

Gazzetta ufficiale

delle Comunità europee

ISSN 0378-7028

L 178

38° anno

28 luglio 1995

Edizione
in lingua italiana

Legislazione

Sommario

I *Atti per i quali la pubblicazione è una condizione di applicabilità*

- ★ **Direttiva 95/31/CE della Commissione, del 5 luglio 1995, che stabilisce i requisiti di purezza specifici per gli edulcoranti per uso alimentare** 1
- ★ **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** 20

2

IT

Gli atti i cui titoli sono stampati in caratteri chiari appartengono alla gestione corrente. Essi sono adottati nel quadro della politica agricola ed hanno generalmente una durata di validità limitata.

I titoli degli altri atti sono stampati in grassetto e preceduti da un asterisco.

Spedizione in abbonamento postale gruppo I / 70 % — Milano.

I

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

DIRETTIVA 95/31/CE DELLA COMMISSIONE

del 5 luglio 1995

che stabilisce i requisiti di purezza specifici per gli edulcoranti per uso alimentare

(Testo rilevante ai fini del SEE)

LA COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE,

visto il trattato che istituisce la Comunità europea,

vista la direttiva 89/107/CEE del Consiglio, del 21 dicembre 1988, relativa al ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri concernenti gli additivi autorizzati nei prodotti alimentari destinati al consumo umano ⁽¹⁾, modificata dalla direttiva 94/34/CE ⁽²⁾, in particolare l'articolo 3, paragrafo 3, lettera a),

sentito il comitato scientifico per l'alimentazione umana;

considerando che occorre stabilire requisiti di purezza per tutti gli edulcoranti citati nella direttiva 94/35/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 30 giugno 1994, sugli edulcoranti destinati ad essere utilizzati nei prodotti alimentari ⁽³⁾;

considerando che occorre prendere in considerazione le caratteristiche degli edulcoranti definite nel Codex Alimentarius, nonché il parere del comitato misto di esperti FAO/OMS per gli additivi alimentari (JECFA);

considerando che gli additivi alimentari, preparati con metodi o materiali significativamente diversi da quelli previsti nella valutazione originale del comitato scientifico per l'alimentazione o differenti da quelli menzionati nella presente direttiva, devono essere sottoposti al giudizio del comitato scientifico per l'alimentazione che ne effettua una valutazione completa facendo particolare attenzione ai requisiti di purezza;

considerando che le misure previste dalla presente direttiva sono conformi al parere del comitato permanente per i prodotti alimentari,

HA ADOTTATO LA PRESENTE DIRETTIVA:

Articolo 1

1. I requisiti di purezza menzionati all'articolo 3, paragrafo 3, lettera a) della direttiva 89/107/CEE relativi agli edulcoranti di cui alla direttiva 94/35/CE, sono specificati nell'allegato.

2. I requisiti di purezza per le sostanze E 420 (i), E 420 (ii) e E 421 stabiliti nell'allegato della presente direttiva prevalgono sui requisiti di purezza stabiliti per le sostanze nell'allegato della direttiva 78/663/CEE del Consiglio ⁽⁴⁾.

Articolo 2

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

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

⁽¹⁾ GU n. L 40 dell'11. 2. 1989, pag. 27.

⁽²⁾ GU n. L 237 del 10. 9. 1994, pag. 1.

⁽³⁾ GU n. L 237 del 10. 9. 1994, pag. 3.

⁽⁴⁾ GU n. L 223 del 14. 8. 1978, pag. 7.

2. I prodotti immessi sul mercato o etichettati prima di tale data e non conformi alla presente direttiva, possono tuttavia essere venduti fino ad esaurimento delle scorte.

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 5 luglio 1995.

Per la Commissione

Martin BANGEMANN

Membro della Commissione

ALLEGATO

E 420 (i) — SORBITOLO

Sinonimi	D-glucitolo, D-sorbitolo
Definizione	
<i>Denominazione chimica</i>	D-glucitolo
<i>Einecs</i>	200-061-5
<i>Numero E</i>	E 420 (i)
<i>Formula chimica</i>	$C_6H_{14}O_6$
<i>Peso molecolare</i>	182,17
<i>Tenore</i>	Il D-glucitolo contiene non meno del 97% di glicitoli totali e non meno del 91% di D-sorbitolo, riferiti in ambedue i casi al peso secco. I glicitoli sono composti aventi formula di struttura $CH_2OH-(CHOH)_n-CH_2OH$, nella quale «n» rappresenta un numero intero.
Descrizione	Polvere bianca igroscopica, cristallina, scaglie o granuli aventi sapore dolce.
Identificazione	
A. <i>Solubilità</i>	Molto solubile in acqua; scarsamente solubile in etanolo.
B. <i>Intervallo di fusione</i>	88 °C-102 °C.
C. <i>Derivato monobenzilidenico del sorbitolo</i>	A 5 grammi di campione aggiungere 7 ml di metanolo, 1 ml di benzaldeide e 1 ml di acido cloridrico. Mescolare ed agitare con un agitatore meccanico fino all'apparizione di cristalli. Filtrare sotto vuoto, sciogliere i cristalli in 20 ml di acqua bollente contenente 1 g di bicarbonato di sodio, filtrare a caldo, raffreddare il filtrato, filtrare sotto vuoto, lavare con 5 ml di una miscela metanolo-acqua (1 a 2) ed essiccare all'aria. I cristalli così ottenuti fondono fra 173 °C e 179 °C.
Purezza	
<i>Acqua</i>	Non oltre l'1% (Metodo Karl Fischer)
<i>Ceneri solfatate</i>	Non oltre lo 0,1% sulla sostanza secca
<i>Zuccheri riducenti</i>	Non oltre lo 0,3% espressi in glucosio sulla sostanza secca
<i>Zuccheri totali</i>	Non oltre l'1% espressi in glucosio sulla sostanza secca
<i>Cloruri</i>	Non oltre 50 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Solfati</i>	Non oltre 100 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Nickel</i>	Non oltre 2 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Arsenico</i>	Non oltre 3 mg/kg sulla sostanza secca

<i>Piombo</i>	Non oltre 1 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Metalli pesanti</i>	Non oltre 10 mg/kg espressi in Pb sulla sostanza secca
E 420 (ii) — SCIROPPO DI SORBITOLO	
Sinonimi	Sciroppo di D-glucitolo
Definizione	
<i>Denominazione chimica</i>	Lo sciroppo di sorbitolo, preparato per idrogenazione dello sciroppo di glucosio è costituito da D-sorbitolo, D-mannitolo e da saccaridi idrogenati. La frazione non costituita da D-sorbitolo consiste essenzialmente in oligosaccaridi prodotti per idrogenazione dello sciroppo di glucosio usato come materia prima (in questo caso lo sciroppo non è cristallizzabile), o in mannitolo. Possono essere presenti piccole quantità di glicitoli nei quali $n \leq 4$. I glicitoli sono composti rispondenti alla formula di struttura: $\text{CH}_2\text{OH}-(\text{CHOH})_n-\text{CH}_2\text{OH}$, nella quale n rappresenta un numero intero.
<i>Einecs</i>	270-337-8
<i>Numero E</i>	E 420 (ii)
<i>Tenore</i>	Non meno del 69% di solidi totali e non meno del 50% di D-sorbitolo calcolato sulla sostanza secca.
Descrizione	Soluzione acquosa chiara, incolore e di sapore dolce.
Identificazione	
<i>A. Solubilità</i>	Miscibile con acqua, glicerolo e con propano-1,2-diolo.
<i>B. Derivato monobenzilidenico del sorbitolo</i>	A 5 g del campione aggiungere 7 ml di metanolo, 1 ml di benzaldeide e 1 ml di acido cloridrico. Mescolare e agitare con un agitatore meccanico fino all'apparizione di cristalli. Filtrare sotto vuoto, sciogliere i cristalli in 20 ml di acqua bollente contenente 1 g di bicarbonato di sodio e filtrare a caldo. Raffreddare il filtrato, filtrare sotto vuoto, lavare con 5 ml di miscela metanolo-acqua (1 a 2) ed essiccare all'aria. I cristalli così ottenuti fondono tra 173 °C e 179 °C.
Purezza	
<i>Acqua</i>	Non oltre il 31% (Metodo Karl Fischer)
<i>Ceneri solfatate</i>	Non oltre lo 0,1% sulla sostanza secca
<i>Zuccheri riducenti</i>	Non oltre lo 0,3% espressi in glucosio sulla sostanza secca
<i>Cloruri</i>	Non oltre 50 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Solfati</i>	Non oltre 100 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Nickel</i>	Non oltre 2 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Arsenico</i>	Non oltre 3 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Piombo</i>	Non oltre 1 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Metalli pesanti</i>	Non oltre 10 mg/kg espressi in Pb sulla sostanza secca

E 421 — MANNITOLO

Sinonimi	D-mannitolo
Definizione	
<i>Denominazione chimica</i>	D-mannitolo
<i>Einecs</i>	200-711-8
<i>Numero E</i>	E 421
<i>Formula chimica</i>	$C_6H_{14}O_6$
<i>Peso molecolare</i>	182,2
<i>Tenore</i>	Non meno del 96 % di D-mannitolo sulla sostanza secca.
Descrizione	Polvere di sapore dolce, bianca, cristallina, inodore.
Identificazione	
A. <i>Solubilità</i>	Solubile in acqua, scarsamente solubile in etanolo, praticamente insolubile in cloroformio ed etere.
B. <i>Intervallo di fusione</i>	165 °C-169 °C, ad una temperatura più bassa inizia il rammollimento.
Purezza	
<i>Perdita all'essiccazione</i>	Non oltre lo 0,3 % (4 ore a 105 °C)
<i>pH</i>	Tra 5 e 8 Misurare il pH dopo aver aggiunto a 10 ml di una soluzione al 10 % p/v del campione, 0,5 ml di una soluzione satura di cloruro di potassio.
<i>Potere rotatorio specifico</i>	α_D^{20} misurato in una soluzione contenente borato: non meno di +23° e non più di +25° calcolato riferendosi alla sostanza anidra.
<i>Ceneri solfatate</i>	Non oltre lo 0,1 % sulla sostanza secca
<i>Zuccheri riducenti</i>	Non oltre lo 0,3 % espressi in glucosio, sulla sostanza secca
<i>Zuccheri totali</i>	Non oltre l'1,0 % espressi in glucosio, sulla sostanza secca
<i>Cloruri</i>	Non oltre 70 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Solfati</i>	Non oltre 100 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Nickel</i>	Non oltre 2 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Arsenico</i>	Non oltre 3 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Piombo</i>	Non oltre 1 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Metalli pesanti</i>	Non oltre 10 mg/kg espressi in Pb sulla sostanza secca

E 953 — ISOMALTO

Sinonimi	Isomaltulosio idrogenato, palatinosio idrogenato
Definizione	
<i>Denominazione chimica</i>	L'isomalto è una miscela di: D-glucopiranosil-1,6-D-glucitolo e di D-glucopiranosil-1,1-D-mannitolo diidrato
<i>Einecs</i>	
<i>Numero E</i>	E 953
<i>Formula chimica</i>	D-glucopiranosil-1,6-D-glucitolo: $C_{12}H_{24}O_{11}$ D-glucopiranosil-1,1-D-mannitolodiidrato: $C_{12}H_{24}O_{11} \cdot 2H_2O$
<i>Peso molecolare</i>	D-glucopiranosil-1,6-D-glucitolo: 344,32 D-glucopiranosil-1,1-D-mannitolodiidrato: 380,32
<i>Tenore</i>	Non meno del 95 % della miscela di D-glucopiranosil-1,6-D-glucitolo e di D-glucopiranosil-1,1-D-mannitolodiidrato determinato sulla sostanza secca
Descrizione	Sostanza bianca, cristallina, inodore, di sapore dolce, leggermente igroscopica
Identificazione	
<i>A. Solubilità</i>	Poco solubile in acqua, insolubile in etanolo
<i>B. Potere rotatorio specifico</i>	$(\alpha)_D^{20}$: tra +90° e 92° (soluzione al 4 % p/v)
<i>C. Intervallo di fusione</i>	145 °C-150 °C
Purezza	
<i>Acqua</i>	Non oltre il 7 % (Metodo Karl Fischer)
<i>Ceneri solfatate</i>	Non oltre lo 0,05 % sulla sostanza secca
<i>Zuccheri riducenti</i>	Non oltre l'1,5 % espressi in glucosio sulla sostanza secca
<i>Nickel</i>	Non oltre 2 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Arsenico</i>	Non oltre 3 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Piombo</i>	Non oltre 1 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Metalli pesanti</i>	Non oltre 10 mg/kg espressi in Pb sulla sostanza secca

E 965 (i) — MALTITOLO

Sinonimi	D-maltitolo, maltosio idrogenato
Definizione	
<i>Denominazione chimica</i>	(α)-D-glucopiranosil-1,4-D-glucitolo

<i>Einecs</i>	209-567-0
<i>Numero E</i>	E 965 (i)
<i>Formula chimica</i>	$C_{12}H_{24}O_{11}$
<i>Peso molecolare</i>	344,31
<i>Tenore</i>	Non meno del 98 % di D-maltitolo $C_{12}H_{24}O_{11}$ calcolato sulla sostanza secca.
Descrizione	Polvere bianca cristallina, di sapore dolce.
Identificazione	
A. <i>Solubilità</i>	Molto solubile in acqua, poco solubile in etanolo.
B. <i>Intervallo di fusione</i>	148 °C-151 °C.
C. <i>Potere rotatorio specifico</i>	$(\alpha)_D^{20}$ = da +105,5° a +108,5° (soluzione 5 % peso/volume).
Purezza	
<i>Acqua</i>	Non oltre l'1 % (Metodo Karl Fischer)
<i>Ceneri solfatate</i>	Non oltre lo 0,1 % sulla sostanza secca
<i>Zuccheri riducenti</i>	Non oltre lo 0,1 % espressi in glucosio sulla sostanza secca
<i>Cloruri</i>	Non oltre 50 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Solfati</i>	Non oltre 100 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Nickel</i>	Non oltre 2 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Arsenico</i>	Non oltre 3 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Piombo</i>	Non oltre 1 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Metalli pesanti</i>	Non oltre 10 mg/kg espressi in Pb sulla sostanza secca
E 965 (ii) — SCIROPPO DI MALTITOLO	
Sinonimi	Sciroppo di maltosio-glucosio idrogenato di ottima qualità, sciroppo di glucosio idrogenato
Definizione	
<i>Denominazione chimica</i>	Consiste essenzialmente in una miscela di maltitolo, sorbitolo e oligo- e poli-saccaridi idrogenati. È preparato mediante idrogenazione catalitica dello sciroppo di glucosio ad elevato tenore di maltosio. Il prodotto in commercio è fornito sia come sciroppo che come prodotto solido.
<i>Einecs</i>	270-337-8

Numero E	E 965 (ii)
Tenore	I seguenti tenori vanno intesi sulla sostanza secca:
	Maltitolo non meno del 50 %
	Sorbitolo non oltre l'8 %
	Maltotriitolo non oltre il 25 %
	Polisaccaridi idrogenati contenenti più di tre unità di glucosio o di glucitolo non oltre il 30 %
Descrizione	Liquidi viscosi, chiari, di sapore dolce, incolori e inodori o masse cristalline bianche, di sapore dolce.
Identificazione	
<i>A. Solubilità</i>	Molto solubile in acqua, poco solubile in etanolo.
<i>B. Cromatografia su strato sottile</i>	Analizzare utilizzando una lastra ricoperta con uno strato di 0,25 mm di gel di silice per cromatografia.
Purezza	
<i>Acqua</i>	Non oltre il 31 % (Metodo Karl Fischer)
<i>Ceneri solfatate</i>	Non oltre lo 0,1 % sulla sostanza secca
<i>Zuccheri riducenti</i>	Non oltre lo 0,3 % espressi in glucosio sulla sostanza secca
<i>Cloruri</i>	Non oltre 50 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Solfati</i>	Non oltre 100 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Nickel</i>	Non oltre 2 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Arsenico</i>	Non oltre 3 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Piombo</i>	Non oltre 1 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Metalli pesanti</i>	Non oltre 10 mg/kg espressi in Pb sulla sostanza secca

E 966 — LACTITOLO

Sinonimi	Lactite, lactositolio, lactobiosite
Definizione	
<i>Denominazione chimica</i>	4-O-β-D-galattopiranosil-D-glucitolo
<i>Einecs</i>	209-566-5
Numero E	E 966
<i>Formula chimica</i>	C ₁₂ H ₂₄ O ₁₁
<i>Peso molecolare</i>	344,32
Tenore	Non meno del 95 % sulla sostanza secca.

Descrizione	Polvere cristallina di sapore dolce, o soluzione incolore. Esistono prodotti cristallini nelle forme anidra, monoidrata e diidrata.
Identificazione	
A. <i>Solubilità</i>	Molto solubile in acqua.
B. <i>Potere rotatorio specifico</i>	$(\alpha)_D^{25}$ = da +13° a +16° calcolato sulla sostanza secca (soluzione acquosa al 10 % peso/volume).
Purezza	
<i>Acqua</i>	Prodotti cristallini; non oltre il 10,5 % (metodo Karl Fischer)
<i>Altri polioli</i>	Non oltre il 2,5 % sulla sostanza secca
<i>Zuccheri riducenti</i>	Non oltre lo 0,2 % espressi in glucosio sulla sostanza secca
<i>Cloruri</i>	Non oltre 100 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Solfati</i>	Non oltre 200 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Ceneri solfatate</i>	Non oltre lo 0,1 % sulla sostanza secca
<i>Nickel</i>	Non oltre 2 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Arsenico</i>	Non oltre 3 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Piombo</i>	Non oltre 1 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Metalli pesanti</i>	Non oltre 10 mg/kg espressi in Pb sulla sostanza secca

E 967 — XILITOLO

Sinonimi	Xilitolo
Definizione	
<i>Denominazione chimica</i>	D-xilitolo
<i>Einecs</i>	201-788-0
<i>Numero E</i>	E 967
<i>Formula chimica</i>	$C_5H_{12}O_5$
<i>Peso molecolare</i>	152,15
<i>Tenore</i>	Non meno del 98,5 % espresso in xilitolo sulla sostanza secca.
Descrizione	Polvere bianca cristallina, praticamente inodore, di sapore molto dolce.
Identificazione	
A. <i>Solubilità</i>	Molto solubile in acqua, scarsamente solubile in etanolo.
B. <i>Intervallo di fusione</i>	92 °C-96 °C.
C. <i>pH</i>	5,0-7,0 (soluzione acquosa al 10 % peso/volume).

Purezza

<i>Perdita all'essiccazione</i>	Non oltre lo 0,5%. Essiccare 0,5 g di campione sottovuoto su fosforo a 60 °C per 4 ore
<i>Ceneri solfatate</i>	Non oltre lo 0,1% sulla sostanza secca
<i>Zuccheri riducenti</i>	Non oltre lo 0,2% espressi in glucosio sulla sostanza secca
<i>Cloruri</i>	Non oltre 100 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Solfati</i>	Non oltre 200 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Altri alcoli poliidrici</i>	Non oltre l'1% sulla sostanza secca
<i>Nickel</i>	Non oltre 2 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Arsenico</i>	Non oltre 3 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Piombo</i>	Non oltre 1 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Metalli pesanti</i>	Non oltre 10 mg/kg espressi in Pb sulla sostanza secca

E 950 — ACESULFAME K**Sinonimi**

Acesulfame di potassio, Acesulfame, Sale di potassio del 3,4-diidro-6-metil-1,2,3-ossatiazin-4-one-2,2-diossido

Definizione

<i>Denominazione chimica</i>	Sale di potassio del 6-metil-1,2,3-ossatiazin-4(3H)-one-2,2-diossido
<i>Einecs</i>	259-715-3
<i>Numero E</i>	E 950
<i>Formula chimica</i>	$C_4H_4NO_4SK$
<i>Peso molecolare</i>	201,24
<i>Tenore</i>	Non meno del 99% in $C_4H_4NO_4SK$ sulla sostanza secca

Descrizione

Polvere bianca cristallina, inodore, con sapore spiccatamente dolce. Potere dolcificante all'incirca 200 volte superiore a quello del saccarosio

Identificazione

A. <i>Solubilità</i>	Molto solubile in acqua, scarsamente solubile in etanolo.
B. <i>Assorbimento all'ultravioletto</i>	Massimo a 227 ± 2 nm con una soluzione di 10 mg in 1 000 ml di acqua.

Purezza

<i>Perdita all'essiccazione</i>	Non oltre l'1% (2 ore a 105 °C)
---------------------------------	---------------------------------

<i>Arsenico</i>	Non oltre 3 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Selenio</i>	Non oltre 30 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Fluoruri</i>	Non oltre 3 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Piombo</i>	Non oltre 1 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Metalli pesanti</i>	Non oltre 10 mg/kg espressi in Pb sulla sostanza secca
E 951 — ASPARTAME	
Sinonimi	Metil-estere dell'aspartil-fenilalanina
Definizione	
<i>Denominazione chimica</i>	Metil-estere della N-L- α -aspartil-L-fenilalanina-1, N-metil-estere dell'acido 3-ammino-N-(α -carbometossi-fenil)-succinamico.
<i>Einecs</i>	245-261-3
<i>Numero E</i>	E 951
<i>Formula chimica</i>	$C_{14}H_{18}N_2O_5$
<i>Peso molecolare</i>	294,31
<i>Tenore</i>	Non meno del 98 % e non oltre il 102 % in $C_{14}H_{18}N_2O_5$ sulla sostanza secca.
Descrizione	Polvere bianca cristallina, inodore, di sapore dolce. Potere dolcificante circa 200 volte superiore a quello del saccarosio.
Identificazione	
<i>Solubilità</i>	Poco solubile in acqua ed in etanolo.
Purezza	
<i>Perdita all'essiccazione</i>	Non oltre il 4,5 % (4 ore a 105 °C)
<i>Ceneri solfatate</i>	Non oltre lo 0,2 % sulla sostanza secca
<i>pH</i>	Tra 4,5 e 6,0 (soluzione 1 a 125)
<i>Trasmittanza</i>	La trasmittanza di una soluzione all'1 % in acido cloridrico 2 N, determinata in una cella ottica di 1 cm a 430 nm con uno spettrofotometro adeguato, utilizzando acido cloridrico 2 N nella cella di riferimento, non deve essere inferiore a 0,95, equivalente ad un'assorbanza di non oltre 0,022 all'incirca.
<i>Potere rotatorio specifico</i>	$(\alpha)_{D}^{20}$: da + 14,5° a + 16,5°. Determinata alla concentrazione del 4 % in acido formico 15 N, entro 30 minuti dalla preparazione del campione.
<i>Arsenico</i>	Non oltre 3 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Piombo</i>	Non oltre 1 mg/kg sulla sostanza secca

<i>Metalli pesanti</i>	Non oltre 10 mg/kg espressi in Pb sulla sostanza secca
<i>acido 5-Benzil-3,6-diosso-2-i-perazinace-tico</i>	Non oltre l'1,5% sulla sostanza secca

E 952 — ACIDO CICLAMICO E SUOI SALI DI Na E Ca

I) ACIDO CICLAMICO

Sinonimi	Acido cicloesilsulfammico, ciclammato
Definizione	
<i>Denominazione chimica</i>	Acido cicloesansulfammico, acido cicloesilamminosolfonico
<i>Einecs</i>	202-898-1
<i>Numero E</i>	E 952
<i>Formula chimica</i>	$C_6H_{13}NO_3S$
<i>Peso molecolare</i>	179,24
<i>Tenore</i>	L'acido cicloesilsulfammico contiene non meno del 98% e non più del 102% di $C_6H_{13}NO_3S$, calcolato sulla sostanza secca.
Descrizione	Polvere bianca cristallina, praticamente incolore e di sapore agrodolce. Potere dolcificante circa 40 volte superiore a quello del saccarosio.
Identificazione	
A. <i>Solubilità</i>	Solubile in acqua ed in etanolo.
B. <i>Test di precipitazione</i>	Acidificare con acido cloridrico una soluzione al 2%, aggiungere 1 ml di una soluzione di cloruro di bario in acqua all'incirca 1 molare, filtrare nel caso la soluzione sia torbida o si formi un precipitato. Aggiungere alla soluzione limpida 1 ml di una soluzione di nitrito di sodio al 10%, si forma un precipitato bianco.
Purezza	
<i>Perdita all'essiccazione</i>	Non oltre l'1% (1 ora a 105 °C)
<i>Selenio</i>	Non oltre 30 mg/kg espressi in selenio sulla sostanza secca
<i>Piombo</i>	Non oltre 1 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Metalli pesanti</i>	Non oltre 10 mg/kg espressi in Pb sulla sostanza secca
<i>Arsenico</i>	Non oltre 3 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Cicloesilammina</i>	Non oltre 10 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Dicicloesilammina</i>	Non oltre 1 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Anilina</i>	Non oltre 1 mg/kg sulla sostanza secca

224
225II) *CICLAMMATO DI SODIO*

227	Sinonimi	Ciclammato, sale sodico dell'acido ciclamico
229	Definizione	
230	<i>Denominazione chimica</i>	Cicloesansolfammato di sodio, cicloesilsolfammato di sodio
232	<i>Einecs</i>	205-348-9
234	<i>Numero E</i>	E 952
236	<i>Formule chimiche</i>	$C_6H_{12}NNaO_3S$ e la forma diidrata $C_6H_{12}NNaO_3S \cdot 2H_2O$
238	<i>Peso molecolare</i>	201,22 calcolato sulla forma anidra
240		237,22 calcolato sulla forma idrata
241	<i>Tenore</i>	Non meno del 98 % e non più del 102 % sulla sostanza secca, forma diidrata: non meno dell'84 % sulla sostanza secca.
243		
244	Descrizione	Cristalli bianchi, inodori o polvere cristallina avente un potere dolcificante circa 30 volte superiore a quello del saccarosio.
246		
247	Identificazione	
248	<i>Solubilità</i>	Solubile in acqua, praticamente insolubile in etanolo.
250	Purezza	
251	<i>Perdita all'essiccazione</i>	Non oltre 1 % (1 ora a 105 °C)
253		Non oltre 15,2 % (2 ore a 105 °C) per la forma diidrata
254	<i>Selenio</i>	Non oltre 30 mg/kg espressi in selenio sulla sostanza secca
256	<i>Arsenico</i>	Non oltre 3 mg/kg sulla sostanza secca
258	<i>Piombo</i>	Non oltre 1 mg/kg sulla sostanza secca
260	<i>Metalli pesanti</i>	Non oltre 10 mg/kg espressi in Pb sulla sostanza secca
262	<i>Cicloesil-ammina</i>	Non oltre 10 mg/kg sulla sostanza secca
264	<i>Dicicloesil-ammina</i>	Non oltre 1 mg/kg sulla sostanza secca
266	<i>Anilina</i>	Non oltre 1 mg/kg sulla sostanza secca
268	III) <i>CICLAMMATO DI CALCIO</i>	
270	Sinonimi	Ciclammato, sale di calcio dell'acido ciclamico
272	Definizione	
273	<i>Denominazione chimica</i>	Cicloesansolfammato di calcio, cicloesilsolfammato di calcio
275	<i>Einecs</i>	205-349-4
277	<i>Numero E</i>	E 952
279	<i>Formula chimica</i>	$C_{12}H_{24}CaN_2O_6S_2 \cdot 2H_2O$

<i>Peso molecolare</i>	432,57
<i>Tenore</i>	Non meno del 98 % e non più del 101 % sulla sostanza secca.
Descrizione	Cristalli bianchi, incolori o polvere cristallina; potere dolcificante circa 30 volte superiore a quello del saccarosio.
Identificazione	
<i>Solubilità</i>	Solubile in acqua, scarsamente solubile in etanolo.
Purezza	
<i>Perdita all'essiccazione</i>	Non oltre l'1 % (1 ora a 105 °C) forma diidrata: non oltre l'8,5 % (4 ore a 140 °C)
<i>Selenio</i>	Non oltre 30 mg/kg espressi in selenio sulla sostanza secca
<i>Arsenico</i>	Non oltre 3 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Piombo</i>	Non oltre 1 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Metalli pesanti</i>	Non oltre 10 mg/kg espressi in Pb sulla sostanza secca
<i>Cicloesilammina</i>	Non oltre 10 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Dicicloesilammina</i>	Non oltre 1 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Anilina</i>	Non oltre 1 mg/kg sulla sostanza secca

E 954 — SACCARINA E SUOI SALI DI SODIO, DI POTASSIO E DI CALCIO

1) SACCARINA

Definizione	
<i>Denominazione chimica</i>	3-2,3-diidrobenzo(d)isotiazol-1,1-diossido
<i>Einecs</i>	201-321-0
<i>Numero E</i>	E 954
<i>Formula chimica</i>	$C_7H_5NO_3S$
<i>Peso molecolare</i>	183,18
<i>Tenore</i>	Non meno del 99 % e non oltre il 101,0 % di $C_7H_5NO_3S$ sulla sostanza secca
Descrizione	Cristalli bianchi o polvere bianca cristallina, inodore o con debole odore aromatico, di sapore dolce anche in soluzioni molto diluite. Potere dolcificante da 300 a 500 volte superiore a quello del saccarosio.
Identificazione	
<i>Solubilità</i>	Poco solubile in acqua, solubile in soluzione basica, scarsamente solubile in etanolo.

Purezza	
<i>Perdita all'essiccazione</i>	Non oltre l'1 % (2 ore a 105 °C)
<i>Intervallo di fusione</i>	226 °C-230 °C
<i>Arsenico</i>	Non oltre 3 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Selenio</i>	Non oltre 30 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Piombo</i>	Non oltre 1 mg/kg sostanza secca
<i>Metalli pesanti</i>	Non oltre 10 mg/kg espressi in Pb sulla sostanza secca
<i>Ceneri solfate</i>	Non oltre lo 0,2 % sulla sostanza secca
<i>Acidi benzoico e salicilico</i>	Aggiungere 3 gocce di una soluzione circa 1 M di cloruro ferrico in acqua, a 10 ml di una soluzione 1 a 20 precedentemente acidificata con 5 gocce di acido acetico. Non si nota la comparsa né di precipitato né di una colorazione violetta.
<i>o-Toluensolfonammide</i>	Non oltre 10 mg/kg sulla sostanza secca
<i>p-Toluensolfonammide</i>	Non oltre 10 mg/kg sulla sostanza secca
<i>p-Solfonammide dell'acido benzoico</i>	Non oltre 25 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Sostanze carbonizzabili</i>	Assenti
II) SALE SODICO DELLA SACCARINA	
Sinonimi	Saccarina, sale di sodio della saccarina
Definizione	
<i>Denominazione chimica</i>	o-Benzosolfimmide di sodio, sale di sodio del 2,3-diidro-3-ossobenzisolfonazolo, sale di sodio diidrato del 1,2-benzisotiazolin-3-one-1,1-diossido
<i>Einecs</i>	204-886-1
<i>Numero E</i>	E 954
<i>Formula chimica</i>	$C_7H_4NNaO_3S \cdot 2H_2O$
<i>Peso molecolare</i>	241,19
<i>Tenore</i>	Non meno del 99 % e non più del 101 % di $C_7H_4NNaO_3S$ sulla sostanza secca.
Descrizione	Cristalli bianchi o polvere bianca cristallina, efflorescente, inodore o con un debole odore, di sapore molto dolce anche in soluzioni molto diluite. Potere dolcificante da 300 a 500 volte superiore a quello del saccarosio in soluzione diluita.
Identificazione	
<i>Solubilità</i>	Facilmente solubile in acqua, scarsamente solubile in etanolo.
Purezza	
<i>Perdita all'essiccazione</i>	Non oltre il 15 % (4 ore a 120 °C)

<i>Arsenico</i>	Non oltre 3 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Selenio</i>	Non oltre 30 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Piombo</i>	Non oltre 1 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Metalli pesanti</i>	Non oltre 10 mg/kg espressi in Pb sulla sostanza secca
<i>Acidi benzoico e salicilico</i>	Aggiungere 3 gocce di una soluzione circa 1 M di cloruro ferrico in acqua, a 10 ml di una soluzione 1 a 20 precedentemente acidificata con 5 gocce di acido acetico. Non si nota la comparsa né di precipitato né di una colorazione violetta.
<i>o-Toluensolfonammide</i>	Non oltre 10 mg/kg sulla sostanza secca
<i>p-Toluensolfonammide</i>	Non oltre 10 mg/kg sulla sostanza secca
<i>p-Solfonammide dell'acido benzoico</i>	Non oltre 25 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Sostanze carbonizzabili</i>	Assenti
III) SALE DI CALCIO DELLA SACCARINA	
Sinonimi	Saccarina, sale di calcio della saccarina
Definizione	
<i>Denominazione chimica</i>	o-Benzosolfimmide di calcio, sale di calcio del 2,3-diidro-3-ossobenzisosolfonazolo, sale di calcio idrato (2:7) del 1,2-benzisotiazolin-3-one-1,1-diossido
<i>Einecs</i>	229-349-9
<i>Numero E</i>	E 954
<i>Formula chimica</i>	$C_{14}H_8CaN_2O_6S_2 \cdot 3\frac{1}{2} H_2O$
<i>Peso molecolare</i>	467,48
<i>Tenore</i>	Non meno del 95 % di $C_{14}H_8CaN_2O_6S_2$ sulla sostanza secca.
Descrizione	Cristalli bianchi o polvere bianca cristallina, inodore o con un debole odore, di sapore molto dolce anche in soluzioni molto diluite. Potere dolcificante da 300 a 500 volte superiore a quello del saccarosio in soluzione diluita.
Identificazione	
<i>Solubilità</i>	Facilmente solubile in acqua, solubile in etanolo.
Purezza	
<i>Perdita all'essiccazione</i>	Non oltre il 13,5 % (4 ore a 120 °C)
<i>Arsenico</i>	Non oltre 3 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Selenio</i>	Non oltre 30 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Piombo</i>	Non oltre 1 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Metalli pesanti</i>	Non oltre 10 mg/kg espressi in piombo sulla sostanza secca

<i>Acidi benzoico e salicilico</i>	Aggiungere 3 gocce di una soluzione circa 1 M di cloruro ferrico in acqua, a 10 ml di una soluzione 1 a 20 precedentemente acidificata con 5 gocce di acido acetico. Non si nota la comparsa né di precipitato né di una colorazione violetta
<i>o-Toluensolfonammide</i>	Non oltre 10 mg/kg sulla sostanza secca
<i>p-Toluensolfonammide</i>	Non oltre 10 mg/kg sulla sostanza secca
<i>p-Solfonammide dell'acido benzoico</i>	Non oltre 25 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Sostanze carbonizzabili</i>	Assenti
IV) SALE DI POTASSIO DELLA SACCARINA	
Sinonimi	Saccarina, sale di potassio della saccarina
Definizione	
<i>Denominazione chimica</i>	o-Benzosolfimmide di potassio, sale di potassio del 2,3-diidro-3-ossobenzisosolfonazolo, sale di potassio monoidrato del 1,2-benzisotiazolin-3-one-1,1-diossido
<i>Einecs</i>	
<i>Numero E</i>	E 954
<i>Formula chimica</i>	$C_7H_4KNO_3S \cdot H_2O$
<i>Pesomolecolare</i>	239,77
<i>Tenore</i>	Non meno del 99 % e non più del 101 % di $C_7H_4KNO_3S$ sulla sostanza secca
Descrizione	Cristalli bianchi o polvere bianca cristallina, inodore o con un debole odore, di sapore molto dolce anche in soluzioni molto diluite. Potere dolcificante da 300 a 500 volte superiore a quello del saccarosio.
Identificazione	
<i>Solubilità</i>	Facilmente solubile in acqua, scarsamente solubile in etanolo.
Purezza	
<i>Perdita all'essiccazione</i>	Non oltre l'8 % (4 ore a 120 °C)
<i>Arsenico</i>	Non oltre 3 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Selenio</i>	Non oltre 30 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Piombo</i>	Non oltre 1 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Metalli pesanti</i>	Non oltre 10 mg/kg espressi in piombo sulla sostanza secca
<i>Acidi benzoico e salicilico</i>	Aggiungere 3 gocce di una soluzione circa 1 M di cloruro ferrico in acqua, a 10 ml di una soluzione 1 a 20 precedentemente acidificata con 5 gocce di acido acetico. Non si nota la comparsa né di precipitato né di una colorazione violetta.
<i>o-Toluensolfonammide</i>	Non oltre 10 mg/kg sulla sostanza secca
<i>p-Toluensolfonammide</i>	Non oltre 10 mg/kg sulla sostanza secca

p-Solfonammide dell'acido benzoico

Non oltre 25 mg/kg sulla sostanza secca

Sostanze carbonizzabili

Assenti

E 957 — TAUMATINA**Sinonimi****Definizione***Denominazione chimica*

La taumatina si ottiene per estrazione acquosa a pH 2,5-4,0 dagli arilli del frutto del ceppo naturale del *Thaumatococcus daniellii* (Benth), essa è composta essenzialmente da due proteine: la Taumatina I e la Taumatina II, accompagnate da piccole quantità di costituenti della pianta, provenienti dal materiale di partenza.

Einecs

258-822-2

Numero E

E 957

Formula chimica

Poliptide composto da 207 amminoacidi

Peso molecolare

Taumatina I 22 209
Taumatina II 22 293

Tenore

Non meno del 16 % di azoto sulla sostanza secca, equivalente a non meno del 94 % di proteine (N × 5,8).

Descrizione

Polvere color crema, inodore, di sapore molto dolce. Potere dolcificante da 2 000 a 3 000 volte superiore a quello del saccarosio.

Identificazione*Solubilità*

Molto solubile in acqua, insolubile in acetone.

Purezza*Perdita all'essiccazione*

Non oltre il 9 % (determinato essiccando fino a peso costante a 105 °C)

Carboidrati

Non oltre il 3 % sulla sostanza secca

Ceneri solfatate

Non oltre il 2 % sulla sostanza secca

Alluminio

Non oltre 100 mg/kg sulla sostanza secca

Arsenico

Non oltre 3 mg/kg sulla sostanza secca

Piombo

Non oltre 3 mg/kg sulla sostanza secca

Requisiti microbiologici

Conta dei microrganismi aerobici totali: massimo 1 000/g E. Coli: assente in 1 g

E 959 — NEOESPERIDINA DIIDROCALCONE**Sinonimi**

Neesperidina diidrocalcione, NHDC, esperetina diidrocalcione-4'-β-neoesperidoside, neoesperidina DC

Definizione*Denominazione chimica*

2-O-α-L-ramnopiranosil-4'-β-D-glucopiranosil-esperetina diidrocalcione; ottenuto per idrogenazione catalitica della neoesperidina

<i>Einecs</i>	243-978-6
<i>Numero E</i>	E 959
<i>Formula chimica</i>	$C_{28}H_{36}O_{15}$
<i>Peso molecolare</i>	612,6
<i>Tenore</i>	Non inferiore al 96 % sulla sostanza secca.
Descrizione	Polvere biancastra, cristallina, inodore, di sapore caratteristico molto dolce. Potere dolcificante da 1 000 a 1 800 volte superiore a quello del saccarosio.
Identificazione	
<i>A. Solubilità</i>	Facilmente solubile in acqua calda, molto poco solubile in acqua fredda, praticamente insolubile in etere e in benzene.
<i>B. Assorbimento all'ultra-violetto</i>	Massimo a 282-283 nm, ottenuto con una soluzione di 2 mg in 100 ml di metanolo.
<i>C. Test di Neu</i>	Sciogliere circa 10 mg di neoesperidina DC in 1 ml di metanolo, aggiungere 1 ml di una soluzione all'1 % di 2-amminoetil difenilborato in metanolo. Si ottiene un colore giallo vivo.
Purezza	
<i>Perdita all'essiccazione</i>	Non oltre l'11 % (3 ore a 105 °C)
<i>Ceneri solfatate</i>	Non oltre lo 0,2 % sulla sostanza secca
<i>Arsenico</i>	Non oltre 3 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Piombo</i>	Non oltre 2 mg/kg sulla sostanza secca
<i>Metalli pesanti</i>	Non oltre 10 mg/kg espressi in Pb sulla sostanza secca

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 monometiletere, 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'-acetonaftone (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/nitrile/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).

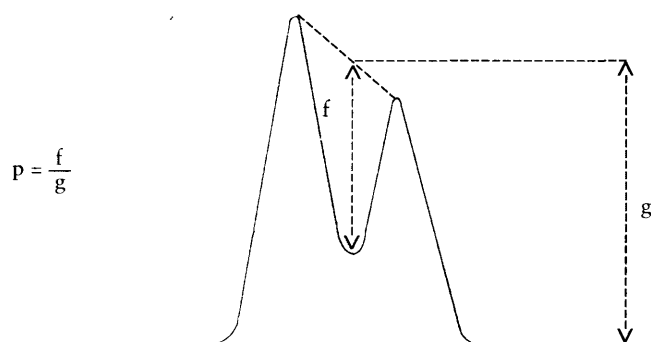


Figura 1: Separazione dei picchi

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.

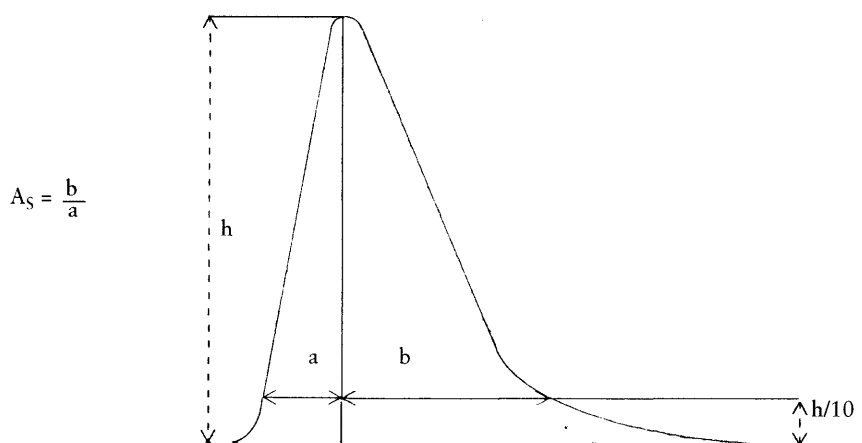


Figura 2: Fattore di asimmetria di picco

- 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 monometiletero, dell'idrochinone monoetiletero e dell'idrochinone monobenziletero (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 ammoniacca (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 μ l delle soluzioni di riferimento (3.11) e 2 μ l 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 monometiletero, l'idrochinone monoetiletero o idrochinone monobenziletero.

C_i = concentrazione (g/50 ml) nella soluzione di riferimento (3.10) dell'idrochinone, dell'idrochinone monometiletero, dell'idrochinone monoetiletero e dell'idrochinone monobenziletero.

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).

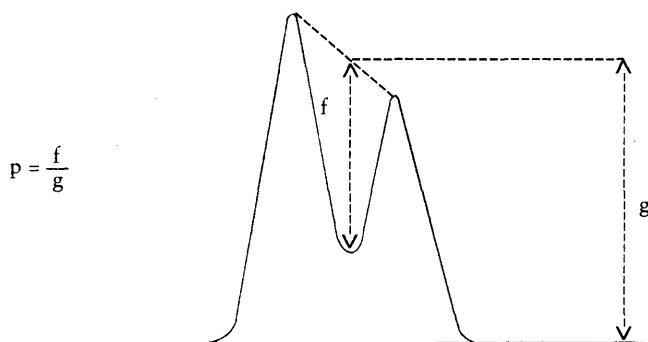


Figura 1: Separazione dei picchi

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.

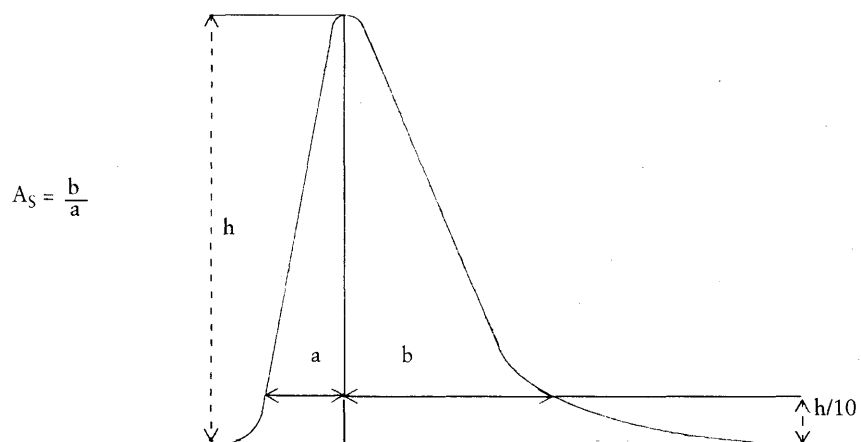


Figura 2: Fattore di asimmetria di picco

- 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'assorbimento 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.