°C per favorire l'estrazione. Raffreddare la beuta e completare a volume con acqua/metanolo (3.8), filtrare l'estratto impiegando un filtro di carta (4.4). Eseguire il dosaggio mediante HPLC entro 24 ore dalla preparazione dell'estratto.

5.2. Cromatografia ad alta risoluzione in fase liquida

5.2.1. Regolare il flusso della fase mobile (3.9) a 1,0 ml/min e regolare la lunghezza d'onda del rivelatore a 295 nm.

5.2.2. Iniettare $10 \mu\text{l}$ della soluzione campione ottenuta secondo il procedimento descritto al punto 5.1 e realizzarne il cromatogramma. Misurare le aree dei picchi. Eseguire la calibratura come descritto al punto 5.2.3. Paragonare i cromatogrammi ottenuti per le soluzioni campione e le soluzioni standard. Impiegare le aree dei picchi e i fattori di risposta (Rf) calcolati al paragrafo 5.2.3 per calcolare la concentrazione degli analiti nella soluzione campione.

5.2.3. Calibrazione

Iniettare $10 \mu\text{l}$ di soluzione di riferimento (3.10) e realizzarne il cromatogramma. Iniettare varie volte fino ad ottenere un'area del picco costante.

Determinare il fattore di Risposta RF_i

$$RF_i = \frac{P_i}{c_i}$$

in cui:

P_i = area di picco per l'idrochinone, l'idrochinone monometilere, l'idrochinone monoetilere o idrochinone monobenzilere.

C_i = concentrazione (g/50 ml) nella soluzione di riferimento (3.10) dell'idrochinone, dell'idrochinone monometilere, dell'idrochinone monoetilere e dell'idrochinone monobenzilere.

Accertarsi che i cromatogrammi ottenuti per una soluzione standard e per la soluzione campione soddisfino le seguenti esigenze:

— la separazione dei picchi della coppia meno ben separata deve essere pari ad almeno 0,90 (per la definizione di separazione dei picchi, vedi figura 1).

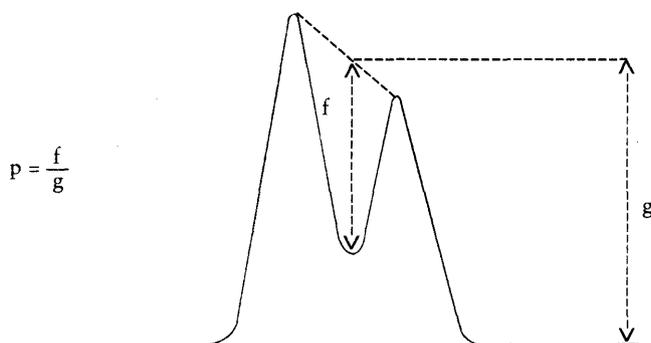


Figura 1: Separazione dei picchi

Se non si raggiunge la separazione richiesta, impiegare una colonna di maggiore efficienza, oppure mettere a punto la composizione della fase mobile fino a soddisfare tale esigenza.

- il fattore di asimmetria A_s di tutti i picchi ottenuti deve variare tra 0,9 e 1,5. (Per la definizione di fattore di asimmetria di picco, vedi figura 2). Per realizzare il cromatogramma al fine di determinare il fattore di asimmetria, si raccomanda una velocità della carta pari ad almeno 2 cm/minuto.

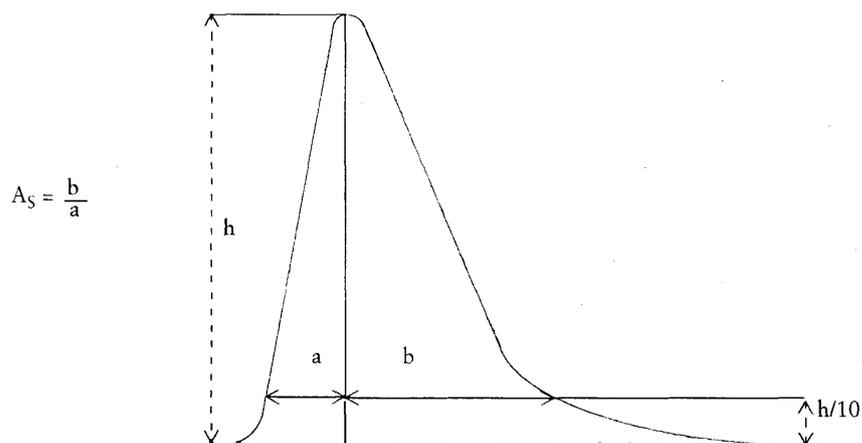


Figura 2: Fattore di asimmetria di picco

- Si deve ottenere una linea di base stabile.

6. Calcolo

Servirsi delle aree dei picchi relativi agli analiti per calcolare la/le concentrazione/i dell'/degli analita/i nel campione. Calcolare la concentrazione dell'analita nel campione, come percentuale rispetto alla massa (X_i), in base alla formula:

$$x_i \% (m/m) = \frac{b_i \cdot 100}{RF_i \cdot a}$$

in cui:

a = massa del campione in grammi

b_i = area di picco dell'analita nel campione.

7. Ripetibilità ⁽¹⁾

- 7.1. Per un contenuto di idrochinone del 2,0%, la differenza tra i risultati di due dosaggi eseguiti in parallelo sullo stesso campione non deve superare il valore assoluto di 0,13%.
- 7.2. Per un contenuto di idrochinone monometilere dell'1,0%, la differenza tra i risultati di due dosaggi eseguiti in parallelo sullo stesso campione non deve superare il valore assoluto di 0,1%.
- 7.3. Per un contenuto di idrochinone monoetilere dell'1,0%, la differenza tra i risultati di due dosaggi eseguiti in parallelo sullo stesso campione non deve superare il valore assoluto di 0,11%.
- 7.4. Per un contenuto di idrochinone monobenzilere dell'1,0%, la differenza tra i risultati di due dosaggi eseguiti in parallelo sullo stesso campione non deve superare il valore assoluto di 0,11%.

8. Riproducibilità ⁽¹⁾

- 8.1. Per un contenuto di idrochinone del 2,0%, la differenza tra i risultati di due dosaggi eseguiti sullo stesso campione in condizioni diverse (laboratori diversi, operatori diversi, apparecchiature e/o tempi diversi) non deve superare il valore assoluto di 0,37%.

⁽¹⁾ ISO 5725.

- 8.2. Per un contenuto di idrochinone monometilere dell'1,0%, la differenza tra i risultati di due dosaggi eseguiti sullo stesso campione in condizioni diverse (laboratori diversi, operatori diversi, apparecchiature e/o tempi diversi) non deve superare il valore assoluto di 0,21%.
- 8.3. Per un contenuto di idrochinone monoetilere dell'1,0%, la differenza tra i risultati di due dosaggi eseguiti sullo stesso campione in condizioni diverse (laboratori diversi, operatori diversi, apparecchiature e/o tempi diversi) non deve superare il valore assoluto di 0,19%.
- 8.4. Per un contenuto di idrochinone monobenzilere dell'1,0%, la differenza tra i risultati di due dosaggi eseguiti sullo stesso campione in condizioni diverse (laboratori diversi, operatori diversi, apparecchiature e/o tempi diversi) non deve superare il valore assoluto di 0,11%.

9. Osservazioni

- 9.1. Quando si trova un contenuto di idrochinone considerevolmente superiore al 2% ed è richiesta una valutazione accurata dei contenuti, l'estratto del campione (5.1) deve essere diluito ad una concentrazione simile a quella che si otterrebbe da un campione contenente il 2% di idrochinone e si deve poi procedere a ripetere il dosaggio.

(In alcuni strumenti, l'assorbenza può essere al di fuori della gamma lineare del rilevatore in caso di elevate concentrazioni di idrochinone).

9.2. Interferenze

Il metodo sopra descritto consente il dosaggio dell'idrochinone e dei suoi eteri attraverso un sistema univoco. L'impiego della colonna al fenile garantisce una ritenzione sufficiente dell'idrochinone, che non può invece essere attuata qualora si impieghi una colonna C18 con la fase mobile descritta.

Questo metodo è però soggetto a varie interferenze. In tali casi, il dosaggio deve essere ripetuto impiegando un sistema diverso fase mobile/fase fissa, specificato nei riferimenti di cui alle note 1 e 2, cioè:

Colonna: Zorbax ODS, 4,6 mm × 25 cm, o equivalente

Temperatura: 36 °C

Flusso: 1,5 ml/min

Fase mobile: per l'idrochinone: metanolo/acqua 5/95 (V/V)
per l'idrochinone monometilere: metanolo/acqua 30/70 (V/V)
per l'idrochinone monobenzilere: metanolo/acqua 80/20 (V/V) ⁽¹⁾.

Colonna: Spherisorb S5-ODS, o equivalenti

Fase mobile: acqua/metanolo (90/10 V/V)

Flusso: 1,5 ml/min

Queste condizioni sono adatte all'idrochinone ⁽²⁾.

⁽¹⁾ M. Herpol-Borremans et M.-O. Masse, Identification et dosage de l'hydroquinone et des ses éthers méthylique et benzylique dans les produits cosmétiques pour blanchir la peau. Int. j. Cosmet. Sci. 8 203-214 (1986).

⁽²⁾ J. Firth and I. Rix, Determination of Hydroquinone in skin toning creams, Analyst (1986), 111, pag. 129.