

Diák feladatleírás

Cím: KOZMETIKAI KRÉMEK: Parabének azonosítása és mennyiségi meghatározása

(COSMETIC CREAMS: Identification and determination of parabens)

Kozmetikai, élelmiszeripari és gyógyszerészeti termékek ezrei mennének tönkre rövid időn belül, elvesztenék ízüket és minőségüket tartósítószer használata nélkül. A parabének szintetikus, széles körben alkalmazott tartósítók, melyek nagy koncentrációban allergiás tüneteket okozhatnak, s megzavarhatják a hormonháztartást ösztrogén hatásukon keresztül (Darbre PD. (2006): Environmental oestrogens, cosmetics and breast cancer. Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. 20, 121-143.). Ezért a parabének csak veszélyt nem jelentő, kicsi koncentrációban találhatóak meg pl. a kozmetikai krémekben, mint a Sanexben.

A különböző vegyületek mérése, a munka igényének megfelelő legjobb (árban, időben, energiában és véghezvitelben) extrakciós, elválasztási és detektálási módszer kiválasztása, kihívás az analitikusok számára. Egy ilyen munkába nyújtunk bepillantást.

Rövid összefoglaló

Tagja vagy egy analitikus munkacsoportnak, melynek feladata néhány parabén (tartósítószer) azonosítása és mennyiségi meghatározása a Sanex krémekben. Ismerned kell a folyadék extrakciós, a vékonyréteg-kromatográfiás és a nagyfelbontású folyadék-kromatográfiás elválasztási módszerek alapjait. Becsüld meg a feladatban leírt kétféle kromatográfiás módszer költségvetését, az anyagigényük alapján (vegyszerek, mozgó és álló fázis), és kezdeményezz kommunikációt az iskolatársakkal, más kívülálló fogyasztóval vagy mással az eredményekről.

Elvégzendő vizsgálatok

Négy fős csoportban dolgoztok. Két személy a parabéneket TLC módszerrel azonosítja, míg a másik kettő HPLC-vel méri meg őket. A következő segítő eszközök állnak rendelkezésetekre:

- Hasznos weblapok
- Mérés leírása
- Adatlapok a rétegekromatográfiás azonosítás és a nagyhatékonyságú folyadék-kromatográfiás meghatározás eredményeinek kiértékeléséhez

Ez a feladat a kommunikációra, a beszerzés tervezésére, valamint a költségvetés elkészítésére helyezi a hangsúlyt. Tanárotok segíteni fog az idő- és a munkabeosztás megszervezésében. Dolgozzatok csapatként és kövessétek ezt az utat:

- Gyűjtsetek információkat a parabénekről, azok használatáról, szerepéről a különböző élelmiszerekben és kozmetikai cikkekben, különösképpen a Sanex krémekben.

Találsz adatokat a <http://www.sanex.net/> című honlapon, valamint a következő publikációkban:

- N. de Kruijf, M. A. H. Rijk, L. A. Pranato-Soetardhi and A. Schouten (1987): Determination of preservatives in cosmetic products I: Thin-layer chromatographic procedure for the identification of preservatives in cosmetic products (*J. Chromatography* 410, 395-411).
- N. de Kruijf, M. A. H. Rijk, L. A. Pranato-Soetardhi and A. Schouten, (1989). Determination of preservatives in cosmetic products II. High-performance liquid chromatographic identification (*J. Chromatography* 469, 317-398).

- A gyakorlati munka során szilárd-folyadék és folyadék-folyadék extrakciót, vékonyréteg-kromatográfiát valamint nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiát fogsz alkalmazni. Nézd át ezen elválasztási technikák alapelveit. Néhány hasznos link:

<http://www.chem.wisc.edu/courses/342/Fall2004/TLC.pdf>

<http://www.lipidlibrary.co.uk/topics/tlc/file.pdf>

<http://siggy.chem.ucla.edu/VOH/136/TLC.pdf>

<http://www.chromatography-online.org/Principles/TLC/Sample-Application/rs68.html>

Megjegyzés: töltsd le a "Principles and Practice of Chromatography"-t (ingyenes, de regisztrálnod kell). Különösen a 48-67. oldalig ajánlott.

<http://www.ionsource.com/tutorial/chromatography/rphpic.htm>

<http://www.waters.com/WatersDivision/ContentD.asp?watersit=JDRS-6VRHBW&WT.svl=1>

- Olvasd át alaposan a kísérleti leírás részt! Vedd a szükséges felszerelések és anyagok listáját és keresd ki az árukat katalógusokból. Használd könyvkatalógusokat vagy weblapokat, mint pl. a következőket:

<http://www.merck.de/servlet/PB/menu/1001723/index.html>

Használd a ChemDat online-t!

http://www.sigmaaldrich.com/Local/SA_Splash.html

A gyakorlati munka előtt nézz utána, milyen veszélyforrásokat jelentenek az általad használt anyagok.

- Miután kiosztottátok magatok közt az elvégzendő munkát, és átgondoltátok, milyen adatokat kell lejegyeznetek (pl. ne felejtsetek a Sanex krém tömegét leírni), elkezdhetitek a gyakorlati munkát.
- Az eredmények kiértékeléséhez használjátok segítségül az **„Adatlap: Rétegkromatográfiás azonosítás”** és az **„Adatlap: nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás meghatározás”** lapokat.
- Végül osszátok meg egymással a két módszerrel kapott eredményeket, és vitassátok meg őket kívülállókkal (pl. fogasztó, sajtó, iskolatárs stb.)

Mérési eredményeid

Kezdeményezetek kommunikációt a témákban jártas iskolatársaitokkal vagy kívülállókkal, a következőket használva:

Foglaljátok össze a vizsgált parabének szerepét a kozmetikai krémekben!

Próbáld meg összegezni a TLC és a HPLC közötti különbséget! Használd a szakkifejezéseket! Gondolj pl. a rendszerek zártságára, a mintafelvitelre, a mobil fázist áramoltató erőre, a mobil fázis sebességére, a használható detektálási eljárásokra.

Egy HPLC módszer kifejlesztése hosszú laboratóriumi gyakorlatot igényel. Tudnál említeni módszereket, melyekkel ki lehet mutatni az interferenciát? Mit csinálnál interferencia esetében?

Összegezzétek a két módszerrel kapott eredményeket és azok költségigényét. A költségek kiszámításánál gondoljatok arra, hogy a költség függ az anyagok tisztaságától (pl. a TLC módszerhez nem szükséges kromatográfiás tisztaságú mozgó fázis, valamint nagy tisztaságú parabén) és mennyiségétől (pl. a HPLC nagyobb térfogatú mobil fázist igényel, mint a TLC).

Beszélgétek meg, hogy melyik módszert milyen esetben használnátok? Gondoljatok költség-, és időigényükre valamint pontosságukra.

Önellenőrző feladatok diákoknak

A feladat a következő képességek fejlesztésére szolgált: a szakmai tudás alkalmazása, a problémamegoldás felismerése, a csapatmunka, a kommunikáció és a beszerzés, valamint költségvetés megtervezése.

Válaszolj 50-100 szóban az alábbi kérdésekre!

Milyen szakmai készségekre és tudásra tettél szert, és milyen eredményesen használtad azokat?

Mennyire eredményesen használtátok ki a csapatmunkát? Írd le a csapatmunka előnyeit példákon keresztül!

Hogyan kommunikáltatok egymással és az mennyire volt hatásos?

Hogyan sikerült a beszerzést és a költségvetés megtervezni?

KOZMETIKAI KRÉMEK: A parabének azonosítása a kozmetikai krémekben (a StandardBase eljárás alapján)

EXTRAKCIÓ A TLC AZONOSÍTÁSHOZ

Anyagok és felszerelések

- Aceton
- Kalcium-klorid, vízmentes
- Dietil-éter
- Sósav (4 mol/l)
- Kálium-hidroxid oldat (4 mol/l)
- Analitikai mérleg
- 50 ml-es menetes Erlenmeyer-lombik
- 60 °C-os vízfürdő
- pH indikátor papír
- Szűrőpapír
- Erlenmeyer-lombik
- Választótölcsér
- Mintatartó (5 ml)

Módszer

Mérj le 1,0 g Sanex krémet egy 50 ml-es menetes Erlenmeyer-lombik. Adj 4 csepp sósavat és 40 ml acetont hozzá. A zárt Erlenmeyer-lombikot rakd 5 percre a 60 °C-os vízfürdőbe. Rázd erősen 1 percig, hogy a parabének extrahálódjanak a folyadék fázisba.

Állítsd be az oldat pH-ját ≤ 3 -ra sósavat hozzácsepegtetve, pH indikátor papírral mérve. Ismét rázd erősen egy percig. Hútsd le az oldatot szobahőmérsékletre áramló csapvíz segítségével, majd azután szűrd le. 20 ml szűrletet és 60 ml vizet rakj egy 200 ml-es Erlenmeyer-lombikba és keverd őket össze. Kálium-hidroxid oldattal állítsd be a keverék pH-ját körülbelül 10-re. Használd pH indikátor papírt az ellenőrzésre.

Adjál 1 g kalcium-kloridot hozzá, és rázd erősen. Szűrd le az oldatot egy 75 ml dietil-étert tartalmazó 250 ml-es választótölcsérbe, és rázd 1 percig. Amikor a rétegek elválnak, gyűjtsd a vizes fázist egy 200 ml-es Erlenmeyer-lombikba, sósavval állítsd be a pH-ját körülbelül 2-re. Ezután adj hozzá 10 ml dietilétert és rázd erősen 1 percig. A rétegek elválása után a második éteres fázisból vegyél 2 ml-t a mintatartóba.

TLC VIZSGÁLAT

Anyagok és felszerelés

- Jégecet
- n-Pentán
- Metil 4-hidroxibenzoát (metilparabén) 0,1 g/100 ml metanolos oldata
- Etil 4-hidroxibenzoát (etilparabén) 0,1 g/100 ml metanolos oldata
- n-Propil 4-hidroxibenzoát (propilparabén) 0,1 g/100 ml metanolos oldata
- n-Butil 4-hidroxibenzoát (butilparabén) 0,1 g/100 ml metanolos oldata
- 2-fenoxietanol 0,2 g/100 ml metanolos oldata
- 1-fenoxipropán-2-ol 0,2 g/100 ml metanolos oldata

- TLC réteg, 20 cm x 20 cm alumínium lemezre felvitt (0,25 mm) fluoreszcens adalékanyagot tartalmazó szilikagél, ha lehetséges, akkor koncentrációs zónával
- Szárítószekrény, mely 120 °C-ig működik
- Mikrofecskendő
- Kifejlesztő kád (telítetlen)
- Levegőáram forrás (pl. hajszárító)
- UV-lámpa ($\lambda=254$ nm)

Módszer

Mikrofecskendő segítségével vigyél fel a rétegre 10-10 μ l-t a referenciaoldatokból és 100 μ l-t a mintaoldatból az előzetesen kiszárított (3 óra, 120 °C) TLC rétegre (a koncentrációs zónába). A mintafelvitelt hideg levegőárammal gyorsítsd.

Készítsd el a mobil fázist [n-pentán-jéget (88:12 v/v; pl. 88 ml n-pentán és 12 ml jéget elegyítésével készítheted el)] és önts 100 ml-t a kifejlesztő kádba.

Közvetlen ezután tedd bele a tesztanyagokat és a mintát is tartalmazó réteget. A kifejlesztést szobahőmérsékleten végezd, míg az oldószerfront nem ér el körülbelül 15 cm távolságra a mintafelvitel vonalától (előzetesen érdemes bejelölni) (a kifejlesztési távolság fontos a 6 parabén megfelelő elválasztásához). A megfuttatott réteget szárítsd meg meleg levegő áramban, és értékeld UV fény alatt. Jelöld be az oldószerfrontot és a kromatográfiás foltok helyét is.

KOZMETIKAI KRÉMEK: Parabének meghatározása kozmetikai krémekben (a StandardBase eljárás alapján)

EXTRAKCIÓ A HPLC MEGHATÁROZÁSHOZ

Anyagok és felszerelés

- Etanol, abszolút
- Kénsav (2 mol/l)
- 100 ml-es menetes Erlenmeyer-lombik
- Analitikai mérleg
- 60 °C-os vízfürdő
- Szűrőpapír
- Mintatartó (5 ml)

Módszer

Mérj be 1,0 g Sanex krémet egy 100 ml-es menetes Erlenmeyer-lombikba. Adjál hozzá 1 ml kénsavat, 50 ml etanol-víz (9:1 v/v; pl. alkalmazhatod 90 ml abszolút etanol és 10 ml víz elegyét) keveréket. Rázd erősen legalább egy percig a lezárt Erlenmeyer-lombikot, hogy a minta szuszpendáljon az oldószerben. Helyezd a lombikot 5 percre a 60 °C-os vízfürdőbe, hogy a parabének extrahálódjanak az oldatfázisba. Ezután gyorsan hűtsd le hideg csapvízzel, és tedd az Erlenmeyer-lombikot hűtőbe. 1 óra múlva szűrd le, és vegyél belőle körülbelül 2 ml-t a mintatartóba. Az extraktumot tartsd hűtőben, és használd fel 24 órán belül HPLC-s meghatározásra.

HPLC VIZSGÁLAT

Anyagok és felszerelés

- Acetonitril
- Etanol, abszolút
- Metanol
- Kénsav
- Tetrahidrofurán
- Törzsoldat, mely a következő tartósítószeret tartalmazza (etanol/víz 9:1 v/v oldószerben; pl. 90 ml abszolút etanol és 10 ml víz elegyítésével készítheted el) (hűtőben tárolva 1 hétig stabil):
 - 0,05 g/100 ml Metil 4-hidroxibenzoát (metilparabén)
 - 0,05 g/100 ml Etil 4-hidroxibenzoát (etilparabén)
 - 0,05 g/100 ml n-Propil 4-hidroxibenzoát (propilparabén)
 - 0,05 g/100 ml n-Butil 4-hidroxibenzoát (butilparabén)
 - 0,2 g/100 ml 2-fenoxietanol
 - 0,2 g/100 ml 1-fenoxipropán-2-ol
- 50 ml-es mérőlombikok
- Szűrő (nylon, PVDF, 0,45 µm porozitás)
- HPLC UV-detektorral ($\lambda = 280$ nm) és fordított fázisú analitikai oszlop (Nucleosil 5C18 vagy azzal ekvivalens, rozsdamentes, 25 cm x 4.6 mm), 20 µl-es mintahurokkal
- Mikrofecskendő

Módszer

Készítsd el a parabének standardoldatait. Rakjál 0,5, 1, 2, 5, 10 és 20 ml törzsoldatot 50 ml-es mérőlombikokba. Mindegyikhez adjál 1 ml kénsavat és töltsd fel őket jelig etanol-víz (9:1 v/v; pl. 270 ml abszolút etanol és 30 ml víz elegyítésével készítheted el) eleggyel. Ezeket az oldatokat frissen készítsd el. HPLC elválasztáshoz készítsd el és szűrd le a mobil fázist [tetrahidrofurán-víz-metanol-acetonitril (5:60:10:25 v/v/v/v); pl. elkészítheted 5 ml tetrahidrofurán, 60 ml víz, 10 ml metanol és 25 ml acetonitril elegyítésével], állítsd be az áramlási sebességet (1,5 ml·min⁻¹) és az UV-detektort ($\lambda=280$ nm). 20-20 μ l-t injektálj minden oldatból (a standard- és a mintaoldatokból is). Minden esetben vedd fel a kromatogramokat a csúcsok területével és magasságával. Ha a kapott legrosszabb R_s nem éri el a 0,9-et, akkor változtatni kell a mobil fázis összetételén, vagy hatékonyabb oszlopot kell használni.

Űrlap: Rétegekromatográfiás azonosítás

A TLC elválasztás dokumentációja:

Rajzold a parabének kromatográfiás foltjait a megfelelő helyre, ahol a kifejlesztett rétegen elhelyezkednek. Ügyelj a helyes középpontra és a foltok méretére.

Ne felejtse el az oldószerfront meghúzását.

A következő távolságokat mérd le (jelöld őket a rajzon is):

A felviteli pont és az oldószerfront távolsága (mm)

h_0 = _____ mm

A felviteli pont és a parabénfoltok közepe közötti távolság (mm) [h]

metilp.	etilp.	propilp.	butilp.	2-f-et.	1-f-prop.	minta

Töltsd ki a következő táblázatot. Számítsd ki minden parabén R_f értékét. Hasonlítsd össze a mintában észlelhető foltokat a referenciaanyagok foltjaival, figyelembe véve az R_f értékeiket és az UV fényben tapasztalható viselkedésüket.

	h [mm] vándorlási távolság	$R_f=h/h_o$ Retenciós faktor	Megtalálható a krémekben? (Igen/Nem)
metilparabén			
etilparabén			
propilparabén			
butilparabén			
2-fenoxietanol			
1-fenoxipropán-2-ol			

Űrlap: Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás meghatározás

Illeszd ide az egyik referenciaoldat (minden tesztanyagot tartalmaz) és a mintaoldat kromatogramját.

A standardoldat kromatogramja:

A mintaoldat kromatogramja:

Mi a holtidő (t_0) a HPLC-ben? Jelöld be a standardoldat kromatogramján!

t_0 = _____ perc

Szükséged lesz a vizsgált parabének csúcsainak retenciós idejére (t_R) és alapvonalszélességére (w). Gyűjtsd össze ezen paramétereket a standardoldat kromatogramjáról a következő táblázatba, és számítsd ki a relatív retenciós időket (t_R'), a felbontásokat (R_s), a szelektivitásokat (α), az elméleti tányérszámokat (n) és az elméleti tányérmagasságokat ($HETP$) a következő formulák felhasználásával:

$$t_R' = t_R - t_0$$

$$R_s = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\frac{w_1 + w_2}{2}} \quad (\text{ha } t_{R2} > t_{R1})$$

$$\alpha = \frac{t_{R2}'}{t_{R1}'}$$

$$n = 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2$$

$$HETP = \frac{L}{n}$$

	t_R	t_R'	R_s	$\square$	n	HETP
metilparabén						
etilparabén						
propilparabén						
butilparabén						
2-fenoxietanol						
1-fenoxipropán-2-ol						

Írd be a parabének standardadatainak kromatografálásával kapott csúcsok átlagos területeit a következő táblázatba. Számítsd ki a parabének koncentrációját is az egyes oldatokban.

	A csúcs alatti területek átlaga					
A parabének koncentrációja a standardoldatokban [mgxl ⁻¹]						
metilparabén						
etilparabén						
propilparabén						
butilparabén						
A parabének koncentrációja a standardoldatokban [mgxl ⁻¹]						

2-fenoxietanol						
1-fenoxipropán-2-ol						

Töltsd ki a következő táblázatot. Microsoft Excell-ben ábrázold a parabének átlagos csúcsterületeit (T) a standardoldat koncentrációjának (c ; mgxl^{-1}) függvényében. Lineáris regresszió segítségével illessz a pontokra egyenest. Írd le az egyenes egyenletét és a korrelációs koefficiensét. A mintaoldatban található parabének koncentrációjának kiszámolásához, csak be kell helyettesíteni ezekbe a függvényekbe a mintaoldat kromatogramjából nyert átlagos csúcsterületeket.

Számold ki a metil-, etil-, propil-, butil-parabének, a 2-fenoxietanol, és az 1-fenoxipropán-2-ol a krémekben található mennyiségét mgxg^{-1} mértékegységben. Használd a következő formulát:

$$w = \frac{c \cdot V}{10^3 \cdot m_0}$$

ahol m_0 = a minta tömege (a krém) grammban

V = az oldat térfogata (51 ml)

	T és c közötti egyenlet R -rel	A mintaoldatba n az átlagos T	mintaoldatba n a c [mgxl^{-1}]	A krémbeli mennyiség [mgxg^{-1}]
metilparabén				
etilparabén				
propilparabén				
butilparabén				
2-fenoxietanol				
1-fenoxipropán-2-ol				

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.