

Laborator nr. 1

DETERMINAREA FORMALDEHIDEI

Formaldehida este un produs natural, fiind prezent în toate celulele corpului uman, sau în unele fructe ca: mere, struguri și pere.

Formaldehida comercializată sub formă de soluție 37% în apă cunoscută sub denumirea de formol. De obicei conține o mică cantitate de metanol, pentru a preveni polimerizarea. În această formă este prezentă cu 1 mol apă de hidratare, care este f. dificil de îndepărtat, chiar prin evaporare.

Toxicitatea formolului diferă mult de toxicitatea formaldehidei sub formă de gaz anhidru [17].

Produsul este de asemenea disponibil și în formă uscată, ca para-formaldehidă. Prin dizolvare în apă revine la formaldehidă (formol).

Produsul este catalogat ca fiind CMR de categoria 3 (carcinogen, mutagen și toxic pentru reproducere).

Metodele de analiză pentru formaldehidă sunt la fel de controversate ca și utilizarea ei pentru cosmetice.

Toate metodele de determinare implică o reacție chimică a moleculei cu formarea unui produs de reacție colorat. Aceste reacții nu fac diferențierea între formaldehida liberă și donorii de formaldehidă.

Metoda cea mai des folosită este metoda acetilacetonei, cunoscută și sub numele de metoda Hantzsch. În literatura de specialitate există nu mai puțin de 4 metode diferite pentru această metodă. Toate cele 4 variante ar trebui să conducă la aceleași rezultate atunci când se măsoară formaldehida liberă; din păcate rezultatele obținute variază funcție de tăria legăturii între molecula formaldehidei și restul compușilor. Metoda constă în reacția formaldehidei cu reactivul Nash (acetilacetona, 2,4-pentadiona) [27].

Alte metode de analiză implică reacții cu acidul cromotropic, 2,4-dinitrofenilhidrazina și NaOH/H₂O₂.

Identificarea formaldehidei din produsele cosmetice

Această metodă detaliază identificarea și două determinări dacă avem sau nu donori de formaldehidă într-un compus cosmetic.

Metoda se poate aplica pentru toate categoriile de produse cosmetice [9].

1. Identificare calitativă

a. Metodă generală de determinare prin colorimetrie cu reactiv Schiff

Metoda se aplică atunci când se folosește formaldehidă liberă (singură sau împreună cu alți conservanți) dar în absența donozilor de formaldehidă [9].

Determinare în prezența donozilor de formaldehidă

În această metodă, în timpul derivatizării, donozii de formaldehidă se descompun și conduc la rezultate prea mari (formaldehida combinată și polimerizată). Este necesară în acest caz separarea formaldehidei libere prin cromatografie în fază lichidă [9].

Conținutul de formaldehidă liberă, determinat cu ajutorul acestei metode, se exprimă în procente de masă.

Principiul metodei :

Formaldehida liberă sau combinată, în mediu de acid sulfuric colorează reactivul Schiff în culoare roz sau mov.

Reactivul Schiff este o soluție de fucsină în acid, decolorată cu SO₂ sau metabisulfid de sodiu. Reactivul în prezența alchidelor reformează culoarea magenta [9].

Reactivi : totii reactivii trebuie să fie de puritate analitică și apa să fie demineralizată.

- Fucsină,
- Sulfid de sodiu hidratat cu 7 H₂O,
- HCl concentrat (d-1,19)
- Acid sulfuric 1M

Obținerea reactivului Schiff: Se cântăresc 100 mg fucsină într-un flacon și se dizolvă în 75 ml apă la 80°C. După răcire se adaugă 2,5 g sulfid de sodiu. Apoi se aduce amestecul la 100 ml. Se folosește în decurs de 2 săptămâni [9].

Mod de lucru:

Se cântăresc 2 g probă într-un pahar de 10 ml. Se adaugă 2 picături acid sulfuric și 2 ml reactiv Schiff. Reactivul trebuie să fie complet incolor când este adăugat. Se agită paharul și se lasă să stea timp de 5 min.

Dacă după 5 min se observă formarea unei nuanțe roz sau mov înseamnă că proba conține mai mult de 0,01% formaldehidă fie liberă, fie combinată și, în acest caz, se folosește a doua metodă de determinare.

b. Determinarea prin colorimetrie cu pentan-2,4-dionă

Principiul metodei: Formaldehida reacționează cu pentan-2,4-diona, în prezența acetatului de amoniu, pentru a forma 3,5-diacetil-1,4-dihidrotoluidina. Aceasta este extrasă cu butan-1-ol și se măsoară absorbția la 410 nm [19].

Reactivi. Toți reactanții trebuie să fie de puritate analitică și apa trebuie să fie demineralizată.

- Acetat de amoniu anhidru,
- Acid acetic concentrat, $d_4^{20}=1,05$
- Pentan-2,4-dionă proaspăt distilată la presiune redusă de 25 mm Hg 25° - se verifică să nu prezinte absorbție la 410 nm
- 1-Butanol,
- Acid clorhidric 1M
- Acid clorhidric 0,1M,
- Hidroxid de sodiu,
- Soluție de amidon proaspăt preparată conform Farmacopeei Europene (1 g / 50 ml apă)
- Soluție formaldehidă 37-40% g/vol.
- Soluție de iod standard 0,05M,
- Soluție standard de tiosulfat de sodiu 0,1M
- Reactiv pentan-2,4-dionă
- Reactiv de referință fără pentan-2,4-dionă
- Soluție standard concentrată de formaldehidă
- Soluție standard diluată de formaldehidă

Reactivul pentan 2,4-dionă se prepară astfel: Într-un flacon cotate de 1000 ml se dizolvă 150 g acetat de amoniu, 2 ml pentan-2,4-dionă și 3 ml acid acetic. Se aduce la semn cu apă. (pH-ul soluției trebuie să fie cca 6,4). Reactivul trebuie proaspăt preparat înainte de a fi folosit.

Se prepară și un reactiv de referință după rețeta de mai sus, dar fără a adăuga 2,4-pentandionă.

Standardul concentrat de formaldehidă se prepară astfel: se adaugă 5 g formaldehidă într-un flacon cotate de 1000 ml și se aduce la semn cu apă.

Pentru a determina tăria acestei soluții se măsoară 10 ml soluție, se adaugă 25 ml soluție standard de iod și 10 ml soluție standard de hidroxid de potasiu. Se lasă să stea 5 min. Se acidulează cu 11 ml HCl și se determină excesul de iod cu soluție standard de tiosulfat de sodiu, folosind soluție de amidon ca indicator.

1 ml iod 0,05 M consumat este echivalentul a 1,5 ml formaldehidă.

Standardul diluat de formaldehidă se prepară după cum urmează: se diluează soluția standard concentrată de formaldehidă cu apă în proporție întâi de 1/20, apoi de 1/100. Se obține o soluție - 1 ml sol conține cca 1 μg formaldehidă. Calculați conținutul exact de formaldehidă.

Aparatură :

- Aparatură standard de laborator,
- Hârtie de filtru Whatman 1PS pentru separarea fazelor,
- Centrifugă,
- Baie de apă stabilită la temperatura de 60°C,
- Spectrofotometru,
- Celule din sticlă cu latura optică de 1 cm

Mod de lucru [19]:

a. Soluția de analizat. Într-un flacon cotate de 100 ml se cântăresc cu precizie de 0,001 g o cantitate de probă de analizat, care corespunde unei cantități de formaldehidă de aproximativ 150 μg. Se aduce la 100 ml cu apă și se amestecă bine (soluția S). Se verifică dacă pH-ul soluției este apropiat de 6, dacă nu, se ajustează prin adaos de HCl diluat.

Într-un pahar Erlenmeyer de 50 ml se adaugă 10 ml soluție S, 5 ml reactiv pentan-2,4-dionă și apă demineralizată până la 30 ml.

b. Soluția de referință. Se folosește pentru a elimina posibilele interferențe date de culoarea de fundal în proba de analizat. Într-un flacon de 50 ml se adaugă 10 ml soluție S, 5 ml reactiv de referință (care nu conține 2,4-pentandionă) și apă demineralizată până la 30 ml.

c. Testul blank. Într-un pahar Erlenmeyer de 50 ml se adaugă 5 ml reactiv pentan-2,4-dionă și apă demineralizată până la 30 ml.

Metoda de determinare cantitativă:

Se agită soluțiile *a b* și *c*. Se imersează paharele Erlenmeyer într-o baie de apă la 60°C pentru exact 10 min. Se răcesc timp de 2 min într-o baie de apă cu gheață.

Se transferă în pâlnii de separare de 50 ml care conțin câte 10 ml 1-butanol. Se clătește fiecare pahar cu 3-5 ml apă. Se agită amestecurile foarte bine timp de exact 30 sec. Se lasă să separe cele două faze.

Faza de 1-butanol se filtrează în celulele de măsurare. În loc de filtrare prin hârtie de filtru, se poate folosi centrifuga timp de 5 min.

Se măsoară absorbanta A_1 la 410 nm pentru soluția probei de analizat (a) comparativ cu extractul soluției de referință (b). Analog se măsoară absorbanta A_2 a soluției blank (c) față de 1-butanol.

Toate aceste operații nu trebuie să dureze mai mult de 25 min din momentul în care flacoanele Erlenmeyer se introduc în baia de apă la 60°C.

Curba de calibrare. Într-un flacon Erlenmeyer de 50 ml se introduc: 5 ml soluție standard diluată de formaldehidă, 5 ml reactiv pentan-2,4-diol și apă demineralizată până la 30 ml. Se continuă analiza după metoda descrisă anterior și se măsoară absorbanta comparativ cu 1-butanol. Se repetă procedeul cu 10, 15, 20 și 25 ml soluție standard diluată de formaldehidă. Punctul de zero se consideră absorbanta A_2 măsurată anterior a blankului față de 1-butanol.

Se desenează curba de calibrare.

Legea Beer este valabilă până la o concentrație de formaldehidă $\leq 30 \mu\text{g}$.

Calculule

Se scade A_2 din A_1 și se citește de pe curba de calibrare cantitatea C , în μg , de formaldehidă din soluția probei de analizat.

Se calculează conținutul de formaldehidă în probă (% g/g) cu ajutorul următoarei formule :

$$\% \text{ formaldehidă} = \frac{C}{10^3 \times m}$$

unde : m – masa probei testate (g)

Repetabilitate. Pentru un conținut de formaldehidă de 0,2%, diferența între rezultatele a două determinări efectuate în paralel, pe aceeași probă, nu trebuie să depășească 0,005% pentru determinarea prin colorimetrie cu pentan-2,4-dionă.

Dacă experimental s-a obținut o valoare pentru formaldehidă mai mare de 0,2% (aceasta fiind cantitatea maximă permisă conform Directivei 76/768/EEC) trebuie repetat experimentul folosind metoda care urmează.

Determinarea prezenței donatorilor de formaldehidă

Principiul metodei: Formaldehida separată este transformată într-un derivat galben printr-o reacție cu pentan-2,4-dionă, într-un reactor, după trecere prin coloană, derivatul obținut fiind detectat prin absorbanta la 420 nm. [19]

Reactivi. Toti compușii trebuie să fie de puritate analitică și apa trebuie să fie demineralizată.

- Apă de puritate pentru HPLC sau de calitate echivalentă,
- Acetat de amoniu anhidru,
- Acid acetic concentrat,
- Pentan-2,4-dionă (menținută la 4°C)
- Fosfat disodic anhidru,
- Acid ortofosforic 85% (d=1,7)
- Metanol de puritate pentru HPLC
- Diclorometan
- Formaldehidă 37÷40% g/vol,
- Hidroxid de sodiu 1M.,
- Acid clorhidric 1M,
- Acid clorhidric 0,002M
- Soluție de amidon preparată conform farmacopeei europene (vezi mai sus)
- Soluție standard de iod 0,05M
- Soluție standard de tiosulfat de sodiu 0,1M

Faza mobilă : soluție apoasă de fosfat disodic 0,06 M, ajustată la pH=2,1 cu acid ortofosforic.

Reactiv post-coloană (se folosește după trecerea amestecului pe coloană). Într-un flacon cotate de 1000 ml se dizolvă 62,5 g acetat de amoniu, 7,5 ml acid acetic și 5 ml pentan-2,4-dionă. Se aduce la semn cu apă. Reactivul se ține la întuneric și se păstrează maximum trei zile la 25°C. În acest timp nu trebuie să se observe o modificare de culoare a reactivului.

Standard concentrat de formaldehidă. Se adaugă 10 g formaldehidă într-un flacon cotate de 1000 ml și se aduce la semn cu apă. Concentrația soluției se determină astfel: se măsoară 5 ml, se adaugă 25 ml soluție standard de iod și 10 ml soluție de hidroxid de sodiu. Se lasă să stea timp de 5 min. Se acidulează cu 11 ml HCl și se titrează excesul de soluție de iod cu soluția standard de tiosulfat, folosind ca indicator soluție de amidon.

1 ml soluție de iod este echivalentă cu 1,5 ml formaldehidă [19].

Soluție standard diluată de formaldehidă. Se diluează soluția concentrată în proporție de 1/100 în faza mobilă. 1 ml din această soluție conține cca 37 mg formaldehidă.

Se calculează conținutul exact de formaldehidă.

Aparatură

- Aparatură de laborator standard,
- Pompă HPLC fără pulsații
- Pompă fără pulsații la presiune scăzută pentru reactiv (sau o a doua pompă HPLC)
- Valvă de injecție cu buclă de 10 μ l
- Reactor post-coloană care are următoarele componente :
 - ❖ un balon cu trei gâturi de 1 litru,
 - ❖ un manșon de încălzire de 1 litru,
 - ❖ două coloane Vigreux cu minim 10 platane, răcit cu aer,
 - ❖ tub din oțel inox (pentru schimbul de căldură) 1,6 mm, diam interior 0,23 mm, lungime = 400 mm,
 - ❖ tub de teflon 1,6 mm – diametrul interior 0,30 mm, lungime 5 m,
 - ❖ o buc piesă în T fără volum mort/nefolosit (Valco sau echivalent)
 - ❖ trei piese de legătură fără volum mort/nefolosit
- membrană de filtrare cu dimensiunea porilor 0,45 μ m,
- cartuș SEP-PAK sau echivalent,
- coloane gata de a fi folosite (gata asamblate) una din variantele menționate mai jos :
 - ❖ Bischoff hypersil RP 18 (tip NC, referință C 25.46 1805) (5 μ m, lungime 250 mm, diametrul intern 4,6 mm),
 - ❖ Dupon, Zorbax ODS (5 μ m, lungime 250 mm, diametrul intern 4,6 mm),
 - ❖ Phase SEP, sferisorb ODS2 (5 μ m, lungime 250 mm, diametrul intern 4,6 mm),
- Pre-coloană Bischoff K1, hypersil RP 18 (referință K1 G 6301 1805) (5 μ m, lungime 10 mm sau echivalent).
- Coloana și precoloana sunt conectate cu ajutorul unui sistem Ecotube (referință A 15020508 Bischoff) sau echivalent.
- Conexiunile după valoarea de injecție trebuie să fie cât de scurte posibil. În acest caz, tubul de oțel inox între ieșirea din reactor și intrarea în detector are scopul de a răci amestecul înainte de detectare și temperatura din detector să fie constantă.
- Detector UV-Vis,
- Sistem de înregistrare,
- Centrifugă, baie ultrasonică,
- Agitator cu vibrație (vortex sau echivalent)

Mod de lucru :

Curba de calibrare se obține prin trasarea grafică a valorilor înregistrate funcție de concentrația soluției de formaldehidă (concentrată sau diluată) [19].

Se prepară soluții standard prin diluția soluției de referință pentru formaldehidă cu faza mobilă în următoarele proporții:

- 1 ml soluție standard diluată de formaldehidă diluată la 20 ml (cca 185 μ g/ 100 ml)
- 2 ml soluție standard diluată de formaldehidă diluată la 20 ml (cca 370 μ g/ 100 ml)
- 5 ml soluție standard diluată de formaldehidă diluată la 25 ml (cca 740 μ g/ 100 ml)

- 5 ml soluție standard diluată de formaldehidă diluată la 20 ml (cca 925 µg/ 100 ml)
Soluțiile standard se pot păstra o oră la temperatura camerei și trebuie să fie proaspăt preparate.
Curba de calibrare prezintă liniaritate bună pentru concentrații între 1 și 15 µg/ml.

Prepararea probelor de analizat.

Emulsii (creme, fond de ten, tuș pentru ochi). Într-un flacon de 100 ml cu dop rodat se cântăresc cu precizie 0,001 g probă de analizat (m grame) care conțin cca 100 µg formaldehidă. Se adaugă 20 ml diclormetan și 20 ml acid clorhidric măsurate cu precizie. Se amestecă într-un agitator cu vibrație și o baie cu ultrasunete. Separă cele două faze prin centrifugare (3000 rot/min timp de 2 minute). Între timp se spală cartușul cu 2 ml metanol, apoi se condiționează cu 5 ml apă. Se trec 4 ml fază apoasă prin cartușul condiționat, se aruncă primii 2 ml și se recuperează fracția următoare [19].

Loțiuni, șampoane. Se cântărește cu maximum de exactitate posibilă într-un flacon de 100 ml prevăzut cu dop cât mai aproape de 0,001 g probă de analizat (m grame) ce conțin cca 500 µg formaldehidă. Se aduce la 100 ml cu faza mobilă. Se filtrează soluția, se injectează sau se trece printr-un cartuș condiționat prin metoda menționat anterior [19].

Toate soluțiile trebuie injectate imediat după preparare.

Condițiile în care are loc cromatografia :

- Viteza de curgere a fazei mobile: 1 ml/min,
- Viteza de curgere a reactantului : 1,5 ml/min,
- Volumul total scurs la ieșirea din detector : 1,5 ml/min,
- Volumul injectat : 10 µl,
- Temperatura de eluție : în cazul separărilor dificile se imersează coloana într-o baie de apă cu gheață și se lasă 15-20 min pentru stabilizarea temperaturii,
- Temperatura reacției post-coloană : 100°C,
- Detectarea : 420 nm.

Observație: Întregul sistem cromatografic și post-coloană trebuie spălat cu apă după utilizare. Dacă sistemul nu a fost folosit o perioadă mai mare de 2 zile se spală și cu metanol (solventul se trece prin sistemul cromatografic). Înainte de recondiționare prin sistem se trece apă pentru a evita recristalizarea.

Relațiile de calcul :

Emulsii. Conținutul de formaldehidă (% g/g) se calculează cu următoarea relație :

$$\frac{C \times 10^{-6} \times 100}{5 m} = \frac{C \times 10^{-4}}{5 m}$$

Loțiuni și șampoane. În acest caz formula care se aplică este :

$$\frac{C \times 10^{-6} \times 100}{m} = \frac{C \times 10^{-4}}{m}$$

unde m – masa probei analizate (g)

C – concentrația de formaldehidă în µg/100 ml citită de pe curba de calibrare

Repetibilitatea determinării.

Pentru un conținut de 0,05% formaldehidă, diferența între rezultatele a două determinări efectuate în paralel pe aceeași probă nu trebuie să depășească 0,001%

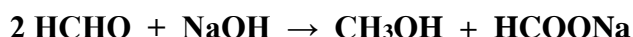
Pentru un conținut de 0,2% formaldehidă, diferența între rezultatele a două determinări efectuate în paralel pe aceeași probă nu trebuie să depășească 0,005%.

Reacții de identificare a formolului [9].

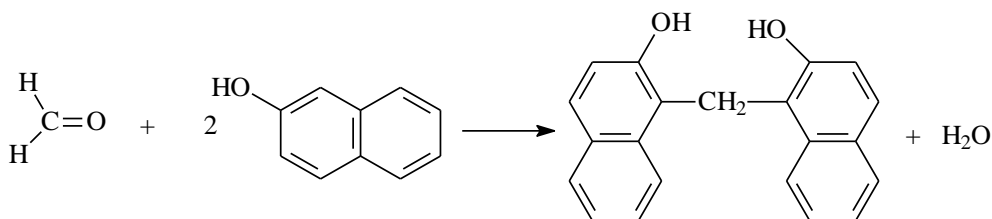
1. **Testul cu rezorcinol.** Se amestecă 1 picătură soluție apoasă de rezorcinol 0,5% cu 1-2 ml soluție diluată de formaldehidă și se toarnă cu atenție amestecul într-o eprubetă înclinată ce conține 1-2 ml acid sulfuric concentrat.

La interfața între cele două lichide se formează un inel roșu-violaceu. După un timp, dacă soluția nu este prea diluată, deasupra inelului roșu violaceu se formează încă un inel alb ce conține un precipitat flocluat) [9].

2. **Reacția cu hidroxid de sodiu.** Se fierb câteva picături soluție formaldehidă diluată cu puțină apă cu 5 ml soluție NaOH 10% timp de 5 min. Se observă că rășinile ce apar în cazul celorlalte aldehide, în acest caz nu se formează. Reacția ce are loc este de forma [9]:



3. **Testul cu β -naftol.** Se amestecă 3 picături formol cu 3 ml alcool 50%, 0,05 g β -naftol și 3-5 picături HCl concentrat. Amestecul se fierbe cu atenție și se observă formarea unui precipitat cristalin, care se filtrează, se spală și se recrystalizează din alcool diluat. Produsul obținut este metilen di- β -naftolul, cu p.t= 188°C (cu descompunere) [9].



4. **Testul cu dimedona.** O soluție de formaldehidă neutră sau slab acidă este tratată cu o cantitate mică de soluție alcoolică de 10% dimedonă (5,5-dimetil ciclohexan-1,3-diona) și amestecul se agită bine.

După 15-20 minute se filtrează precipitatul format și se recrystalizează din etanol diluat. Produsul de condensare are p.t=189°C [9].

Reglementări. UE și Brazilia permite un conținut de formaldehidă de max. 0,2% și de max 0,1% pentru cosmeticele orale și se interzice folosirea ei în produsele tip aerosol.

Produsele care conțin mai mult de 500 ppm formaldehidă trebuie să aibă avertizări de tipul „Conține formaldehidă”.

De asemenea este permis un conținut de formaldehidă de max. 5% în produsele pentru întărirea unghiilor. În Japonia este interzisă utilizarea formalhidei [27].

Laborator nr. 2

DETERMINAREA ALUMINIULUI ȘI ZINCULUI

Metoda gravimetrică de determinare a aluminiului și zincului în deodorante.

Reactivi [26]:

- 8-Hidroxichinolină soluție.* Se dizolvă 5 g 8-hidroxichinolină în 12 ml acid acetic, se diluează amestecul cu apă la 100 ml. Dacă soluția nu este clară se filtrează. Soluția se poate păstra maximum 2 săptămâni.
- Acetat de amoniu soluție* aprox. 2N. Se dizolvă 150-160 g acetat de amoniu în 1 litru de apă și se filtrează dacă soluția nu este limpede.
- Acid clorhidric – aprox. 2N
- Hidroxid de amoniu – aprox. 2N. Consumul de hidroxid de amoniu NH_4OH necesar pentru a neutraliza 20 ml HCl 2N (c) trebuie cunoscut cu precizie de ± 2 ml.

Pregătirea probelor de analizat.

a. *Lichide.* Se diluează 5 ml probă cu apă până la 250 ml într-un flacon volumetric. Dacă separă o fază uleioasă se filtrează înainte de a fi analizată.

b. *Creme și paste.* Se cântăresc, cât mai exact, 2-3 g probă într-un flacon de 250 ml. Se adaugă 5 ml HCl (sau HNO_3 în cazul în care se determină clorurile) și cca 50 ml apă și se încălzește până ce uleiurile se lichefiază și separă.

Se răcește amestecul până la solidificarea completă a uleiurilor și apoi se decantează stratul apos, prin intermediul unei pâlnii de separare, iar stratul inferior se trece peste o hârtie de filtru cutată, într-un flacon de 250 ml.

Filtratul se returnează în flaconul original și se macerează complet.

Se repetă extracția de două ori, se decantează după cum a fost prezentat mai sus și final se spală foarte bine reziduu și hârtia cu apă.

Extractele se combină și se răcesc la temperatura camerei, se diluează cu apă până ajunge la volumul cotelat și se amestecă [26].

Observație. Nu este necesar să se returneze hârtia de filtru în flacon după aceste extracții.

c. *Solidele.* Se cântăresc cu precizie 2-3 g probă de analizat într-un balon de 250 ml, se adaugă 5 ml HCl (sau HNO_3 dacă se urmărește și determinarea conținutului de cloruri) și cca 50 ml apă.

Amestecul se încălzește la fierbere, apoi se răcește și se filtrează printr-un filtru cutat într-un flacon cotelat de 250 ml.

Observație. Dacă filtratul este tulbure / nu este complet transparent se refiltrează printr-o hârtie de filtru cu porii mai mici.

Se spală foarte bine balonul și hârtia cu apă. Se răcește flaconul și conținutul acestuia la temperatura camerei, se aduce la semn cu apă și se amestecă.

Determinarea cantitativă

(a) *Determinarea în absența metalelor ce pot interfera în timpul analizei.*

Se ia o porțiune din soluția probei de analizat care conține 12-25 mg Al sau 20-60 mg Zn.

Se adaugă 1-2 picături de fenolftaleină și apoi sol NH_4OH 2N până la pH neutru sau până se observă apariția unei turbidități fine, dar permanente.

Se adaugă 5 ml acid acetic (1+9) se diluează amestecul la cca 100 ml și se încălzește la 70-90°C.

Se adaugă 10 ml soluție 8-hidroxicinolină și apoi, treptat, se adaugă soluția de acetat de amoniu până la un exces de 20 ml față de volumul necesar pentru a precipita tot compusul (vezi obs de mai jos). Dacă se observă formarea precipitatului persistent la adăugarea 8-hidroxicinolinei, se adaugă doar 20 ml sol acetat de amoniu.

Se încălzește sub punctul de fierbere, timp de 2-5 min și se lasă să stea timp de 30-60 min [19].

Observație: este necesară prezența unui exces moderat de 8-hidroxicinolină pentru a se obține precipitatul. Dacă se adaugă suficient reactiv soluția va avea culoarea galbenă; dacă nu se repetă determinarea folosind o cantitate mai mare de soluție 8-hidroxicinolina.

Se filtrează printr-o pâlnie Gooch, cântărită în prealabil, se spală bine cu apă, se usucă timp de 1-2 ore, la 130-140°C, se răcește și se cântărește.

Se usucă încă 30 min, se răcește și se cântărește.

Se repetă ciclul uscare-răcire-cântărire până ce diferența dintre două cântăriri nu depășește $\pm 0,3$ g (se aduce la pond constant). (variantă alternativă – se lasă precipitatul la uscat peste noapte).

$$Al = M_t \text{ pp} \times 0,05871$$

$$Zn = M_t \text{ pp} \times 0,1848$$

Notă. Valoarea finală a pH-ului soluției din care sunt precipitate metalele trebuie să fie 4,9-5,1. Volumul de soluție de acetat de amoniu necesară pentru a atinge această valoare a pH-ului trebuie determinată de fiecare dată când se prepară un nou set de reactanți. Dacă acetatul de amoniu este pur vor fi necesari 20 ml soluție.

(b) *Determinare în prezență de magneziu.*

Se precipită ca în metoda (a) și se lasă să stea cca 30 min.

Se decantează majoritatea lichidului printr-o hartie de filtru (dacă este necesar precipitatul poate fi și el transferat total sau parțial) iar filtratul se aruncă.

Se plasează flaconul folosit pentru precipitare sub pâlnie și se dizolvă precipitatul de pe filtru cu soluție fierbinte de HCl 2N (de obicei sunt de ajuns 20 ml dacă se adaugă în porțiuni mici).

Se spală hârtia și pâlnia cu 20-30 ml apă.

Se adaugă 2 ml soluție 8-hidroxicinolină, 5 ml acid acetic (1+9) și un volum de soluție NH₄OH 2N echivalentă cu cantitatea de HCl 2N folosită pentru dizolvarea precipitatului (nu se adaugă în exces).

Se diluează amestecul la 100 ml, se încălzește la 70-90°C și se continuă ca la metoda (a) începând cu faza de adăugare lentă a acetatului de amoniu [26].

Metoda gravimetrică de determinare a zincului în deodorante

Reactivi

Soluție de 8-hidroxicinolină. Se dizolvă 5 g 8-hidroxicinolină în 12 ml acid acetic, se diluează la 100 ml cu apă și se filtrează dacă soluția nu este clară. (soluția se poate folosi timp de o săptămână). Dacă produsul nu este pur se recristalizează din alcool, folosind 6 ml solvent pentru fiecare gram de bază, purificarea făcându-se chiar înainte de pregătirea soluției [25].

Determinarea

Se pipetează o parte din soluția probei de analizat (pregătită ca la metoda anterioară), care conține cca 20-50 g Zn, într-un balon de 400 ml.

Se ajustează pH-ul soluției să fie ușor acid, se adaugă 1 g tartrat de amoniu dacă există și Al în amestec și apoi se adaugă câte 2 ml soluție 8-hidroxi cinolină pentru fiecare 10 mg Zn prezente.

Se diluează amestecul la 200 ml și se încălzește la 60-80°C. Se neutralizează excesul de acid prin adăugare de NH₄OH până ce sarea complexă de Zn, care se formează la adăugarea fiecărei picături, se redizolvă la agitare.

Se adaugă treptat, sub o bună agitare, 45 ml soluție acetat de amoniu și amestecul se lasă să se răcească la temperatura camerei.

Se măsoară pH-ul soluției; dacă nu este 5,7-5,9 se ajustează cu soluție de NH₄OH și se lasă amestecul să stea 10-20 min pentru a atinge echilibrul.

Se decantează printr-un creuzet de filtrare Gooch, cântărit în prealabil și se spală precipitatul în balon de două ori cu apă fierbinte, de fiecare dată decantând prin creuzet. Final se transferă precipitatul în creuzet și se spală din nou cu apă fierbinte (volumul total al apelor de spălare trebuie să fie > 200 ml).

Se usucă creuzetul și precipitatul timp de 2 h la 130-140°C, se răcește și se cântărește.

Se reîncălzește timp de 30 min la 130-140°C, se răcește și se recântărește și se repetă până ce diferența între două cântăriri succesive rămâne constantă [25].

$$\text{Cantitate Zn} = \text{Masa precipitatului} \times 0,1712.$$

Metoda colorimetrică de determinare a zirconului solubil în antiperspirantele tip aerosol

Reactanți

(a) *Roșu de Alizarină (alizarin sulfonat de sodiu) soluție.* Se dizolvă 1,5 g indicator Roșu de Alizarină în 300 ml apă fierbinte. Se răcește, se filtrează printr-un strat dublu de hârtie de filtru de porozitate medie (Whatman nr.12, 24 sau echivalent). Se diluează filtratul la 1 litru cu apă și se refiltrează. Soluția este stabilă și poate folosi timp de 1 lună [26].

(b) *Clorura de zirconil octahidratată.* Pentru a prepara soluția standard se cântăresc cât mai exact 500-600 mg ZrOCl₂ x 8 H₂O într-un pahar de 400 ml și se dizolvă în 50 ml apă.

Se adaugă 4 g NH₄NO₃ și se încălzește pe baie de apă la cca 50°C. Încet, sub agitare continuă, se adaugă 100 ml NH₄OH și se continuă încălzirea 20 min.

Se filtrează fierbinte printr-o hârtie Whatman nr 42 sau echivalent.

Se transferă complet precipitatul cu ajutorul a 2-3 porțiuni NH₄NO₃ 2% în NH₄OH (2+98).

Se împătorește cu atenție hârtia de filtru și se plasează într-un creuzet de Pt de 50 ml.

Se usucă în etuvă la 105°C.

Se acoperă parțial creuzetul și se încălzește până ce hârtia este complet carbonizată.

Se continuă încălzirea cu becul reglat la maxim până ce creuzetul ajunge la pond constant (masă constantă).

$$\% \text{ Zr} = \text{masa reziduu ZrO} \times 74,03 / \text{masa ZrOCl}_2 \times 8 \text{ H}_2\text{O}.$$

(c) *Prepararea curbei standard.* Se dizolvă o cantitate de ZrOCl₂ x 8 H₂O ce conține 200 mg Zr în 70 ml apă într-un flacon cotate de 200 ml. Se adaugă 110 ml HCl, se răcește și se diluează până la semn cu apă. Se obține o soluție de concentrație 1 mg/ml care se poate păstra timp de o săptămână.

În 4 flacoane cotate de 100 ml se introduc 2, 5, 10 și 15 ml soluție preparată anterior. Se diluează fiecare la semn cu soluție HCl (55+45 apă) și se amestecă bine.

Ca blank se folosește o soluție de HCl obținută din introducerea într-un flacon cotate a 55 ml soluție concentrată de HCl și aducere la semn cu apă.

Se pipetează în flacoane cotate de 100 ml câte 5 ml din fiecare soluție și de blank și se măsoară semnalul color dat de soluțiile ce au următoarele concentrații: 0, 100, 250, 500 și 750 μg Zr/100 ml.

În fiecare pahar se adaugă câte 10 ml soluție roșu de alizarină S preparată după metoda prezentată la pct.a. și câte 8 ml apă.

Se amestecă și se plasează pe o baie de apă încălzită la $75 \pm 3^\circ\text{C}$.

Se monitorizează temperatura soluțiilor cu un termometru plasat într-un flacon volumetric de 100 ml ce conține 23 ml apă adăugată la temperatura camerei și plasată în baia de apă simultan cu probele de analizat. În timpul încălzirii se agită ocazional probele.

După ce soluțiile ajung la 70°C se mențin pe baia de apă încă $6,5 \pm 1$ min. Se scot probele de pe baia de apă și se lasă să se răcească 20 min la temperatura camerei. Se diluează toate probele cu apă până la semn și se amestecă [25].

Se măsoară absorbanta soluției de analizat A în cuve de 2 cm față de soluția blank, la 525 nm sau înregistrând întreg spectrul în domeniul 700-460 nm. Se plasează semnalul dat de A în curba de etalonare și se determină conținutul în $\mu\text{g Zr} / 100 \text{ ml}$.

(d) *Prepararea probei de analizat.* Se îndepărtează capacul și învelitoarea de hârtie de pe recipientul de aerosol. Se cântărește greutatea flaconului cu precizie de 0,01 g. Se pune la loc capacul și se îngheață conținutul flaconului prin plasarea acestuia în poziția răsturnată, într-un pahar cu amestec de zăpadă carbonică și acetonă și se lasă la răcit cel puțin o oră.

Se transferă flaconul într-un pahar mai mic și, cu atenție, se îndepărtează fundul flaconului cu ajutorul unui desfăcător de conserve (operația se efectuează la nișă). Fundul flaconului nu se detașează complet, menținându-se parțial conectat cu restul recipientului. Se lasă componentele volatile să se elimine la temperatura camerei.

După ce a încetat emisia de gaze, se încălzește flaconul pe baie de apă, la temperaturi medii, pentru a elimina gazele cu puncte de fierbere mai mari. Se crește temperatura treptat și se menține până ce nu se mai observă degajarea bulelor.

Se plasează paharul cu tot cu flacon într-o etuvă și se menține 45 min la 70°C . Se ridică apoi temperatura la 115°C și se menține 2,5 ore, agitând ocazional cu o spatulă metalică. Se scoate din etuvă și se răcește la temperatura camerei.

Se amestecă foarte bine conținutul, inclusiv eventualele porțiuni din probă aderente pe pereți pentru a se obține o concentrație uniformă a probei. Se cântărește flaconul, împreună cu spatula. Se agită amestecul cca 1 min și se cântărește din nou.

Se repetă agitarea urmată de cântărire până ce diferența de greutate înregistrată la două cântăriri succesive nu depășește 0,01 g.

Se notează greutatea și se transferă imediat conținutul într-un flacon de cântărire cu dop (nu este necesar transferul cantitativ al probei). Se astupă flaconul și se deschide flaconul doar în caz de necesitate pentru a evita pierderea de produs [25].

Se scoate dopul recipientului pentru aerosol și se spală foarte bine cu apă și alcool pentru a îndepărta toate urmele de componente ale aerosolului. Se usucă capacul, recipientul, spatula la 110°C , până la masă constantă.

Se calculează masa concentratului prin scăderea masei înregistrate final din masa înregistrată după uscarea componentelor. Masa de amestec inițial se calculează scăzând masa finală (fără capac) din masa inițială.

(e) *Determinare.* Se notează masa probei de analizat într-un flacon de cântărire. Se amestecă foarte bine și se ia cca 1 g cu o spatulă. Se calculează cantitatea luată în analiză prin diferența între masele înainte și după ce s-a luat proba.

Se transferă proba de analizat cât mai complet de pe spatulă în jumătatea inferioară a unui pahar de 600 ml. Se șterge spatula cu o bucată de hârtie de filtru, care se introduce și ea în balon. Se adaugă 5 ml alcool și se omogenizează proba în alcool cu ajutorul unei baghete de sticlă. Se adaugă încet 200 ml HCl, sub agitare

viguroasă. Se încălzește la fierbere pe baie de apă. Se fierbe 2-3 min și se transferă printr-o pâlnie într-un flacon volumetric de 1 L. Se completează transferul cu două porțiuni de HCl fierbinte: prima de 200 ml și a doua de 150 ml. Se încălzește pe baie de apă și se agită energic timp de 3-4 min. Se clătește paharul cu 450 ml H₂O, se adaugă la flacon și se amestecă foarte bine. Se răcește la temperatura camerei, se diluează la semn cu HCl și se amestecă foarte bine.

Se lasă materialul nedizolvat să sedimenteze și să coaguleze. Se filtrează printr-un strat dublu de hârtie de filtru Whatman nr.12 sau echivalent și se aruncă primii 50 ml.

Se fac diluțiile corespunzătoare cu sol HCl (55+45) pentru a obține o conc de Zr de 40-100 μg / ml. Se pipetează 5 ml soluție probă într-un flacon cotat de 100 ml și se procedează după metoda descrisă anterior (începând cu adăugarea roșului de alizarină) [26].

$$\% \text{ Zr} = (C/W_s) \times (W_c/W_i) \times (F/10^4).$$

unde: C – μg Zr/100 ml citit direct pe curba de etalonare,
W_s, W_c, W_i = g probă, concentrat și intact luate în calcul,
F = factorul soluției diluate.

Determinarea aluminiului

Această metodă poate fi aplicată pentru determinarea aluminiului prezent în complexii aluminiu zirconiu clorură hidroxid, care se găsesc în concentrație masică de maximum 12% aluminiu în antiperspirante ce nu sunt condiționate ca aerosoli [19].

Principiul metodei.

Aluminiul este extras din produs în condiții acide și se determină prin spectroscopie de absorbție atomică în flacără.

Reactivi. Toți reactivii trebuie să fie de puritate analitică.

- Acid clorhidric concentrat (d₂₀=1,18 g/ml)
- *Soluție HCl 1% v/v:* se adaugă 10 ml HCl conc la 500 ml apă într-un pahar, amestecând continuu. Se transferă soluția într-un flacon volumetric de 1 litru și se aduce la semn cu apă.
- *Soluție standard de Al conc,* 1000 mg/ml în soluție de acid azotic 0,5M („SpectrosoL” sau echivalent).
- *Reactiv clorură de potasiu:* se dizolvă 10 g clorură de potasiu în 250 ml sol HCl 1% v/v.

Aparatura. Pe lângă aparatura normală de laborator este necesar un spectrometru de absorbție atomică echipat cu o lampă – catod din aluminiu goală în interior [19].

Mod de lucru. Pentru a determina conținutul de Al se folosește soluție standard concentrată descrisă anterior [19].

Într-un flacon volumetric de 100 ml se transferă 5 ml soluție standard conc, măsurată cu o pipetă și 10 ml reactiv clorură de potasiu. Se aduce la semn cu sol HCl 1% v/v. și se amestecă.

Condiții pentru spectroscopia de absorbție atomică. Flama : acetilenă / oxid de azot. Lungime de unda : 309,3 nm. Pentru absorbție maximă se folosește un debit mare de combustibil.

Calibrare. Într-o serie de flacoane cotate de 100 ml se pipetează 1, 2, 3, 4 și 5 ml din soluția standard concentrată de aluminiu. În fiecare flacon se adaugă câte 10 ml reactiv clorură de potasiu și se aduce la semn cu soluție HCl 1% v/v și se amestecă. Aceste soluții vor conține 10, 20, 30, 40 și 50 μg Al / ml soluție.

Similar se prepară soluția blank, fiind omisă etapa de adăugare a soluției standard concentrate de Al.

Se măsoară absorbanta soluției blank și se folosește ca punctul de zero conc. Al pe curba de calibrare. Se măsoară absorbanta fiecărei soluții preparate, se notează pe grafic și se trasează curba de calibrare absorbanta funcție de concentrație.

Determinare. Se măsoară absorbanta probei de analizat și de pe curba de calibrare se citește concentrația de Al corespunzătoare absorbanței înregistrate de către proba de analizat [19].

Calcul. Conținutul de aluminiu în probă se calculează în procente de masă, folosind următoarea formulă :

$$\% Al = \frac{c}{5 \times m}$$

unde : m = masa în grame de probă luată pentru analiză.

c = concentrația de Al în proba analizată în $\mu\text{g/ml}$, citită de pe curba de calibrare.

Repetabilitate. Pentru un conținut de aluminiu de 3,5%, diferența între rezultatele a două determinări efectuate în paralel pe aceeași probă nu trebuie să fie mai mare de 0,1 %.

Determinarea Zincului

Această metodă poate fi folosită pentru a determina zincul prezent sub formă de cloruri, sulfati sau 4-hidroxibenzensulfonat sau un amestec din acești compuși, prezenți în produsele cosmetice [19].

Conținutul de zinc din probă se poate determina gravimetric, sub formă de bis(2-metil-8-chinolil oxid) și este exprimat în procente masice de zinc în probă.

Principiul metodei. Zincul prezent în soluție este precipitat în mediu acid ca bis(2-metil-8-chinolil oxid) de zinc.

După filtrarea precipitatului, acesta este uscat și cântărit.

Reactivi.

- Soluție concentrată de amoniac 25% g/g (d=0,91),
- Acid acetic glacial
- Acetat de amoniu
- 2-metil chinolin-8-ol
- *Soluție amoniac 6% g/vol.* Se introduc 240 g amoniac concentrat într-un flacon cotat de 1000 ml și se aduce la semn cu apă distilată. Soluția se amestecă foarte bine.
- *Soluție acetat de amoniu 0,2 M.* Se dizolvă 15,4 g acetat de amoniu în apă distilată, se introduce soluția într-un flacon cotat de 1000 ml și se amestecă.
- *Soluție 2-metilchinolin-8-ol.* Se dizolvă 5 g 2-metilchinolin-8-ol în 12 ml acid acetic glacial și se transferă cu ajutorul apei distilate într-un flacon de 100 ml. Se aduce la semn cu apă distilată.

Aparatură și sticlărie

- ✓ Flacoane cotate de 100 și 1000 ml,
- ✓ Pahare de 400 ml,
- ✓ Cilindri gradați de 50 și 150 ml,
- ✓ Pipete gradate de 10 ml,
- ✓ Creuzete de filtrare G-4,
- ✓ Flacon de filtrare la vid 500 ml,
- ✓ Pompă de vid cu apă,
- ✓ Termometru gradat între 0 și 100°C,
- ✓ Exicator cu indicator al nivelului de umiditate și silicagel sau echivalent,

- ✓ Etuvă reglată la o temperatură de $150 \pm 2^\circ\text{C}$,
- ✓ pH-metru,
- ✓ Plită electrică,
- ✓ Hârtie de filtru Whatman nr.4 sau echivalent.

Mod de lucru.

Se cântăresc într-un pahar de 400 ml $5 \div 10$ g probă de analizat (M grame), care conțin cca $50 \div 100$ mg Zn, se adaugă 50 ml apă distilată și se amestecă.

Dacă este necesar se filtrează la vid și se reține filtratul. Se repetă etapa de extracție cu încă 50 ml apă distilată. Se filtrează și se combină filtratele.

Pentru fiecare 10 mg Zn prezente în soluție se adaugă 2 g sol 2-metilchinolin-8-ol și se amestecă.

Se diluează amestecul cu 150 ml apă distilată, se încălzește la 60°C și se adaugă 45 ml sol acetat de amoniu 0,2 M, agitând continuu.

Se ajustează pH-ul soluției la 5,7-5,9 cu soluție amoniac 6%, agitând continuu, pH-ul soluției măsurându-se cu un pH-metru.

Se lasă soluția să stea timp de 30 min., se filtrează cu ajutorul pompei de vid prin intermediul unui creuzet de filtrare G-4, care a fost uscat înainte de folosire la 150°C și cântărit după răcire (M_0 grame). Se spală precipitatul cu apă distilată, la 95°C . Se plasează creuzetul într-o etuvă reglată la 150°C și se usucă timp de o oră.

După ce se scoate din etuvă, creuzetul de filtrare se plasează în exicator și după ce s-a răcit la temperatura camerei se cântărește (M_1 grame).

Calcul.

Conținutul de zinc din probă se calculează ca procent masic % cu ajutorul următoarei formule [19]:

$$\% \text{ Zn} = \frac{(M_1 - M_0) \times 17,12}{M}$$

unde : M = masa în grame de probă de analizat,

M_0 = masa în grame a creuzetului de filtrare uscat gol,

M_1 = masa în grame a creuzetului de filtrare cu precipitat.

Repetabilitate

Pentru un conținut de Zn de cca 1% g/g, diferența între rezultatele a două determinări efectuate în paralel pe aceeași probă nu trebuie să fie mai mare de 0,1%.

Laborator nr. 3

IDENTIFICAREA ȘI DETERMINAREA ACIDULUI p-HIDROXIBENZENSULFONIC

Metoda detaliată mai jos este aplicabilă pentru identificarea și determinarea acidului 4-hidroxi benzensulfonic în unele produsele cosmetice, cum ar fi: aerosoli sau loțiuni pentru față [17].

Acidul 4-hidroxi benzensulfonic determinat prin metoda prezentată mai jos va fi exprimat ca procent masic de 4-hidroxi benzensulfonat de zinc anhidru în produs [19].

Principiul metodei. Mostrele de probă analizate sunt concentrate, la presiune redusă, dizolvate în apă și purificate prin extracție cu cloroform. Determinarea acidului 4-hidroxi benzen sulfonic se realizează prin metoda iodometrică pe o probă din soluția apoasă filtrată [19].

Reactivi necesari:

- HCl conc 36% ($d=1,18 \text{ g/cm}^3$),
- cloroform,
- n-butanol,
- acid acetic glacial,
- iodură de potasiu,
- bromură de potasiu,
- carbonat de sodiu,
- acid sulfanilic,
- azotit de sodiu,
- bromat de potasiu sol 0,1N,
- tiosulfat de sodiu sol 0,1N,
- soluție apoasă de amidon 1% (g/vol),
- soluție apoasă de carbonat de sodiu 2% (g/vol),
- soluție apoasă de azotit de sodiu 4,5% (g/vol),
- soluție de ditazonă (3-anilino-1-fenil imino-tiouree) în cloroform 0,05% (g/vol),
- *solvent de dezvoltare:* n-butanol : acid acetic glacial : apă = 4:1:5 v/v; după amestecare în pâlnia de separare se păstrează faza superioară și se îndepărtează faza inferioară.
- *Reactiv Pauly:* se dizolvă 4,5 g acid sulfanilic în 45 ml HCl concentrat, sub încălzire ușoară, după care soluția obținută se diluează cu apă până la 500 ml. Se iau 10 ml soluție finală și se răcesc în baie de apă cu gheață, și apoi se adaugă, sub agitare, 10 ml soluție rece de azotit de sodiu. Amestecul obținut se lasă să stea 15 minute, la 0°C (la această temperatură soluția este stabilă timp de 1-3 zile). Imediat înainte de a fi folosită pentru stropire se adaugă 20 ml soluție carbonat de sodiu.
- Se pregătesc plăcuțele de celuloză pentru cromatografie în strat subțire (TLC) cu dimensiune 20 x 20 cm și grosime a stratului adsorbant de 0,25 mm.

Aparate și echipamente:

- ✓ Baloane de 100 ml cu fund rotund și dop rodat de sticlă,
- ✓ Pâlnie de separare 100 ml,
- ✓ Flacon conic cu dop de sticlă 250 ml,

- ✓ Biurete 25 ml,
- ✓ Pipete cu bulb de 1, 2 și 10 ml,
- ✓ Pipete gradate de 5 ml,
- ✓ Micro-seringi de 10 μ l cu gradații de 0,1 μ l,
- ✓ Termometru de la 0° la 100°C,
- ✓ Baie de apă cu încălzire electrică,
- ✓ Etuvă electrică, bine ventilată, reglată la 80°C,
- ✓ Aparatura pentru realizarea cromatografiei în strat subțire.

Prepararea probelor: În metoda descrisă mai jos pentru identificarea și determinarea acidului hidroxibenzensulfonic în aerosoli se folosește pentru analiză reziduu obținut după evaporarea la presiune atmosferică a solvenților și propulsorului, după eliberarea din flaconul sub presiune [19].

Identificarea calitativă:

Cu ajutorul unei microseringi se adaugă 5 μ l reziduu sau probă în fiecare din cele 6 puncte de pe linia de start a cromatogramei, aflate la 1 cm distanță de marginea inferioară a plăcuței cromatografice.

Se introduce plăcuța cromatografică în cuva de dezvoltare care conține deja sistemul de eluare descris mai sus. Cromatograma se ține în cuvă până ce frontul de solvent migrează cca 15 cm de la linia de plecare.

Se îndepărtează plăcuța din cuva de dezvoltare și se usucă la 80°C până ce nu se mai percepe mirosul de acid acetic. Se pulverizează plăcuța cu soluție de carbonat de sodiu și se usucă sub jet de aer.

Se acoperă jumătate din cromatogramă cu o plăcuță de sticlă și se pulverizează cu soluție 0,05% ditizonă. Apariția unor puncte roșii-violacee pe cromatogramă indică prezența ionilor de zinc.

Se acoperă jumătatea dezvoltată a cromatogramei cu plăcuța de sticlă și se pulverizează pe jumătatea rămasă cu reactiv Pauly. Prezența acidului p-hidroxibenzensulfonic este indicată prin apariția unui spot de culoare galben-brună cu R_f de cca 0,26, în timp ce prezența unui spot galben cu R_f de cca 0,45 indică prezența acidului 3-hidroxibenzensulfonic [19].

Determinarea cantitativă.

Se cântăresc 10 g probă sau reziduu într-un balon cu fund rotund de 100 ml și se evaporă până aproape de sec cu ajutorul unui rotavapor montat pe o baie de apă, reglată la 40°C [19].

Se măsoară cu pipeta 10 ml (V_1 , ml) apă în balon și se dizolvă reziduu de la evaporare sub o ușoară încălzire.

Se transferă cantitativ soluția într-o pâlnie de separare și se extrage de două ori cu câte 20 ml cloroform. După fiecare extracție se îndepărtează fracția de cloroform.

Se filtrează soluția apoasă printr-un filtru cutat.

Funcție de cantitatea de acid p-hidroxibenzensulfonic care bănuim că se găsește în probă se măsoară cu pipeta 1 sau 2 ml (V_2) filtrat care se introduce într-un flacon conic de 250 ml și se diluează cu 75 ml apă.

Se adaugă 2,5 ml HCl 36% și 2,5 g bromură de potasiu, se amestecă și se încălzește la 50°C pe baie de apă. Cu ajutorul unei biurete se adaugă bromat de potasiu 0,1N până ce soluția, aflată tot la 50°C, devine galbenă.

Se adaugă încă 3 ml soluție bromat de potasiu, se astupă cu dopul rodat și se lasă să stea 10 minute pe baie de apă la 50°C.

Dacă după 10 minute soluția se decolorează se mai adaugă 2 ml soluție bromat de potasiu, se astupă flaconul și se mai menține 10 minute pe baie, la 50°C. Se notează cantitatea totală de bromat de potasiu adăugată (a).

Se răcește soluția la temperatura camerei, se adaugă 2 g iodură de potasiu și se amestecă.

Iodul format se titrează cu soluție tiosulfat de sodiu 0,1N. Aproape de sfârșitul titrării se adaugă câteva picături de soluție de amidon ca indicator. Se notează cantitatea folosită de tiosulfat (b).

Calculule

Cantitatea de hidroxibenzensulfonat de zinc din probă sau reziduu se calculează ca procent masic (% g/g) cu ajutorul următoarei formule [19]:

$$\% \text{ hidroxibenzensulfonat de zinc} = \frac{(a - b) \times V_1 \times 0,00514 \times 100}{m \times V_2}$$

unde: a – cantitatea totală de soluție bromat de potasiu 0,1 N adăugată (ml),

b – cantitatea totală de sol. tiosulfat de sodiu 0,1 N adăugată la titrare (ml),

m – cantitatea de probă sau reziduu analizată (mg),

V₁ – volumul de probă sau reziduu luat pentru analiză (ml),

V₂ – volumul de reziduu de evaporare dizolvat, luat pentru analiză (ml),

Observație: în cazul aerosolilor, rezultatul măsurătorilor reziduuului, exprimat în % masice, trebuie exprimat funcție de cantitatea de produs original. În scopul efectuării acestei conversii, se face referire la regulile de preluare de mostre din aerosoli.

Repetabilitate. În cazul unui produs cosmetic ce conține cca 5% hidroxibenzensulfonat de zinc, diferența ce apare între rezultatele a două determinări realizate în paralel, pe aceeași probă, nu trebuie să fie mai mare de 0,5%.

Interpretarea rezultatelor.

Conform directivei europene nr 76/768/EEC privind produsele cosmetice, concentrația masică maximă aprobată de 4-hidroxibenzensulfonat de zinc în loțiunile de față și deodorante este de 6% [27].

Datorită formulării produselor cosmetice, alături de determinarea cantității de acid 4-hidroxibenzensulfonic se impune și o determinare a cantității de zinc.

Prin multiplicarea valorii obținute pentru hidroxibenzen sulfonatul de zinc cu un factor egal cu 0,1588, se obține o valoare ce reprezintă conținutul minim teoretic de zinc ce trebuie să se regăsească în produsul cosmetic.

Conținutul real de zinc din produsul cosmetic se măsoară gravimetric și trebuie să fie mai mare sau egal cu valoarea teoretică deoarece produsul cosmetic mai poate conține clorură sau sulfat de zinc. [19]

Identificarea și determinarea 2-fenoxietanolului, 1-fenoxipropan-2-olului și a 4-hidroxibenzoatului de metil, etil, propil, butil și benzil

Această metodă folosește cromatografia în strat subțire pentru identificarea 2-fenoxietanolului, 1-fenoxipropan-2-olului, și parabenilor de metil, etil, propil, butil și benzil în produsele cosmetice [19].

Principiul metodei. Conservanții menționați anterior sunt extrași din proba cosmetică acidifiată cu acetonă.

După filtrare soluția de acetonă este amestecată cu apă, iar acizii grași sunt precipitați în mediu alcalin ca săruri de calciu.

Amestecul alcalin acetonă/apă este extras cu dietileter pentru a îndepărta substanțele lipofile. După acidifiere, conservanții sunt extrași cu dietileter.

O porțiune din extract este pusă pe o plăcuță de silicagel.

După dezvoltarea plăcuței, cromatograma se expune la lumină UV sau se vizualizează utilizând reactiv Millon [19].

Reactivi:

Toți reactivii trebuie să fie de puritate analitică. Apa trebuie să fie distilată sau cu același grad de puritate.

- Acetonă,
- Dietileter,
- n-Pentan,
- Metanol,
- Acid acetic glacial,
- Acid clorhidric soluție 4 mol/l,
- Hidroxid de potasiu soluție 4 mol/l,
- Clorură de calciu dihidratată ($\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$)
- Reactiv Millon – reactiv de detecție. Reactivul Millon (nitrat de mercur II) este o soluție gata preparată disponibilă comercial.
- 2-Fenoxietanol,
- 1-Fenoxipropan-2-ol
- 4-Hidroxibenzoat de metil (metilparaben)
- 4-Hidroxibenzoat de etil (etilparaben)
- 4-Hidroxibenzoat de n-propil (propilparaben)
- 4-Hidroxibenzoat de benzil (benzilparaben)
- *Soluții de referință:* se prepară soluții de concentrație 0,1% g/vol din toți conservanții menționați mai sus în metanol
- *Solvent de dezvoltare:* se amestecă 88 volume de n-pentan cu 12 volume de acid acetic glacial.

Aparatură și sticlărie:

- Sticlărie de laborator,
- Baie de apă capabilă să mențină temperatura de 60°C,
- Cuvă de dezvoltare pentru cromatogramă,
- Sursă de lumină UV 254 nm,
- Plăcuțe cromatografice 20 x 20 cm, acoperite cu un strat de 0,25 mm silicagel 60F254
- Etuvă capabilă să mențină temperatura de 105°C,
- Uscator de păr cu aer cald,
- Trafalete pentru vopsea cu lungime de cca 10 cm și diametrul exterior de aproximativ 3,5 cm. Grosimea stratului de material textil trebuie să fie 2-3 cm (dacă este necesar se tunde din lungimea firului)
- Tuburi din sticlă de 50 ml cu capac înfiletat,
- Plită de încălzire electrică, cu reglare termostată la temperaturii. Temperatura se setează la 80°C. Pentru a obține o distribuție uniformă a căldurii, platanul fierbinte se acoperă cu bucăți de aluminiu cu dimensiuni 20 x 20 cm și grosime de aproximativ 6 mm.

Mod de lucru:

Prepararea probei: Se cântăresc aproximativ 1 g probă într-un flacon de sticlă de 50 ml cu capac înfiletat. Se adaugă 4 picături de soluție de HCl și 40 ml acetonă.

Pentru produsele cosmetice puternic bazice (cum e de ex. săpunul de toaletă) se adaugă 20 picături de soluție HCl.

Se închide tubul, se încălzește amestecul la cca 60°C pentru a facilita extracția conservanților în faza de acetonă și se agită viguros timp de 1 minut [19].

Se măsoară pH-ul soluției cu hârtie indicatoare de pH și se ajustează cu soluție de HCl până la $\text{pH} \leq 3$. Se agită viguros timp de încă un minut.

Se răcește soluția la temperatura camerei și se filtrează printr-o hârtie de filtru într-un flacon conic.

Se transferă 20 ml filtrat într-un flacon conic de 200 ml, se adaugă 60 ml apă și se amestecă. Se ajustează pH-ul amestecului la ≈ 10 cu soluție de hidroxid de potasiu și hârtie indicatoare de pH.

Se adaugă 1 g clorură de calciu dihidrată și se agită viguros.

Se filtrează soluția printr-o hârtie de filtru într-o pâlnie de separare de 250 ml ce conține 75 ml dietileter și se agită viguros timp de un minut.

Se permite celor două faze să separe și se colectează stratul apos într-un flacon conic de 200 ml. Se ajustează pH-ul soluției la ≈ 2 cu soluție de HCl și hârtie indicator de pH.

Ulterior se adaugă 10 ml dietileter și se agită viguros timp de 1 minut. Se permite fazelor să separe și se transferă aproximativ 2 ml din stratul de dietileter într-o fiolă de 5 ml.

Cromatografia în strat subțire (TLC): Se plasează o plăcuță TLC pe placa de aluminiu încălzită. Se aplică câte 10 μl din fiecare soluție de referință și 100 μl din soluția probei pe linia de start a plăcuței de TLC. Dacă se dorește se poate folosi un jet de aer cald pentru a facilita evaporarea solventului. Se îndepărtează plăcuța TLC de pe plita încălzită și se răcește la temperatura camerei. Se transferă 100 ml solvent de dezvoltare într-o cuva cromatografică [19].

Plăcuța TLC se introduce imediat în camera cromatografică nesaturată și se dezvoltă la temperatura camerei, până ce frontul solventului ajunge la 15 cm de linia de start. Se scoate plăcuța din cuva de dezvoltare și se usucă cu un jet de aer cald cu ajutorul uscătorului de păr.

Se examinează placa sub lumină UV și se marchează spoturile observate. Se încălzește plăcuța timp de 30 minute în etuvă la 100°C pentru a îndepărta excesul de acid acetic. Conservanții se pot vizualiza cu ajutorul reactivului Millon prin înmuierea trafaletului în reactiv și rulare peste plăcuța TLC până ce aceasta este umectată uniform. Ca o metodă alternativă de vizualizare se poate picura cu atenție reactiv Millon peste fiecare spot marcat în lumină UV.

Esterii acidului 4-hidroxi benzoic apar ca spoturi de culoare roșie, 2-fenoxietanolul și 1-fenoxipropan-2-ol ca spoturi galbene. Acidul 4-hidroxi benzoic ca atare (care se poate regăsi și el în produsele cosmetice fie ca produs de descompunere a parabenilor, fie ca atare) va fi tot ca un spot roșu.

Identificare. Se calculează valorile R_f pentru fiecare spot. Se compară spoturile obținute pentru soluțiile de analizat cu cele pentru soluțiile de referință, luând în calcul atât valorile R_f , cât și comportarea sub lumină UV și culoarea după vizualizare. Se trag concluzii preliminare legate de natura conservanților folosiți.

Dacă parabenii sunt prezenți, se aplică identificarea prin metoda HPLC. Se combină rezultatele obținute prin TLC cu cele obținute prin HPLC pentru a confirma prezența parabenilor, 2-fenoxietanolului și 1-fenoxipropan-2-olului.

Observație. Datorită toxicității, reactivul Millon trebuie aplicat prin una din metodele menționate anterior. Nu se recomandă stropirea.

Și alți compuși care conțin grupe OH pot da reacție de culoare cu reactivul Millon. Pentru conservanții studiați, valorile R_f sunt prezentate în tabelul următor [19]:

Compus	R_f	Culoare
acid 4-hidroxi benzoic	11	roșu
metilparaben	12	roșu

etilparaben	17	roșu
propilparaben	21	roșu
butilparaben	26	roșu
benzilparaben	16	roșu
2-fenoxietanol	29	galben
1-fenoxipropan-2-ol	50	galben

Nu se observă separarea acidului 4-hidroxi benzoic față de metilparaben sau a benzilparabenului față de etilparaben. Identificarea acestor compuși trebuie efectuată cu ajutorul metodei HPLC și prin compararea timpilor de retenție obținuți pentru probă cu timpii de retenție pentru standarde.

Determinarea conservanților prin HPLC

Această metodă detaliază determinarea prezenței 2-fenoxietanolului, 1-fenoxipropan-2-olului, 4-hidroxi benzoatului de metil, 4-hidroxi benzoatului de etil, 4-hidroxi benzoatului de propil, 4-hidroxi benzoatului de butil și 4-hidroxi benzoatului de benzil în produsele cosmetice [19].

Cantitatea de conservanți determinată prin această metodă se exprimă în procente masice.

Principiul metodei. Proba este acidifiată prin adăugare de acid sulfuric și apoi suspendată într-un amestec de etanol și apă. Amestecul este încălzit ușor pentru topirea lipidelor, astfel având loc o extracție avansată; amestecul obținut este apoi filtrat. Conservanții din filtrat sunt determinați prin HPLC cu fază inversă utilizând 4-hidroxi benzoatului de izopropil ca standard intern.

Reactivi.

Toți reactivii trebuie să fie de puritate analitică și potriviți pentru a fi utilizați la HPLC. Apa trebuie să fie distilată, sau de puritate echivalentă [19].

- Etanol absolut,
- 2-Fenoxietanol,
- 1-Fenoxipropan-2-ol,
- 4-Hidroxi benzoat de metil (metilparaben),
- 4-Hidroxi benzoat de etil (etilparaben),
- 4-Hidroxi benzoat de n-propil (propilparaben),
- 4-Hidroxi benzoat de izopropil (izopropilparaben),
- 4-Hidroxi benzoat de n-butil (butilparaben),
- 4-Hidroxi benzoat de benzil (benzilparaben),
- Tetrahidrofuran,
- Metanol,
- Acetonitril,
- Soluție acid sulfuric 2 M,
- Amestec etanol/apă (se amestecă 9 volume etanol cu un volum apă).

Soluție standard intern. Se cântăresc aproximativ 0,25 g izopropilparaben și se transferă într-un flacon volumetric de 500 ml, se dizolvă și se aduce la semn cu amestecul etanol/apă.

Faza mobilă. Este un amestec de tetrahidrofuran / apă / metanol / acetonitril. Se amestecă 5 volume tetrahidrofuran cu 60 volume apă, 10 volume metanol și 25 volume acetonitril.

Soluțiile concentrate de conservanți. Se cântăresc cu precizie cca 0,2 g 2-fenoxietanol, 0,2 g 1-fenoxipropan-2-ol, 0,05 g metilparaben, 0,05 g etilparaben, 0,05 g propilparaben, 0,05 g butilparaben și 0,025

g benzilparaben și se aduce într-un flacon volumetric de 100 ml, se dizolvă și se aduce la semn cu amestec etanol/apă. Se poate păstra la frigider timp de o săptămână.

Soluțiile standard ale conservanților. Din soluțiile concentrate se transferă: 20 ml, 10 ml, 5 ml, 2 ml și 1 ml în flacoane volumetrice de 50 ml. În fiecare flacon se adaugă 10 ml soluție de standard intern și 1 ml soluție de acid sulfuric și se aduce la volum cu amestecul etanol/apă. Aceste soluții se prepară proaspăt imediat înainte de analiză.

Aparatură și sticlărie: Sticlărie normală de laborator și:

- Baie de apă capabilă să mențină temperatura $60^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$,
- Cromatograf lichid de înaltă performanță cu detector UV la lungimea de undă 280 nm,
- Coloană analitică din oțel inoxidabil 25 cm x 4,6 mm sau 12,5 cm x 4,6 mm umplute cu Nucleosil 5C18 sau echivalent,
- Tuburi de sticlă de 100 ml cu capac înfiletat,
- Centri de fierbere, carborundum (silicon carbid) cu dimensiuni de 2-4 mm sau echivalent.

Mod de lucru. [19]

Prepararea probei fără adaos de standard intern. Se cântăresc aproximativ 1 g probă într-un tub de 100 ml cu capac înfiletat.

Se adaugă cu pipeta 1 ml soluție acid sulfuric și 50 ml amestec etanol/apă.

Se adaugă apoi cca 1 g centri de fierbere, se închide tubul și se agită puternic până ce se obține o suspensie omogenă (se agită cel puțin 1 min).

Se plasează tubul pentru 5 min în baia de apă menținută la $60^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pentru a facilita extracția conservanților în faza de etanol.

Tubul se răcește imediat sub jet de apă rece și se introduce extractul în frigider pentru o oră. Se filtrează prin hârtie de filtru.

Circa 2 ml din filtrat se transferă într-un flacon pentru probe de 5 ml. Extractul se păstrează în frigider până se efectuează analiza HPLC, dar nu mai mult de 24 ore.

Prepararea probei de analizat cu adaos de standard intern. Se cântăresc la a treia zecimală $1 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$ probă într-un tub de 100 ml cu capac înfiletat.

Se pipetează 1 ml acid sulfuric și 40 ml amestec etanol/apă în tub.

Se adaugă cca 1 g centri de fierbere și exact 10 ml soluție de standard intern. Se închide tubul și se agită puternic până ce se obține o suspensie omogenă (se agită minim 1 min).

Se introduce tubul timp de 5 min în baia de apă încălzită la 60°C pentru a facilita extracția conservanților în faza etanolică.

Se răcește imediat tubul sub jet de apă rece de la robinet și se introduce extractul în frigider pentru exact o oră. Se filtrează prin hârtie de filtru.

Se transferă aproximativ 2 ml filtrat într-o fiolă pentru probe de 5 ml (soluția de analizat). Se ține la frigider și se efectuează determinarea HPLC în intervalul de 24 ore de la obținere.

Cromatografia lichidă de înaltă performanță.

Condițiile cromatografice sunt:

- Faza mobilă: amestec tetrahidrofuran/apă/metanol/acetonitril
- Debitul de curgere: 1,5 ml/min
- Lungime de undă de detecție 280 nm

Calibrare.

Se injectează 10 μl din fiecare soluție standard de conservant.

Din cromatogramele obținute se determină raportul între înălțimea picurilor obținute pentru soluțiile standard de conservanți și cea înregistrată pentru standardul intern.

Se desenează curba pentru fiecare conservant în parte.

Determinarea.

Se injectează 10 μl soluție probă de analizat fără standard intern în cromatograf și se înregistrează cromatograma.

Se injectează 10 μl din una din soluțiile standard de conservant și se înregistrează cromatograma. Se compară cu cromatograma obținută.

Dacă în cromatograma extractului probei de analizat și apare un pic cu același timp de retenție ca al izoparabenului (recomandat ca standard intern) se continuă prin injectarea a 10 μl soluție de probă cu adaos de standard intern.

Se înregistrează cromatogramele obținute și se măsoară înălțimea picurilor.

Dacă se observă un pic ce interferă în cromatograma probei de analizat care are aproximativ același timp de retenție cu al izopropilparabenului se va selecta un alt standard intern.

Dacă unul din conservanții analizați este absent din cromatograma probei, acest conservant se poate folosi ca standard intern.

Se calculează raportul între înălțimea picurilor obținute pentru conservanții analizați și înălțimea picului standardului intern.

Se stabilește dacă pentru soluțiile standard folosite în etapa de calibrare răspunsul obținut este liniar.

De asemenea, se determină dacă cromatogramele obținute pentru soluțiile standard și pentru proba de analizat îndeplinesc următoarele condiții [19]:

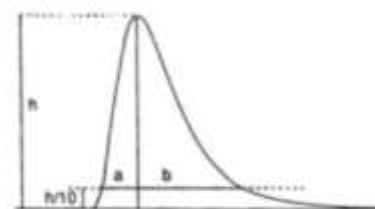
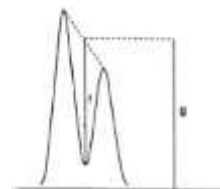
- Separarea picurilor trebuie să fie de minim 0,9 (separația picurilor se calculează cu relația $p = f/g$)

Dacă nu se obține gradul de separare dorit, fie se folosește o coloana mai eficientă, fie se ajustează compoziția fazei mobile până ce este îndeplinită această cerință.

- Factorul de asimetrie A_s pentru toate picurile trebuie să fie cuprins între 0,9 și 1,5.

Pentru a înregistra cromatograma în scopul determinării factorului de asimetrie este recomandat să se folosească o viteză de înregistrare a spectrului de cel puțin 2 cm/min.

Trebuie să se înregistreze o linie de bază uniformă. Factorul de asimetrie se determină cu relația $A_s = b/a$



Calcul.

Se folosește curba de calibrare și rapoartele între înălțimile picurilor pentru conservanți și cele ale standardului intern pentru a calcula concentrația conservanților în proba de analizat. Concentrația w_i , exprimată ca procent masic se calculează folosind următoarea formulă:

$$\% w_i = \frac{b_i}{200 \times a}$$

unde: b_i = concentrația ($\mu\text{g/ml}$) de conservant i în soluția de analizat citită pe curba de calibrare
 A = masa (g) a probei analizate.

Observații.

Faza staționară. Comportarea soluțiilor la retenție în determinările HPLC depinde de tipul, marca și istoricul fazei staționare.

Dacă o anumită coloană poate fi folosită pentru separarea conservanților analizați se poate determina din rezultatele obținute pentru soluțiile standard ale acestora.

Alături de tipul de coloană propus, s-a observat că se pot folosi ca materiale de umplură Hypersil ODS și Zorbax ODS.

Ca o metodă alternativă, compoziția recomandată pentru faza mobilă poate fi optimizată pentru a obține separarea dorită pentru componente.

Lungimea de undă de detecție. Procedeele experimentale au arătat că o modificare mică a lungimii de undă utilizate poate avea efect semnificativ asupra rezultatelor determinărilor. Astfel, acest parametru trebuie controlat foarte strict în timpul determinării.

Interferențe. În cazul folosirii condițiilor menționate în acest experiment, în afara compușilor doriți mai sunt separați numeroși alți compuși, cum ar fi unii aditivi cosmetici, timpii de retenție pentru aceștia putând fi găsiți în literatură.

Laborator nr. 4

DETERMINAREA REZORCINEI

Această metodă prezintă determinarea rezorcinei cu ajutorul cromatografiei de gaz.

Metoda identifică rezorcina prezentă în șampoane sau loțiuni pentru păr în concentrație 0,1 ÷ 2% procente masice [19].

Principiul metodei.

Rezorcinolul și 3,5-dihidroxitoluenul (5-metilrezorcinol) adăugat ca standard intern sunt separate din probă prin intermediul cromatografiei în strat subțire. Ambii compuși sunt izolați prin răzuirea spoturilor de pe placa cromatografică și extracție cu metanol. Final, compușii extrași sunt uscați, sililați și determinați prin cromatografie de gaz [19].

Reactivi.

Toți reactivii trebuie să fie de puritate analitică.

- Acid clorhidric 25% (g/g),
- Metanol,
- Etanol 96% (v/v),
- Plăcuțe de silicagel din plastic sau aluminiu cu indicator fluorescent. Pentru *dezactivare* se procedează după cum urmează: se stropesc cu apă plăcuțele de preacoperite cu silicagel până ce este umectat uniform. Se lasă plăcuțele la uscat la temperatura camerei 1÷3 ore. Dacă plăcuțele nu sunt dezactivate pot apărea pierderi de rezorcinol prin adsorbție ireversibilă pe silicagel.
- *Solvent de dezvoltare*: acetonă : cloroform : acid acetic = 20:75:5 v/v.
- *Soluția standard de rezorcinol*: se dizolvă 400 mg rezorcinol în 100 ml etanol (1 ml corespunde la 4000 μg rezorcinol).
- *Soluție standard intern*: se dizolvă 400 mg 3,5-dihidroxitoluen (DHT) în 100 ml etanol 96% (1 ml corespunde la 4000 μg DHT).
- *Amestec standard*: se amestecă 10 ml soluție standard de rezorcinol cu 10 ml soluție soluție standard intern într-un flacon volumetric de 100 ml, se aduce la semn cu etanol 96% și se amestecă bine. (1 ml corespunde la 400 μg rezorcină și 400 μg DHT).
- *Agenți de sililare* (compuși organosiliconici care înlocuiesc un atom de H activat dintr-o moleculă organică cu o grupare organosiliconică): N,O-bis-(trimetilsilil)trifluoroacetamidă (BSTFA), hexametildisilazan (HMDS), trimetilclorsilosan (TMCS).

Aparatură: echipamentul uzual pentru cromatografie în strat subțire și sticlărie de laborator.

Mod de lucru: [19]

Prepararea probei de analizat. Se cântăresc cu precizie, într-un pahar de 150 ml o porțiune de probă de analizat (m grame) care conține cca 20-50 mg rezorcină.

Se acidifiază cu acid clorhidric până ce amestecul devine acid (sunt necesari 2-4 ml acid), se adaugă 10 ml (40 mg DHT) soluție standard intern și se amestecă. Se transferă într-un flacon volumetric de 100 ml cu etanol, se aduce la semn cu etanol și se amestecă bine [19].

Se aplică 250 μl soluție pe o plăcuță de silicagel dezactivată ca o linie continuă de aproximativ 8 cm lungime. Linia se trasează cât se poate de îngustă.

Se aplică 250 μl amestec standard pe aceeași placă, în același mod.

Pe linia de start se spotează două puncte pe fiecare punându-se câte 5µl din soluția standard de rezorcină și soluția standard intern pentru a ajuta la localizarea spoturilor corespunzătoare pe placă după dezvoltare.

Dezvoltarea plăcii se realizează într-o cuvă necăptușită cu hârtie de filtru, umplută cu solvent de dezvoltare până ce nivelul frontului de solvent ajunge la o distanță de 12 cm de linia de start (de obicei durează cca 45 minute).

Se usucă placa cromatografică cu aer cald și se localizează spoturile de rezorcină/DHT sub lumină UV (254 nm).

Cei doi compuși au aproximativ aceleași valori R_f .

Se marchează benzile cu un creion la 2 mm de marginea exterioară întunecată a benzilor.

Se îndepărtează aceste zone și se colectează adsorbentul din fiecare bandă într-o sticlă de 10 ml [19].

Se extrage adsorbentul ce conține proba și cel ce conține amestecul standard prin următoarea metodă: se adaugă 2 ml metanol și se extrage timp de o oră, sub agitare continuă. Se filtrează amestecul și se repetă extracția timp de alte 15 min cu 2 ml metanol. Se combină cele două extracte și se evaporă solventul prin uscare peste noapte într-un exicator umplut cu material de uscare corespunzător [19].

Observație. Amestecul nu se încălzește!!

Se silitează reziduul după una din cele două metode prezentate mai jos:

- Se adaugă 200 µl BSTFA cu o microsiringă și se lasă amestecul într-un recipient închis timp de 12 ore la temperatura camerei.
- Se adaugă, succesiv 200 µl HMDS și 100 µl TMCS cu o microsiringă și se încălzește amestecul timp de 30 min, la 60°C, într-un flacon închis. Se răcește la temperatura camerei.

Cromatografia de gaz

Condiții cromatografice. Coloana trebuie să funcționeze cu o rezoluție, R , egală sau mai bună de 1,5, definită după cum urmează [19]:

$$R = \frac{2d'(r_2 - r_1)}{w_1 + w_2}$$

unde: r_1 și r_2 – timpii de retenție ai celor două picuri (min)

w_1 și w_2 – lățimea picurilor la jumătate din înălțime (mm)

d' – viteza înregistrării diagramei (mm/min)

Experimental s-au găsit a fi adecvate următoarea coloană și următoarele condiții cromatografice [19]:

Coloană material:	oțel inox
lungime:	200 cm
diametru intern:	~ 3 mm
umplutură:	OV-17 10% pe Chromosorb WAW rețea 100 x 120

Detector în flamă ionizată

Temperatura	- coloană:	185°C (izoterm)
	- detector:	250°C
	- portul de injecție	250°C.

Gaz purtător: azot

Curgere: 45 ml/min

pentru setarea curgerii hidrogenului și aerului se urmează instrucțiunile producătorului.

Se injectează 1÷3 µl soluție obținută anterior în cromatograful de gaz. Se efectuează 5 injecții pentru fiecare soluție în parte, se măsoară aria picului, se face media și se calculează raportul ariei picurilor:

$$S = \text{aria picului pt rezorcină} / \text{aria picului pentru DHT}.$$

Calcul.

Concentrația rezorcinei în probă, exprimată în procente masice se calculează cu relația [19]:

$$\% \text{ rezorcină} = \frac{4}{M} \times \frac{S_{\text{proba}}}{S_{\text{amestec standard}}}$$

unde: M = masa probei testate (grame)
S_{probă} = media ariei picului pentru soluția probei de analizat
S_{amestec standard} = media ariei picului pentru amestecul standard.

Reproductibilitate. Pentru un conținut de rezorcină de cca 0,5%, diferența între rezultatele obținute pentru două determinări efectuate în paralel, pe aceeași probă, nu trebuie să depășească valoarea absolută de 0,025% [19].