

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
НОВОСИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
Факультет естественных наук
Кафедра: аналитической химии**

Дипломная работа

**ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ФЕНОЛЬНЫХ
АНТИОКСИДАНТОВ**

Метелева Елизавета Сергеевна

Научный руководитель

К.х.н. Кобрина Виоллета Николаевна

Новосибирск – 2005

СОДЕРЖАНИЕ

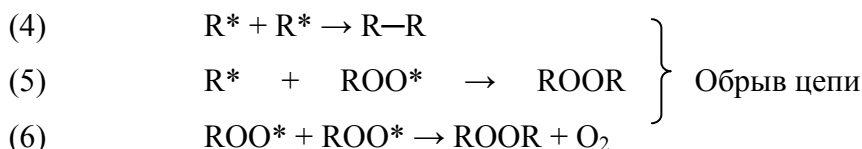
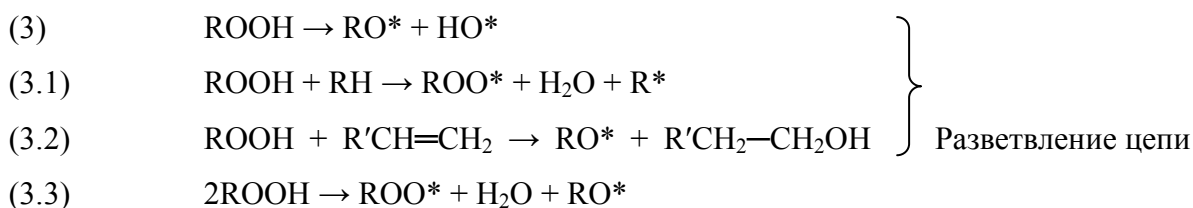
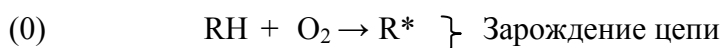
1. ВВЕДЕНИЕ.....	3	стр.
2. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР		
2.1. Свойства антиоксидантов.....	5	стр.
2.2. Применение антиоксидантов.....	9	стр.
2.3. Методы определения антиоксидантов.....	12	стр.
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ		
3.1. Исследование характеристик удерживания антиоксидантов от состава элюента.....	16	стр.
3.2. Зависимость характеристик удерживания от температуры.....	20	стр.
3.3. Зависимость характеристик удерживания от "крутизны" градиента.....	21	стр.
3.4. Спектральные характеристики исследуемых антиоксидантов.....	23	стр.
4. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИОКСИДАНТОВ В РАЗЛИЧНЫХ ОБЪЕКТАХ.....	25	стр.
5. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ		
5.1. Оборудование.....	41	стр.
5.2. Материалы и реактивы.....	41	стр.
5.3. Условия анализа.....	41	стр.
5.4. Методики.....	42	стр.
6. ВЫВОДЫ.....	48	стр.
7. ЛИТЕРАТУРА.....	49	стр.

1. ВВЕДЕНИЕ

Взаимодействие кислорода с органическими веществами является одной из наиболее распространенных и хорошо изученных реакций, имеющих основополагающее значение для процессов жизни на Земле и широко используемой в человеческой практике. Продукты окислительных реакций, накапливающиеся в виде отходов жизнедеятельности и промышленных загрязнений, в большинстве своем – инициаторы или катализаторы процессов окисления.

Известно, что первая стадия в реакции кислорода с большинством органических соединений носит обратимый характер и сопровождается образованием лабильных комплексов, способных вновь разлагаться на кислород и исходный продукт. Это, в частности, имеет принципиальное значение для биологических процессов. Устойчивыми продуктами такого взаимодействия могут быть перекиси и гидроперекиси, которым при определенных условиях также присуще свойство обратимости.

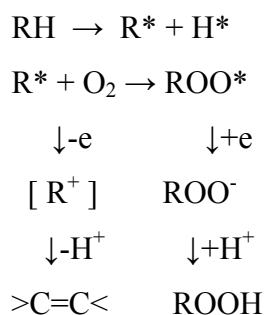
Образование гидроперекиси в углеводородном фрагменте органического соединения RH под действием кислорода протекает по радикальному механизму:



В результате действия кислорода на углеводород образуются активные пероксидные радикалы ROO^* , которые атакуют полимерную цепь по реакции (2). От концентрации этих радикалов и скорости реакции (2) зависит процесс окисления в целом. По мере накопления гидропероксида ROOH происходит его распад с образованием свободных радикалов, способных генерировать новые цепи окисления, - реакции (3) - (3.3) [1].

Характерная особенность радикально-цепных окислительных процессов - возможность их резкого замедления путем введения небольших количеств ингибиторов (стабилизаторов).

Окисление органического вещества кислородом в присутствии ингибитора - антиоксиданта и его окисленной формы описывается в следующей схеме:



Согласно схеме, окисленная форма антиоксиданта (в случае фенола это феноксильный радикал) принимает электрон и протон окисляемой среды с образованием исходного фенола. Последний, окисляясь, восстанавливает пероксидный радикал, что сопровождается образованием гидроперекиси. Главный результат этой стадии – нейтрализация радикалов и прекращение цепной реакции окисления – достигается благодаря наличию в системе обратимого равновесия окисленной и восстановленной формы антиоксиданта, которая поддерживается за счет окисления среды. Поэтому, создание условий для эффективной регенерации фенольных антиоксидантов является одной из важнейших проблем ингибирования окисления. Эти процессы, протекающие без затраты компонентов антиоксидантов среды могут рассматриваться как «каталитическое ингибирование» [2].

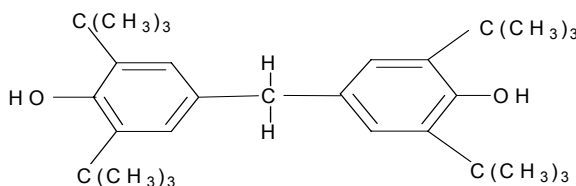
Вследствие физических или химических воздействий при контакте органических веществ со средой происходит частичная потеря основных компонентов. Например, образование кислотных функций в исходном антиоксиданте при его химических превращениях приводит к увеличению растворимости продуктов окисления в воде и их вымыванию из защищаемого материала [3]. Попытка изначально увеличивать количество антиоксидантов в системе часто ускоряет окисление из-за нарушения условий каталитического ингибирования. Поэтому важно, чтобы количество антиоксидантов в системе было оптимальным. В большинстве случаев достаточной считается концентрация от 0,01 до 0,5 % (от массы стабилизируемого вещества) [4].

2. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

2.1. Свойства антиоксидантов

В данном разделе приводятся основные свойства некоторых антиоксидантов, используемых в промышленности полимеров, в пищевой промышленности и других отраслях хозяйства. Для каждого продукта приведены структурная формула, физико-химические свойства, области применения:

4,4'-Метиленбис(2,6-ди-трет-бутилфенол)



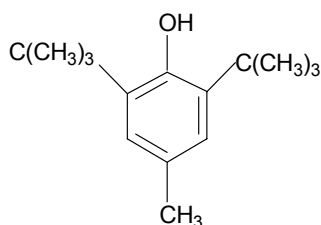
Светло-желтый кристаллический порошок; температура плавления 155-155,5°C; температура кипения 217°C (133 Па) и 289°C (53 Па). Растворяется в ацетоне, бензоле, толуоле, метилэтилкетоне; ограниченно растворяется в этаноле и метаноле, не растворяется в воде. Относится к числу малоокрашивающих стабилизаторов.

Стабилизатор синтетических каучуков (изопреновых, бутадиеновых, бутадиен-стирольных, бутадиен-нитрильных, жидких и др.). Дозировка 1-2%.

Защищает резины на основе натурального и синтетических каучуков, используемых для изготовления белых боковин шин, и резины, эксплуатируемые в жестких условиях, от термоокислительного старения. Окрашивает резины в желтый цвет. Дозировка 1-3%.

Стабилизатор полипропилена и полиэтилена. Дозировка 0,2-1%. В России разрешен для применения в полимерах, контактирующих с пищевыми продуктами.

Ионол (2,6-Ди-трет-бутил-4-метилфенол)



Белый кристаллический порошок, температура плавления 70 °С; температура кипения 265 °С. Растворяется в изопентане, бензоле, метаноле, этаноле, ацетоне, сложных эфирах, толуоле, метилэтилкетоне, жирах; практически не растворяется в воде и водных растворах щелочей. Относится к числу неокрашивающих стабилизаторов.

Стабилизатор различного вида синтетических каучуков (бутадиен-стирольных, бутадиен-метилстирольных, бутадиен-нитрильных, бутадиеновых, изопреновых, уретановых и др.); эффективен в сочетании с производными вторичных аминов. Дозировка до 2%.

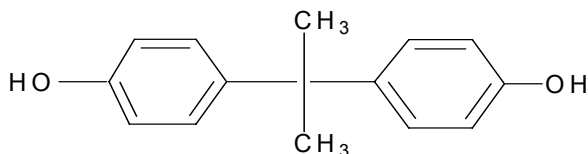
Защищает резины на основе натурального, бутадиен-стирольных, бутадиен-метилстирольных, бутадиен-нитрильных, бутадиеновых, изопреновых и хлоропреновых каучуков от термоокислительного и светового старения. Используется в светлых и цветных резиновых изделиях. Дозировка 0,5 - 2%.

Термостабилизатор полиэтилена, полипропилена, полиэфиров, ударопрочного полистирола, полиуретанов, поливинилхлорида, сополимеров винил- и винилиден-хлорида. Дозировка 0,1 - 0,6%. Термостабилизатор полипропиленового волокна, эффективен в сочетании с ди(алкилгидроксифенил)моносulfидами. Дозировка до 0,5%.

Антиоксидант для жиров, масел, витаминов; ингибитор полимеризации при каталитическом окислении аллилового спирта в глицидный спирт и глицерин; ингибитор окисления гексадекана, реактивных топлив и др. органических веществ.

Разрешен для применения в пищевой промышленности.

Дифенилолпропан



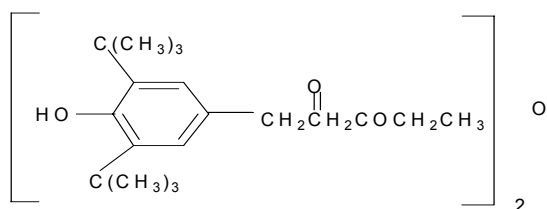
Бесцветный кристаллический продукт; температура плавления 156-157 °С. Растворяется в метиловом, этиловом, изопропиловом и бутиловом спиртах, уксусной кислоте, ацетоне, диэтиловом эфире; ограниченно растворяется в воде.

Термостабилизатор поливинилхлорида. Применяется в основном в смеси с солями органических кислот и эпоксисоединениями. Дозировка 0,05-0,6%.

Полупродукт при производстве поликарбонатных и эпоксидных смол, клеев и других продуктов.

Фенозан 28

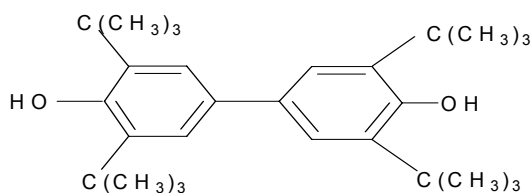
(Эфир 3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенилпропионовой кислоты и диэтиленгликоля)



Белый кристаллический порошок; температура плавления 85°C. Растворяется в ацетоне, бензоле, толуоле, диэтиловом эфире, гептане; не растворяется в воде. Нетоксичен. Относится к числу неокрашивающих стабилизаторов.

Неокрашивающий термостабилизатор для полиолефинов и других полимерных материалов. Дозировка 0,1-1%.

3,3'5,5'-Тетра-трет-бутилбифенилдиол-4,4'



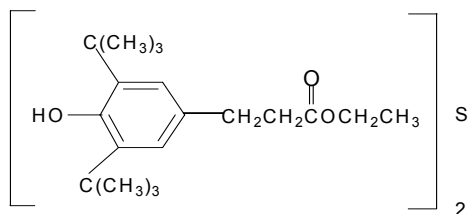
Светло-желтый кристаллический порошок; температура плавления 186°C. Растворяется в этаноле, изопентане, толуоле; не растворяется в воде, растворах щелочей. Относится к числу неокрашивающих стабилизаторов.

Защищает резины на основе натурального и синтетических каучуков от термоокислительного старения. Дозировка 0,5-2%.

Термостабилизатор полиэтилена, полипропилена. Дозировка 0,5-1%. Ингибитор моторного топлива.

Фенозан 30

(Бис[(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)этоксикарбонилэтил] сульфид)



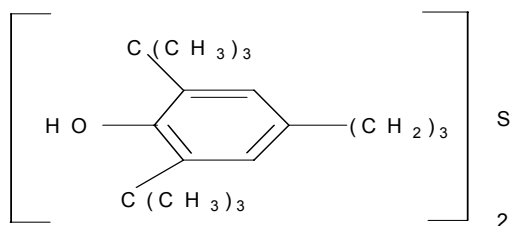
Белый кристаллический порошок; температура плавления 67°C. Растворяется в этаноле, диэтиловом эфире, ацетоне, бензоле, гептане; не растворяется в воде. Нетоксичен. Относится к числу неокрашивающих стабилизаторов.

Неокрашивающий термостабилизатор для полиолефинов, ударопрочного полистирола, АБС-пластиков. Дозировка 0,1-0,3%.

Стабилизатор сополимера этилена, пропилена и диенов (СКЭПТ), бутадиен-стирольных, бутадиен-нитрильных, хлоропреновых каучуков, полиуретановых блоксополимеров бутадиена и стирола. В дозировке до 0,3% разрешен для применения в полимерах, контактирующих с пищевыми продуктами [5].

СО-3

(Бис3,3'-[(3,5-ди-трет.бутил-4- гидроксифенил)пропил]сульфид)



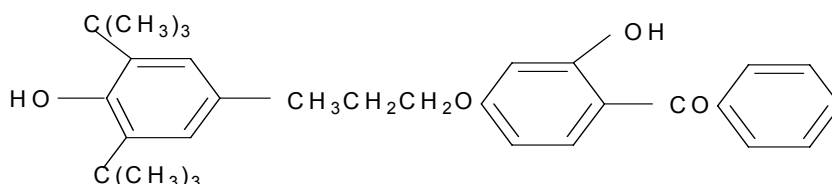
Белый или слегка желтоватый кристаллический порошок; температура плавления 71⁰С.

Серосодержащий стабилизатор СО-3 применяется для стабилизации пищевых продуктов, полипропиленов, АВС-пластиков, ударопрочных полистиролов, полиэтиленов высокого и низкого давлений. Стабилизатор СО-3 разрешен к применению в изделиях, контактирующих с кожей человека (в том числе, в медицинских изделиях), полимерных материалах для изготовления детских игрушек, для упаковки пищевых продуктов и пр.

Введением препарата СО-3 в полиолефины в количестве 0,05 - 0,5 % достигается длительная стабилизация физико-механических свойств различных полимеров, а длительное сохранение диэлектрических показателей полиэтилена, содержащего СО-3, позволяет использовать такие полимеры для изготовления изоляционных оболочек силовых кабелей и электроаппаратуры.

Применение стабилизатора СО-3 в упаковочных материалах для медицинских препаратов и пищевых продуктов позволяет увеличить сроки хранения содержимого (изменение запаха, цвета и др. показателей) по сравнению с материалами, хранящимися в полимерных упаковках без этого стабилизатора. Положительный эффект наблюдается при добавлении 0,01% СО-3 в упаковочные материалы (пленки, бумагу и пр.) и 0,01 - 0,02 % - в пищевые продукты [6].

Бензон-П

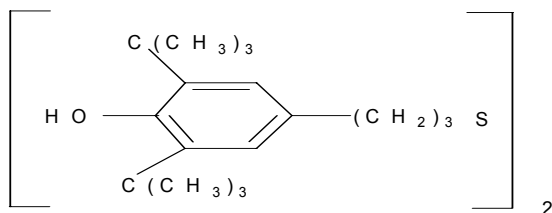


Бензон-П является одновременно свето- и термостабилизатором высокой активности. Не токсичен. Растворим в обычных растворителях. Температура плавления не ниже 123⁰С.

Предназначен для стабилизации полипропилена, полиэтиленов высокого и низкого давления [7].

СО-4

Бис3,3'-[(3,5-ди-трет.бутил-4-гидроксифенил)-пропил]дисульфид



Стабилизатор СО-4 является термостабилизатором высокой эффективности. Не токсичен. Практически не летуч. Белый или слегка кремовый порошок; температура плавления 98⁰С.

Предназначен для стабилизации АВС-пластиков и ударопрочного полистирола [8].

2.2. Применение антиоксидантов

Характерной чертой любого индустриального общества является рост объемов потребляемых ресурсов и сопутствующий ему рост отходов на всем пути производства, эксплуатации и потребления. Подсчитано, что тонне мусора, накапливающегося у потребителей, соответствуют 5 тонн отходов, образующихся на стадии изготовления продукции и 20 тонн отходов на стадии извлечения ресурсов из недр. Один из способов уменьшения количества отходов - увеличение сроков службы изделий. Это позволяет добиться значительной экономии сырья и энергии, что, с экономической точки зрения, более эффективно, чем вторичная переработка, связанная с увеличением затрат на единицу продукции [9]. Введение антиоксидантов в материалы, прежде всего полимерные, позволяет не только увеличивать сроки эксплуатации изделий, но и улучшает многие потребительские свойства (прочность, эластичность, цвет, термостойкость и т.д.).

Антиоксидант полностью подавляет процесс окисления в полимере до тех пор, пока его активность не утратится. Далее процесс окисления развивается и приводит к разрушению полимера.

Обычно антиоксидант вводят в полимер один раз, например, на стадии его переработки в изделие. Срок службы изделия завершается тогда, когда исчерпывается

активность антиоксиданта (т.е. по мере того, как его антиоксидантные свойства теряются либо в процессе окисления, либо в результате испарения, вымывания из полимера).

Полимерные изделия, у которых истек срок эксплуатации, обычно пускают в переработку, связанную с механическим и химическим воздействиями. Для сохранения основных эксплуатационных свойств в такие полимеры необходимо повторно вводить антиоксиданты. При этом часто предварительно очищают материал от перекисных продуктов [10].

Помимо того, что антиоксиданты используют в промышленности полимеров, их успешно используют и в пищевой промышленности. Пища, как многокомпонентная химическая смесь в значительной степени подвержена окислению. Наиболее уязвимы в этом отношении липиды, особенно моно- и полиненасыщенные. Окисление липидов в пище представляет собой типичную цепную свободно-радикальную реакцию, возникающую в результате ферментатического окисления (под влиянием собственного фермента липооксигеназы), либо аутоокисления под действием тепла, света, ионов металлов переменной валентности (железо, медь).

Липидная пероксидация инициирует целый каскад неблагоприятных химических превращений в пище, оказывающих влияние на многие параметры её качества: питательную ценность, безвредность, цвет, вкус, структуру. Прежде всего, это касается потери витаминов А, С, D, К, Е [11].

Несмотря на то, что пища, получаемая из растительного и животного сырья, содержит некоторое количество присущих ему натуральных антиоксидантов, их активность под влиянием хранения, кулинарной обработки сильно снижается, соответственно падает и устойчивость пищи к самоокислению.

Еще в большей степени подвержены свободно-радикальному окислению синтетические органические материалы, изначально не содержащие антиоксидантов и поэтому быстро теряющие свои качественные характеристики. Такие материалы особенно нуждаются в дополнительной антиоксидантной защите в виде добавок небольших количеств антиокислителей.

Мировая практика введения антиоксидантных добавок охватывает большую группу пищевых продуктов. Так, в США они используются в 23 категориях продуктов питания, в том числе, в жирах и маслах, сырах, приправах, сухих смесях, напитках и соках, молочных, крупяных, овощных, мясных, рыбных, кондитерских изделиях, жевательной резинке и т.д. [12]. В странах Общего рынка и Канаде сфера применения антиоксидантных добавок включает в себя жиры и масла для жарения, сухие грибы, бульоны и приправы, картофельные гранулы, муку и хлопья, маргарин, эфирные масла,

витаминные препараты [13, 14]. В России синтетические антиоксиданты используются в производстве некоторых видов пищевых жиров и масел в том числе в маслах для медицинских препаратов [15, 16].

Добавление антиоксидантов в количестве 0,005 – 0,02% эффективно тормозит свободно-радикальное окисление пищи и позволяет, тем самым, существенно продлевать сроки хранения продуктов [17].

Например, ионол в концентрациях 0,005 – 0,02 % повышает стабильность соевого масла [18]. Добавление 0,01 % в подсолнечное масло увеличивает срок его хранения в 1,6 – 1,8 раз; а введение этого же антиоксиданта в жиры для кондитерских изделий продлевает срок их хранения до 150 суток без потери качества [19].

Жарение, является жесткой тепловой обработкой, способствует ускорению окисления, о чем свидетельствует накопление в жирах, нагретых до 180 °С, полярных компонентов и сопряженных диенов [20]. Добавление антиоксидантов стабилизирует масла и через них обжариваемые продукты. Из-за потерь антиоксидантов за счет экстракции пищевыми продуктами, удаление с паром и разложение при длительном воздействии высоких температур, в свежий обжарочный жир необходимо вносить максимально возможное количество антиоксидантов. Масло для жарения должно регулярно заменяться из-за термоокислительной деструкции и накопления в нем токсичных и канцерогенных продуктов. Для стабилизации обжарочных масел могут использоваться отдельные антиоксиданты [21-23].

Одним из способов повышения сроков хранения продовольствия является введение антиоксидантов в состав упаковочных материалов. Известно, что зачастую окислительная порча продуктов начинается с поверхности, постепенно распространяясь вглубь. Для уменьшения этого эффекта обычно используют различные упаковки, ограничивающие доступ кислорода воздуха к пищевым продуктам. Такие широко распространенные упаковочные материалы как пергамент, полиэтиленовая пленка, кашированная фольга удовлетворительно сохраняют органолептические характеристики продуктов только при низкотемпературных режимах. Например, крестьянское масло в упаковке из кашированной фольги не теряет вкусовых качеств при хранении при -10°С в течение двух месяцев, тогда как за тот же срок при +5°С становится полностью непригодным к употреблению. Включение антиокислителей в упаковочные материалы позволяет резко усилить их защитные свойства [24].

Кроме того, введение в упаковки синтетических антиоксидантов позволяет снизить количество последних в пищевом продукте без ущерба для его качества. Подобный метод

успешно используют при хранении зерновых продуктов, сухих смесей для десертов, жареного картофеля, яичного порошка [25].

Как показывает мировой опыт, использование антиоксидантов в качестве добавок в продукты питания является отражением передовых тенденций в пищевой промышленности. Стремление сделать пищу безопасной, качественной, а, следовательно, и более привлекательной для потребителя, заставляет постоянно расширять ассортимент продукции с антиоксидантными добавками. Это объективно содействует развитию рынка продовольственных товаров. Кроме того, использование антиоксидантов дает значительный экономический эффект, способствуя уменьшению потерь продовольствия вследствие окислительной порчи. Последнее имеет особенно большое значение для России, в которой, не доходя до прилавка, гибнет до 40 % сельскохозяйственной продукции [10].

2.3. Методы определения антиоксидантов в различных объектах

Первое, что можно отметить, для анализа антиоксидантов почти не используется метод газовой хроматографии, так как большинство антиоксидантов являются высокомолекулярными, труднолетучими соединениями.

Нам удалось обнаружить лишь одну работу, в которой применен метод ГЖХ: в 2003 году были проведены исследования 9 образцов банок для консервирования, которые заполняли водой и подвергали нагреванию при 80-100°C в течение 30 минут. Было установлено, что при термической обработке происходит повышение скорости выделения бис-фенола А из материала упаковки с 0,06 до 32 нг/см². Для количественного определения использовали метод газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией [26].

В большинстве случаев для определения антиоксидантов используют метод ВЭЖХ. Этот метод используют, как для определения антиоксидантов в пищевых продуктах, так и в косметических и фармацевтических препаратах, в полимерных материалах.

В 1999 году испанские ученые опубликовали статью, в которой описывается определение фенольных антиоксидантов в подсолнечном, кукурузном, оливковом маслах, маргарине, лярде и сливочном масле. Образцы были растворены в пропиловом спирте (PrOH) и отфильтрованы. Анализ проводили на колонке с обращенной фазой C-18 мицелярно модифицированной 0,1М додецилсульфонатом натрия, в качестве подвижной фазы использовали 2,5% PrOH в 10 мМ фосфатном буфере (рН =3). Детектирование

проводили при длине волны 290 нм. СКО для всех пиков образцов составляло 2% для 24 параллельных измерений с концентрацией образца в растворе 200 мкг/г [27].

В этом же году вышла еще одна статья в которой описана методика одновременного определения девяти антиоксидантов в маслах и жирах с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ. В качестве подвижной фазы использовалась кислая система метанол-вода-уксусная кислота, элюирование - градиентное, длительность анализа составляла 30 минут [28].

Что касается косметических и фармацевтических препаратов, то в *J.Liq.Chromatogr. and Relat.Technol.* была опубликована работа об определении антиоксидантов с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ. Разработан простой и точный одновременный метод количественного определения 16 вспомогательных добавок: 9 антиоксидантов и 7 консервантов, входящих в состав косметических и фармацевтических эмульсий типа масло - вода. Метод основан на гомогенизации 2 г анализируемого образца в поле ультразвуковых волн в 8 мл смеси (1:1) метанол - ацетонитрил (MeOH - MeCN) с последующим центрифугированием в течении 5 минут при 3000 об/мин и фильтрацией надосадочной жидкости через мини поры (диаметр 0,45 мкм), после чего фильтрат подвергали ВЭЖХ при использовании в качестве подвижной фазы смесей различных количеств MeOH - MeCN и HClO₄ с детектированием в УФ-области спектра. Концентрацию соединений определяли по градуировочным графикам при 254, 263, 280 нм [29].

В 1995 году китайскими учеными был разработан быстрый метод для определения трех антиоксидантов в косметике методом ВЭЖХ. При пробоподготовке применялся микрохимический метод, что ускорило определение. Образец был гомогенизирован с гексаном, далее трижды была проведена экстракция с AcCN. Экстракт пропускали через колонку Sep-Pak C18 для удаления одновременно экстрагирующихся липидов и пигментов. В качестве подвижной фазы использовали водный раствор AcCN и 5% уксусную кислоту, линейный градиент AcCN 20-100%. Время анализа составляло 10 минут [30].

Описан одновременный метод определения многочисленных добавок к косметике на масляно - водной основе и фармацевтическим препаратам с помощью метода ВЭЖХ. Используется фаза RP-8 select B, линейный градиент элюирования и УФ-детектирование. Подобраны оптимальные условия разделения для 9 антиоксидантов и 7 консервантов.. Были получены удовлетворительные результаты, в частности, высокая воспроизводимость определения [31].

Метод ВЭЖХ используют для определения стабилизаторов в поливинилхлориде. Так, в 1997 году было проведено выделение и определение различных стабилизаторов в поливинилхлориде. Стабилизаторы были экстрагированы из ПВХ с помощью ультразвука, разделение проводилось методом ВЭЖХ на колонке C18, использовали градиентное элюирование. Время анализа один час. Были получены как качественные, так и количественные результаты анализа [32].

Демертис и Франц представили результаты систематического изучения стабильности пяти выбранных компонентов - добавок в пластики и заменители пищевых продуктов при выдержке в двух разных временных и температурных условиях (10 дней при температуре 40°C и 1 час при 100°C). Был использован метод ВЭЖХ с УФ-детектором. Результаты показали, что 4 добавки были устойчивы во всех образцах в указанных условиях. Только одна добавка оказалась неустойчивой в пищевых заменителях, содержащих этанол. Был сделан вывод, что метод ВЭЖХ применим для изучения стабильности добавок в водных и жировых пищевых заменителях [33].

Подобными вопросами занимались и японские ученые. Ими в 1996 году был разработан простой и одновременный метод определения 18 видов антиоксидантов и 10 видов светостабилизаторов. Добавки выделяли раствором циклогексана в 2-пропанол (1:1), предварительно нагретом до температуры 37°C. Экстракты концентрировали и растворяли в теплом ацетонитриле. Анализ проводили методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с УФ-детектированием при длине волны 225 нм. Применяли линейный градиент элюции 3:2 ацетонитрил - вода. Все 28 видов добавок были идентифицированы [34].

Год спустя эти же ученые провели определение этих же 28 антиоксидантов и светостабилизаторов в полиэтиленовых изделиях. Анализируемые образцы включали в себя 36 видов кухонных изделий, таких как упаковочные плёнки, бутылки для соусов и доски для резки и 16 продуктовых упаковок, таких как сумки, контейнеры, сетки и тюбики. Они были проанализированы одновременно методом ВЭЖХ. Большинство образцов содержит от 1 до 3-х антиоксидантов. Миграционный тест проводили на образцах с наибольшим количеством осадка, причём осадок составлял 500-1000 мг/г. Добавки были растворены в воде, 20%-ом этаноле или 4%-ной уксусной кислоте при температуре 60°C с выдержкой в течение 30 минут. Некоторые были растворены в н-гептане при 25°C в течение 60 минут [35].

Кавамура применил метод одновременного определения 53-х полимерных добавок в полиэтилен, таких как 21 антиоксидант, 9 УФ-стабилизаторов, 20 лубрикантов и 3-х пластификаторов. Все добавки были идентифицированы с помощью газовой хромато-масс-спектрометрии, с использованием пятиметровой колонки с силикагелем или стальной

капиллярной колонки, заполненной диметилполисилоксаном. Образцы были приготовлены по опубликованным данным для анализа методом ВЭЖХ. Предел обнаружения – 50-500 мг/г, в зависимости от компонентов. В полиэтиленовых изделиях было идентифицировано 9 добавок. Предложенный метод пригоден для обнаружения добавок в полиэтиленовых изделиях, например, пищевых упаковках [36].

Описан новый метод количественного определения сульфосодержащих антиоксидантов в полиэтилене. Полимерная матрица была растворена в *n*-гептане/изопропанол (97:3 по объёму) при 160⁰С и давлении 0,33 МПа, далее раствор был охлаждён. Раствор вводили в колонку с силикагелем с нормальной фазой вместе с несколькими растворителями, которые используют для растворения полимера. Этот метод даёт хорошую воспроизводимость ($S=2,6\%$) и пределы обнаружения до 0,125 мг/г [37].

В различных образцах полипропилена были определены 6 антиоксидантов двухступенчатой сверхкритической флюидной экстракцией (СКЭ), состоящей из нескольких ступеней, включающих критическую и динамическую часть анализа. Разработанные условия были оптимизированы для анализа Ingafos 168. Сверхкритическая флюидная экстракция оказалась более эффективной. В течение статической ступени экстракции в которой образец помещается в жидкость без потока, введение гексана и метанола, как модифицирующих жидкостей значительно улучшает результат. Гексан добавляют, чтобы облегчить разбухание полимера, тогда как метанол растворяет антиоксиданты. В динамической ступени экстракции время является основным параметром. За 90 минут эффективность достигает 75 процентов. Введение модификаторов на протяжении этой ступени (в ВЭЖХ-СКЭ процедуре) незначительно повышает эффективность. Когда используется СКЭ для всех образцов, эффективность достигает ~75%. Большой объём молекул этих антиоксидантов отвечает за значительное уменьшение эффективности. Размеры и форма частиц образцов полимеров также важны. Увеличение отношения поверхности к объёму повышает эффективность извлечения [38].

Результаты научных экспериментов и положительный опыт применения антиокислителей в полимерной, резинотехнической, пищевой, косметической промышленности свидетельствует о широких перспективах использования этих соединений в интересах человека.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Исследование характеристик удерживания антиоксидантов от состава элюента

Нами были изучены характеристики удерживания 20 антиоксидантов с применением обращенно-фазовой хроматографии на колонке с сорбентом Prontosil 120-5-S18 AQ и с элюентом метанол - 0.005 М фосфорная кислота. Эта система оказалась пригодной для всех исследуемых антиоксидантов (Таблица 1).

Таблица 1. Времена удерживания и фактор ёмкости антиоксидантов.

Название	Время удерживания, мин.	Фактор ёмкости, k'	Название	Время удерживания, мин.	Фактор ёмкости, k'
Бис-фенол А	4,9	1,99	Роддендрол	11,4	5,90
Ди-трет-бутилфенилол-пропан	8,1	3,91	4-(3-Аминопропил)-2,6-ди-трет-бутилфенол	11,5	5,96
С-1	10,3	5,25	Фенозан 28	12,8	6,76
Ионол	11,3	5,88	Фенозан 30	13,3	7,06
4-(4-Аминобутил)-2,6-ди-трет-бутилфенол	11,4	5,92	3,3',5,5'-Тетра-трет-бутил-4,4'-дигидрокси-фенил	11,4	5,90
Бензон II	13,3	7,07	Фенозан 43	13,7	7,30
4-(2-Аминоэтил)-2,6-ди-трет-бутилфенол	11,4	5,91	4,4-Метилен-бис-(2,6-ди-трет-бутилфенол)	11,4	5,90
СО-3	14,3	7,81	«Трис»	14,4	7,72
Синтан	11,4	5,93	СО-4	15,2	8,20
Тирозол	11,4	5,90	Ирганокс 1010	15,7	8,54

Однако большая группа соединений имеет при указанных условиях близкие времена удерживания. Поэтому, нами были продолжены поиски оптимальных элюирующих систем растворителей. Для этих исследований были взяты 3 антиоксиданта (Таблица 2) и были исследованы их характеристики удерживания в различных элюентах.

Результаты исследований приведены в таблице 3. Следует отметить, что для антиоксидантов со свободной аминогруппой ни одна из новых элюирующих систем не оказалось пригодной.

Таблица 2. Структуры и названия исследуемых соединений

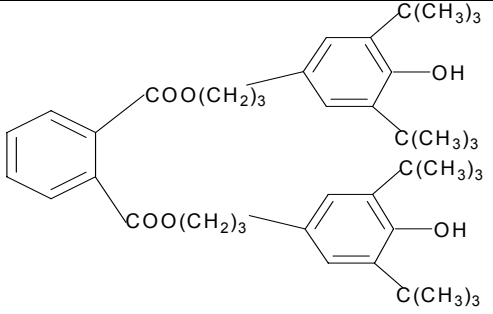
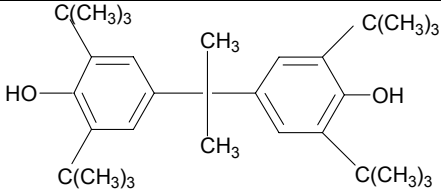
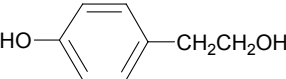
 <p style="text-align: center;">Фенозан 43</p>	 <p style="text-align: center;">Ди-<i>трет</i>-бутилфенилол-пропан</p> <hr/>  <p style="text-align: center;">Тирозол</p>
---	---

Таблица 3. Зависимость характеристик удерживания антиоксидантов от элюентов.

Состав элюента	Время удерживания, мин (№пика), фактор емкости (k')		
	тирозол	дитретбутил-фенилол-пропан	фенозан 43
А: фосфорная кислота Б: метанол	13,57 (2) $k'=7.22$	7,85 (1) $k'=3.76$	14,92 (3) $k'=8.04$
А: трифторуксусная кислота Б: метанол	13,58 (2) $k'=7.23$	7,90 (1) $k'=3.79$	14,92 (3) $k'=8.04$
А: вода Б: метанол	13,58 (2) $k'=7.23$	7,90 (1) $k'=3.79$	14,92 (3) $k'=8.04$
А: трифторуксусная кислота Б: ацетонитрил	1,71 (1) $k'=0.04$	5,02 (2) $k'=2.04$	13,51 (3) $k'=7.19$
А: фосфорная кислота Б: ацетонитрил	1,83 (1) $k'=0.11$	4,98 (2) $k'=2.02$	13,48 (3) $k'=7.17$
А: вода Б: ацетонитрил	1,70 (1) $k'=0.03$	4,95 (2) $k'=2.00$	13,50 (3) $k'=7.18$
А: раствор перхлората лития в хлорной кислоте Б: ацетонитрил	1,81 (1) $k'=0.10$	5,26 (2) $k'=2.19$	13,87 (3) $k'=7.41$

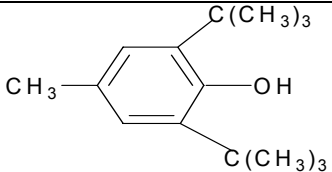
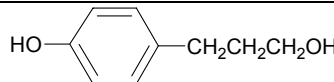
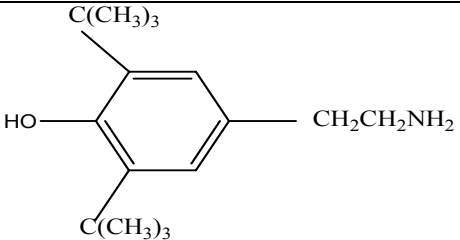
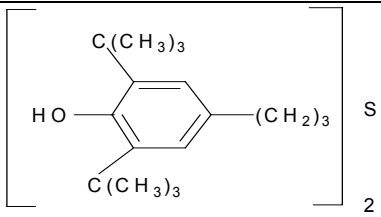
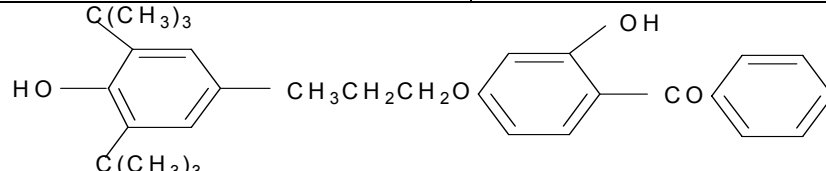
Как видно из таблицы 3, при замене элюента А особых изменений не происходит. Добавки солей и кислот в элюент не оказывают существенного влияния на характеристики удерживания антиоксидантов.

При замене органической составляющей системы (элюента Б - метанол заменили ацетонитрилом) пик 1 - тирозола и пик 2 – ди-*трет*.бутилфенилолпропана поменялись местами. Это говорит о том, что выбор органической составляющей элюента играет существенную роль для этого класса соединений. Особенно сильно на замену элюента реагирует тирозол, имеющий в молекуле свободный гидроксил незаэкранированный *трет*.бутильными группами. Удерживание высокомолекулярного фенозана 43 практически не претерпевает изменений при замене метанола на ацетонитрил.

Исходя из вышеизложенного можно заключить, что для анализа фенольных антиоксидантов, кроме соединений со свободными аминогруппами пригодны как системы, содержащие метанол, так и ацетонитрил. Что касается "слабого" элюента (А), то проще всего использовать воду, так как показано, что солевые и кислотные добавки не оказывают на удерживание компонентов существенного влияния.

С применением вновь выбранного элюента: ацетонитрил-вода проанализирована еще одна группа антиоксидантов: ионол, СО-3, бензон П, роддендрол, (4-(2-аминоэтил)-2,6-ди-*трет*-бутилфенол) (таблица 4, рис. 1).

Таблица 4. Структуры и названия исследуемых соединений

 <p style="text-align: center;">Ионол</p>	 <p style="text-align: center;">Роддендрол</p>
 <p style="text-align: center;">4-(2-аминоэтил)-2,6-ди-<i>трет</i>-бутилфенол</p>	 <p style="text-align: center;">СО-3</p>
 <p style="text-align: center;">Бензон П</p>	

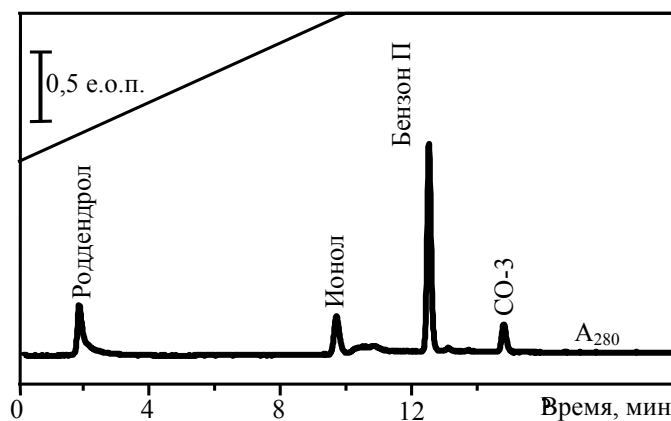


Рис. 1. Хроматограмма смеси: ионол, СО-3, бензон П, роддендрол, (4-(2-аминоэтил)-2,6-ди-*трет*-бутилфенол). Элюент: ацетонитрил-вода.

Таблица 5. Сравнительные характеристики удерживания веществ для систем метанол-фосфорная кислота и ацетонитрил-вода

Название антиоксиданта	t_R , k' для системы метанол-фосфорная кислота, мин	t_R для системы ацетонитрил- вода, мин
Ионол	11,3 ($k'=5,88$)	9,6 ($k'=4,81$)
Роддендрол	11,4 ($k'=5,90$)	1,8 ($k'=0,05$)
(4-(2-аминоэтил)-2,6-ди- <i>трет</i> -бутилфенол)	11,4 ($k'=5,91$)	Не элюируется
Бензон П	13,7 ($k'=7,07$)	12,4 ($k'=6,52$)
СО-3	14,3 ($k'=7,81$)	14,7 ($k'=7,91$)

Как видно из таблицы, низкомолекулярные антиоксиданты существенно изменяют свои характеристики удерживания при переходе от одной системы к другой, особенно сильно изменяет время удерживания роддендрол, который содержит, также как и тирозол, свободную гидроксильную группу, незаэкранированную *трет*-бутильными радикалами.

3.2. Зависимость характеристик удерживания от температуры.

Исследование характеристик удерживания от температуры колонки проводили при 3-х температурах 40, 50 и 60 °С.

Провели хроматографирование смеси, описанной в пункте 1, в условиях:

КОЛОНКА: 2x75 мм с Prontosil-120-5-C18 AQ

ЭЛЮЭНТ А: вода

ЭЛЮЭНТ Б: ацетонитрил

ОБРАЗЕЦ: 4 мкл

ДЕТЕКТОР: 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280 нм. Время 0,06 с.

ПОТОК: 100 мкл/мин

ГРАДИЕНТ: 10 мин от 60 до 100% Б; 10 мин 100% Б.

Таблица 6. Зависимость времени удерживания от температуры.

Температура, °С.	Время удерживания, мин.		
	Тирозол	Ди- <i>трет</i> -бутилфе- нилолпропан	Фенозан 43
40	1,67 ($k'=0,01$)	4,93 ($k'=1,99$)	13,47 ($k'=7,16$)
50	1,70 ($k'=0,03$)	4,67 ($k'=1,83$)	13,05 ($k'=6,91$)
60	1,67 ($k'=0,01$)	4,43 ($k'=1,68$)	12,65 ($k'=6,67$)

Из табл. 6 видно, что для ди-*трет*-бутилфенилолпропана и фенозана 43 при повышении температуры время удерживания уменьшается, а для тирозола оно остается неизменным. Зависимость представлена на рис. 2.

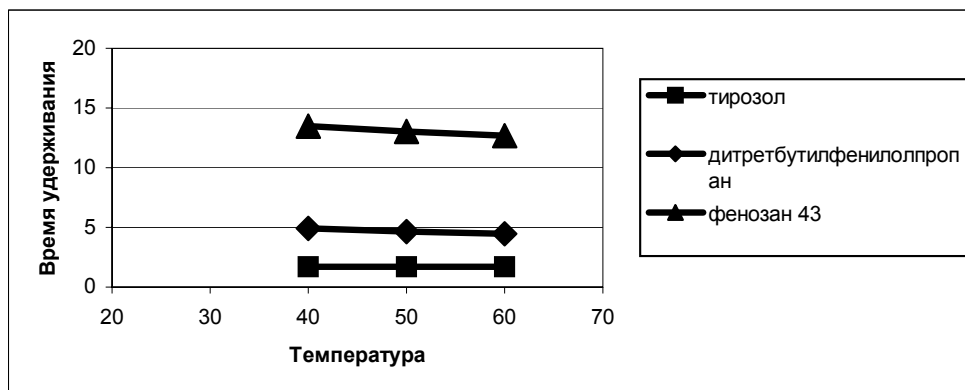
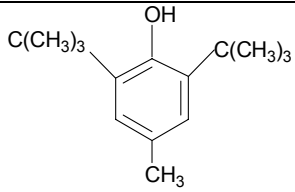
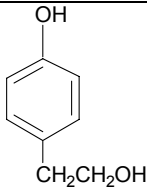
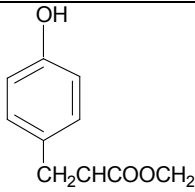
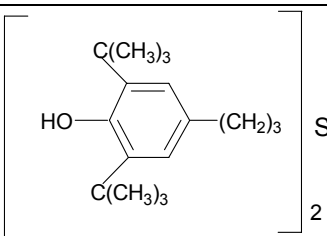
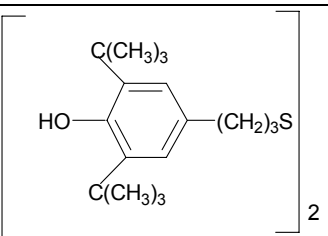
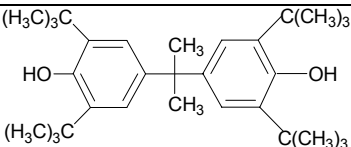
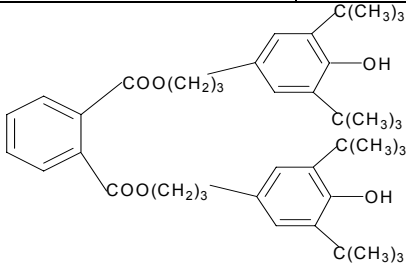
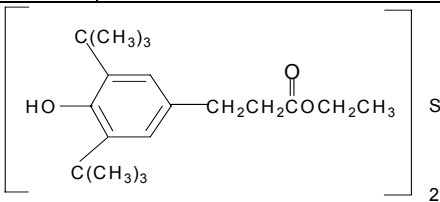
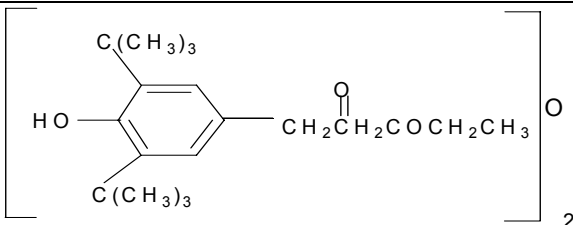
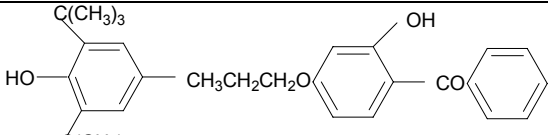


Рис. 2.. Зависимость характеристик удерживания антиоксидантов от температуры.

3.3 Зависимость характеристик удерживания от "крутизны" градиента

Исследование проводили на 10 антиоксидантах, структурные формулы и названия указаны в таблице 7.

Таблица 7

 <p>Ионол</p>	 <p>Тирозол</p>	 <p>Ирганокс 1010</p>
 <p>CO-3</p>	 <p>CO-4</p>	 <p>Ди-трет-бутилфенилол пропан</p>
 <p>Фенозан 43</p>	 <p>Фенозан 30</p>	
 <p>Фенозан 28</p>	 <p>Бензон П</p>	

Провели хроматографирование смеси в условиях:

КОЛОНКА:	2x75 мм с Prontosil-120-5-C18 AQ
ЭЛЮЭНТ А:	вода
ЭЛЮЭНТ Б:	ацетонитрил
ОБРАЗЕЦ:	4 мкл
ДЕТЕКТОР:	260, 280 нм. Время 0,34 с.
ПОТОК:	100 мкл/мин
РЕГЕНЕРАЦИЯ:	8 минут
ГРАДИЕНТ:	10 мин от X до 100% Б; 10 мин 100% Б.

Были получены следующие хроматограммы:

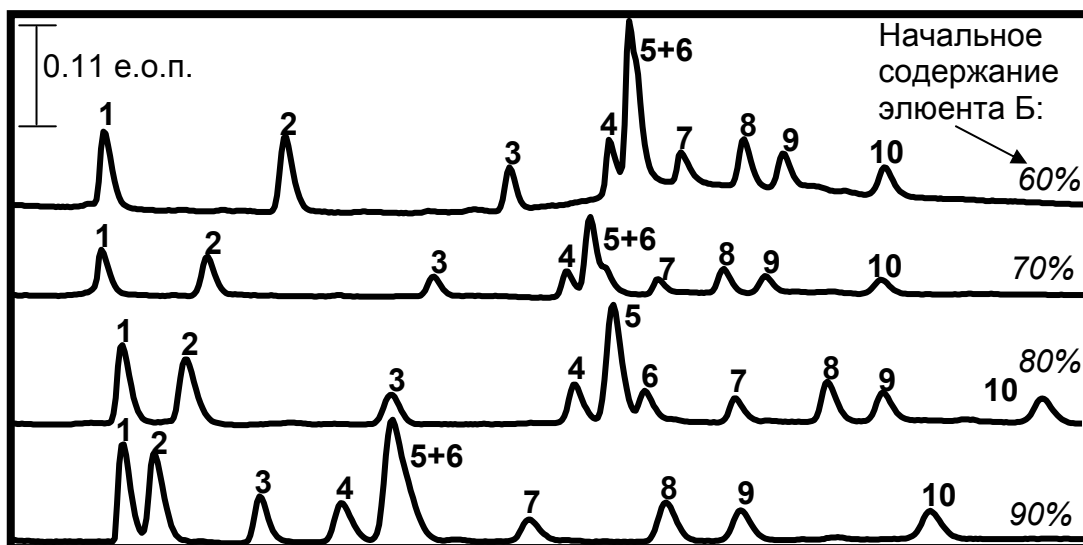


Рис 3. Хроматограммы смеси 10 антиоксидантов при различном начальном содержании элюента Б.

- | | |
|--|-------------------|
| 1. Тирозол | 6. Фенозан 30 |
| 2. Ди- <i>трет</i> -бутилфенилолпропан | 7. Фенозан 43 |
| 3. Инол | 8. СО-3 |
| 4. Фенозан 28 | 9. СО-4 |
| 5. Бензон П | 10. Ирганокс 1010 |

Таблица 8. Зависимость характеристик удерживания от "крутизны" градиента.

Начальное содержание элюента Б, %	60	70	80	90
Тирозол	2,15* $k'=0,30$	2,08* $k'=0,26$	2,07* $k'=0,25$	2,06* $k'=0,25$
Ди- <i>трет</i> -бутилфенилолпропан	6,32* $k'=2,84$	4,51* $k'=1,74$	3,26* $k'=0,98$	2,64* $k'=0,60$
Инол	11,50* $k'=5,97$	9,72* $k'=4,88$	7,09* $k'=3,30$	4,59* $k'=1,78$
Фенозан 28	13,80* $k'=7,37$	12,77* $k'=6,74$	10,51* $k'=5,37$	6,09* $k'=2,70$
Бензон П	14,26* $k'=7,64$	13,31* $k'=7,07$	11,23* $k'=5,81$	7,03* $k'=3,26$
Фенозан 30	14,26* $k'=7,64$	13,31* $k'=7,07$	1,82* $k'=6,17$	7,03* $k'=3,26$

Фенозан 43	15,45* <i>k'</i> =8,36	14,86* <i>k'</i> =8,01	13,50* <i>k'</i> =7,19	9,54* <i>k'</i> =4,87
СО-3	16,90* <i>k'</i> =9,24	16,38* <i>k'</i> =8,93	15,23* <i>k'</i> =8,23	12,07* <i>k'</i> =6,31
СО-4	17,81* <i>k'</i> =9,80	17,35* <i>k'</i> =9,50	16,27* <i>k'</i> =8,87	13,45* <i>k'</i> =7,15
Ирганокс 1010	20,15* <i>k'</i> =11,23	19,99* <i>k'</i> =11,11	19,24* <i>k'</i> =10,67	16,94* <i>k'</i> =9,28

* - Время удерживания, мин. *k'* - фактор ёмкости.

По хроматограммам и таблице видно, что наилучшее разделение смеси наблюдается при начальном содержании элюента Б 80%.

Таблица 9. Зависимость разрешения компонентов от "крутизны" градиента

Начальное содержание элюента Б, %	Разрешение, n, n+1								
	1↔2	2↔3	3↔4	4↔5	5↔6	6↔7	7↔8	8↔9	9↔10
60	8.27	10.40	5.16	0.87	0	2.12	2.88	1.79	4.11
70	4.87	9.58	5.97	1.10	0	3.24	3.07	1.75	4.31
80	2.41	6.78	6.48	1.43	1.19	3.55	3.56	1.99	5.14
90	1.24	4.11	2.91	1.43	0	3.80	4.13	2.24	5.50

Из таблицы видно, что при начальном содержании элюента Б 80%, разрешение пиков 5 и 6, 3 и 4 достигает максимума. Что касается других пиков, то при увеличении "крутизны" градиента разрешение 1 и 2, 2 и 3 пиков уменьшается, но остается достаточным для полного разделения, в остальных случаях наблюдается увеличение разрешения.

3.4 Спектральные характеристики исследуемых антиоксидантов

Для получения спектральных характеристик, растворяли навески 20 стабилизаторов в ацетонитриле до концентрации 0,2 мкг/мкл. Проводили хроматографирование каждого из полученных растворов в следующих условиях:

ЭЛЮЕНТ А: вода
 ЭЛЮЕНТ Б: ацетонитрил
 ОБРАЗЕЦ: 4 мкл

ДЕТЕКТОР: 210,220,230,240,250,260,280 нм. Время 0.10 с.

ТЕМПЕРАТУРА: 40°C

ГРАДИЕНТ: Б 60-100% (10 минут), далее изократическое
элюирование Б 100% (10 минут).

УФ-спектры записывали при остановленном потоке элюента в процессе хроматографии.

Были получены хроматограммы и спектры исследуемых веществ. Далее спектры были нормированы (Таблица 10).

Таблица 10. Спектральные данные антиоксидантов

Название вещества	S ₂₆₀ (1мкг) о.е.мкл	Спектральные отношения S _λ /S ₂₁₀					
		S ₂₂₀	S ₂₃₀	S ₂₄₀	S ₂₅₀	S ₂₆₀	S ₂₈₀
Ионол	0,09	0,63	0,43	0,13	0,04	0,06	0,02
Бензон П	0,65	0,65	0,42	0,35	0,28	0,19	0,43
Ирганокс1010	0,09	0,52	0,39	0,12	0,02	0,04	0,12
Фенозан 43	0,07	0,64	0,55	0,25	0,09	0,07	0,13
Фенозан 30	0,04	0,54	0,39	0,11	0,02	0,04	0,12
Фенозан 28	0,06	0,55	0,40	0,11	0,02	0,04	0,12
СО-4	0,06	0,52	0,39	0,13	0,04	0,05	0,12
СО-3	0,07	0,55	0,40	0,10	0,01	0,04	0,12
«Трис»	0,05	0,45	0,30	0,18	0,03	0,03	0,08
С-1	1,23	0,39	0,33	0,37	0,41	0,34	0,19
2,2'-Ди-(3,5-диметил-4- гидроксифенил) пропан	0,12	0,51	0,28	0,09	0,01	0,03	0,08
Бис-фенол А	0,09	0,85	0,82	0,17	0,03	0,07	0,20
4,4-Метилен-бис-(2,6-ди- <i>трет.</i> бутилфенол)	0,15	1,50	1,92	1,47	0,31	0,04	0,02
3,3',5,5'-Тетра- <i>трет.</i> -бутил-4,4- дигидроксифенил	0,11	1,66	2,20	1,70	0,35	0,04	0,02
4-(2-Аминоэтил)-2,6-ди- <i>трет.</i> - бутилфенол	0,05	1,71	2,42	1,80	0,36	0,02	0,01
4-(3-Аминопропил)-2,6-ди- <i>трет.</i> - бутилфенол	0,03	1,37	1,76	1,29	0,29	0,05	0,03
4-(4-Аминобутил)-2,6-ди- <i>трет.</i> - бутилфенол	0,09	1,71	2,42	1,80	0,36	0,02	0,01
Синтан	0,05	1,56	2,09	1,55	0,33	0,04	0,02

Тирозол	0,04	1,64	2,16	1,63	0,35	0,04	0,02
Родендрол	0,04	1,60	2,11	1,62	0,34	0,04	0,02

4. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИОКСИДАНТОВ В РАЗЛИЧНЫХ ОБЪЕКТАХ

Как отмечено выше, фенольные антиоксиданты широко используются в различных областях хозяйства для стабилизации различных продуктов и материалов.

Наиболее широко применяется антиоксидант ионол (бутилгидрокситолуол, БОТ). Он применяется как для защиты полимеров, так и нефтяных масел. В странах Евросоюза и России он разрешен для применения в пищевой промышленности и зарегистрирован под кодом Е-321.

Другим чрезвычайно интересным антиоксидантом перспективным для применения в качестве пищевой добавки является тирозол (аурол) - синтетический аналог природного вещества, являющего основным действующим веществом лекарственного растения родиолы розовой, более известного под названием золотой корень (*Sedum roseum*). Тирозол кроме антиоксидантных свойств обладает адаптогенным действием.

Нам представлялось интересным на основе полученных данных о хроматографическом поведении исследуемых производных 2,6-ди-*трет.*-бутилфенола и других фенолов разработать методики их определения, пригодные для практического применения.

4.1. Подбор экстрагента и условий экстракции для извлечения ионола из жевательной резинки

При разработке методик определения антиоксидантов в различных средах определенную трудность представляет их выделение из матриц, так как содержание антиоксидантов варьирует в пределах 0.01- 0.1% и они находятся в растворенном состоянии.

Извлечение антиоксиданта из жевательной резинки производили в приборе Сокслета.

3 подушечки жевательной резинки "DIROL" и 20 мл экстрагента помещали в прибор для экстракции Сокслета, в течение получаса экстрагировали резинки на водяной бане при 90 °С с обратным холодильником. В качестве экстрагентов использовали этанол, хлороформ и ацетонитрил. Полученные данные приведены в таблице 11.

Таблица 11. Сравнение извлечения ионола из жевательной резинки "DIROL" различными экстрагентами.

Наименование экстрагента	Площадь пика, о.е.*сек.	извлечение, мг/г
этанол	0,13	0,031
ацетонитрил	0,07	0,017
хлороформ	0,04	0,010

Из таблицы видно, что наибольшее извлечение наблюдалось при использовании в качестве экстрагента этанола.

В качестве другого метода экстракции использовали извлечение ионола из жевательной резинки при помощи ультразвука (Рис. 4, 5). Для этого 3 подушечки жевательной резинки помещали в стакан емкостью 50 мл и заливали 20 мл этанола. Стакан помещали на 10 минут в ультразвуковую баню при нагревании до 50 °С. Спиртовые экстракты для отделения взвешенных частиц помещали в центрифужные пробирки и центрифугировали 10 мин при 7400 об/мин.

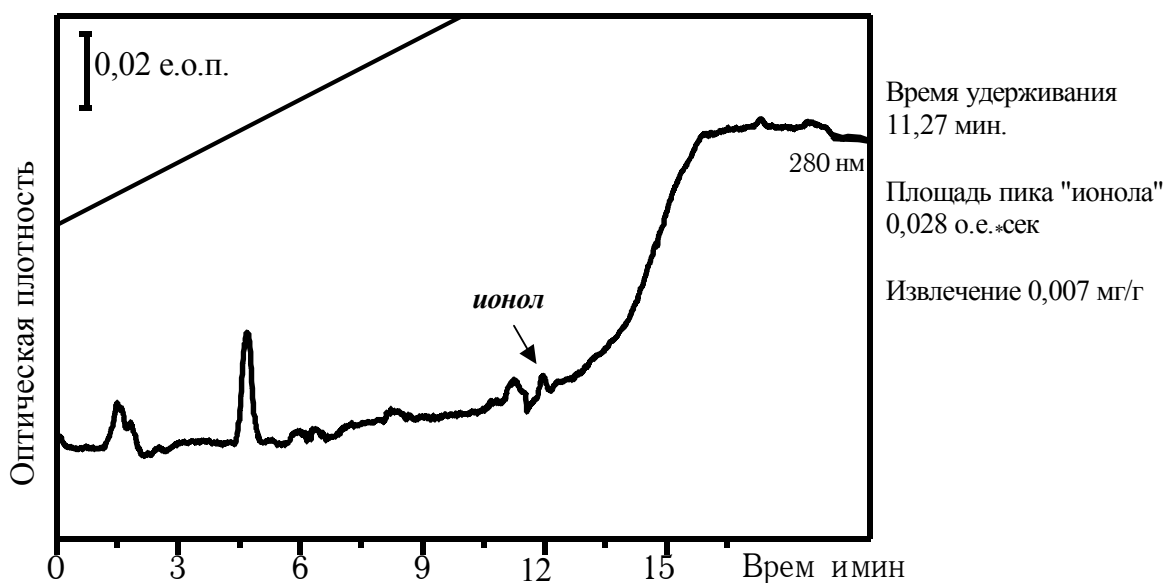


Рис. 4. Хроматограмма экстракта из жевательной резинки "DIROL" при помощи ультразвука.

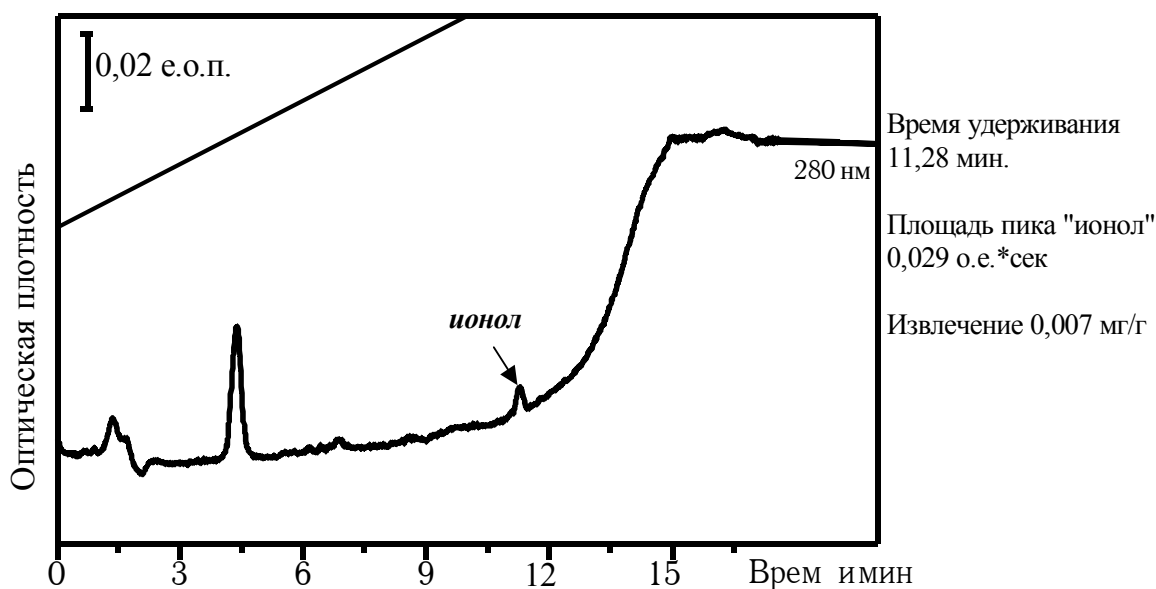


Рис. 5. Хроматограмма экстракта из жевательной резинки "STIMOROL" при помощи ультразвука.

Исходя из вышеизложенного, была выбрана методика извлечения в приборе Сокслета, с применением в качестве экстрагента этанола, так как этот экстрагент извлекает наибольшее количество антиоксиданта.

По выбранной методике проводили исследование зависимости площади пика ионола от времени экстракции (Рис.6).



Рис.6. Зависимость извлечения ионола из жевательной резинки STIMOROL от времени экстракции.

Как видно из графика, наибольшее извлечение наблюдается при экстракции в течение 120 минут.

4.2. Идентификация пика ионола

Идентификацию антиоксиданта в анализируемых образцах проводили по временам удерживания обнаруженных в экстрактах примесей, по их УФ-спектрам поглощения и спектральным отношениям при 5 длинах волн.

Далее представлены хроматограммы исследуемых образцов жевательной резинки (Рис. 7, 8).

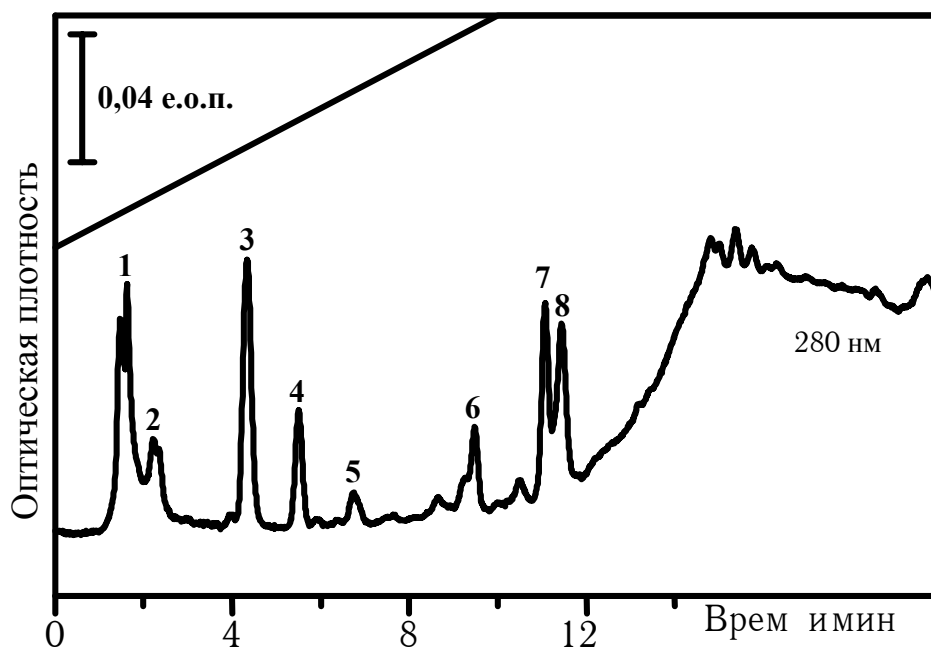


Рис.7. Хроматограмма экстракта из жевательной резинки "STIMOROL"

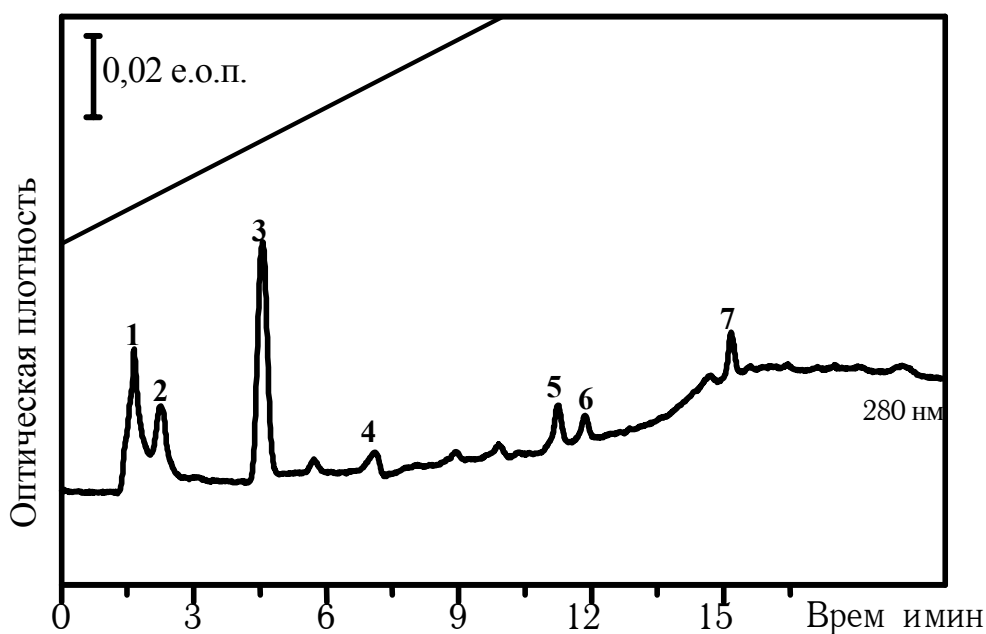


Рис. 8. Хроматограмма экстракта из жевательной резинки "DIROL"

Хроматограмма стандартного образца ионола представлена на рис 9.

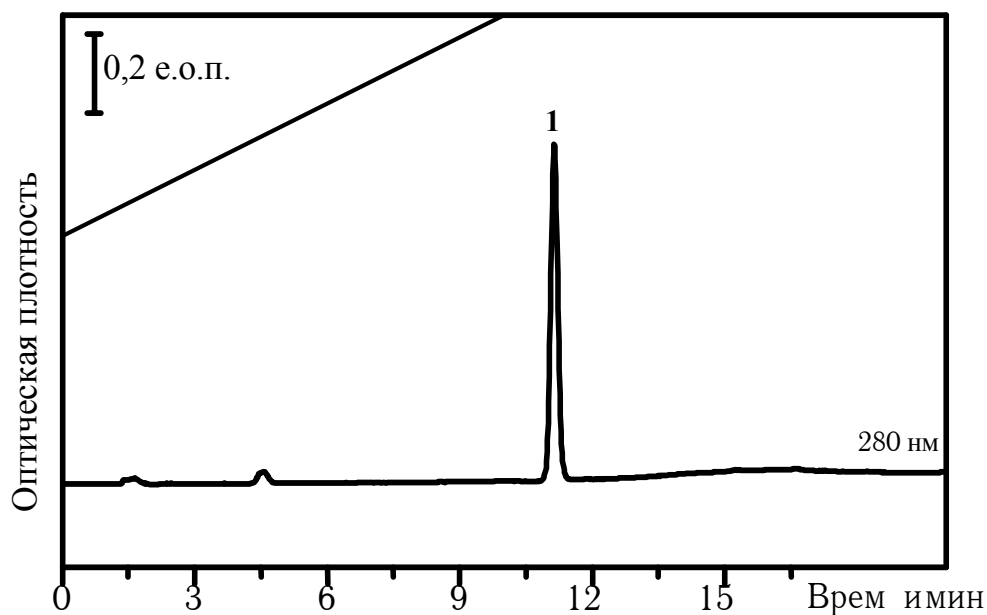


Рис.9. Хроматограмма стандарта ионола

Время удерживания стандартного образца ионола совпадает с временем удерживания обнаруженных в экстрактах примесей (пик 7 на рис. 7 и пик 5 на рис.8), это позволило сделать предположение, что они соответствуют ионолу.

Для более достоверной идентификации провели сравнение УФ-спектров примесей и стандарта ионола (Рис. 10, 11).

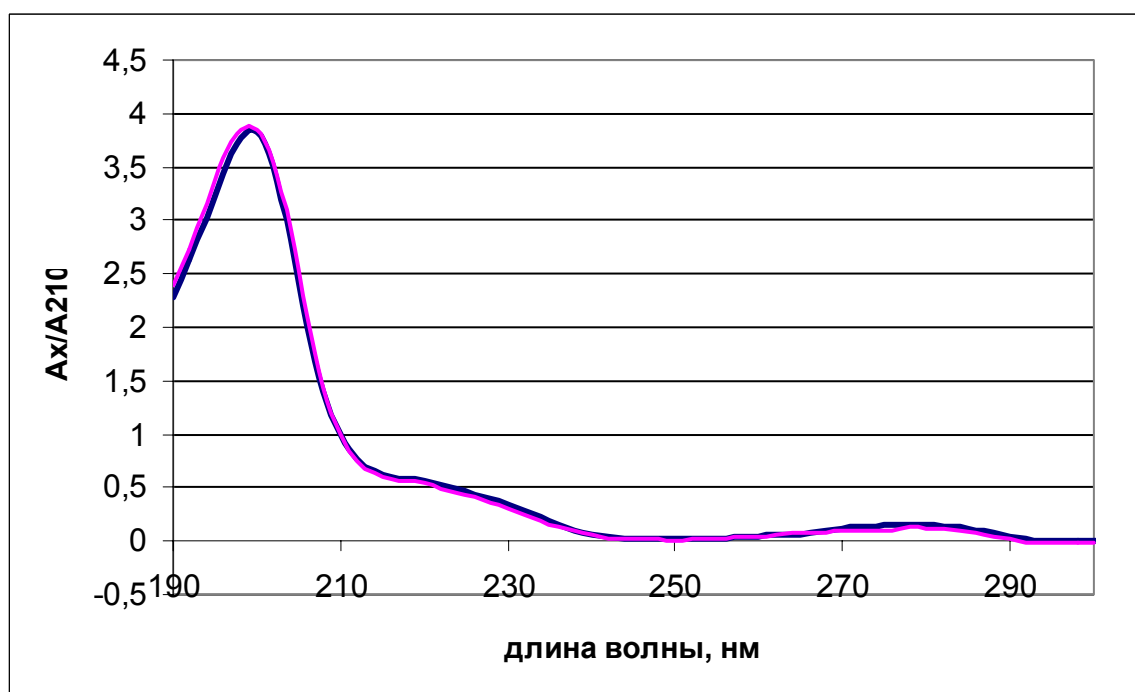


Рис. 10. Сравнение спектра ионола и пика примеси из экстракта жевательной резинки "DIROL".

Таблица 12. Сравнение спектральных отношений ионола и пика примеси из экстракта жевательной резинки "DIROL"

	S_{λ}/S_{210}					
	S_{220}	S_{230}	S_{240}	S_{250}	S_{260}	S_{280}
Ионол	0,56	0,34	0,06	0,02	0,05	0,15
пик 5	0,57	0,32	0,04	0,01	0,06	0,17

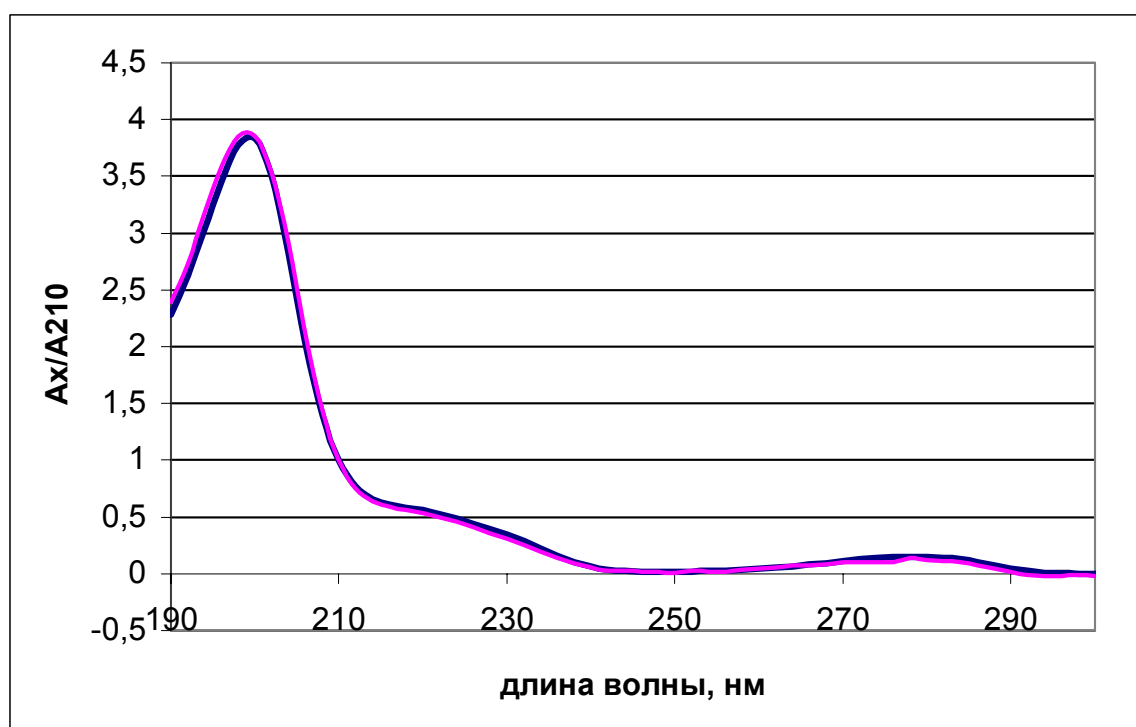


Рис.11. Сравнение спектра ионола и пика примеси из экстракта жевательной резинки "STIMOROL"

Таблица 13. Сравнение спектральных отношений ионола и пика примеси из жевательной резинки "STIMOROL"

	S_{λ}/S_{210}					
	S_{220}	S_{230}	S_{240}	S_{250}	S_{260}	S_{280}
Ионол	0,56	0,34	0,06	0,02	0,05	0,15
пик 7	0,54	0,31	0,05	0,01	0,04	0,13

Как видно из рисунков и таблиц, получено полное соответствие спектров поглощения и спектральных отношений примесей, выделенных из резинок.

4.3. Проверка воспроизводимости результатов:

Для воспроизводимости результатов провели по 7 опытов с каждым из образцов.

4.3.1. Для жевательной резинки "STIMOROL" получили следующие результаты (Таблица 14):

Таблица 14. Математическая обработка результатов измерений

Площадь пика, О.Е.*сек	Концентрация, мг/мл	Содержание ионола в жевательной резинке, мг/г	X	$\bar{X} = 0,676$
2,625	0,163	0,623	X ₁	
2,672	0,166	0,639	X ₂	
2,696	0,167	0,642	X ₃	
2,706	0,168	0,644	X ₄	
3,019	0,187	0,718	X ₅	
3,022	0,188	0,723	X ₆	
3,106	0,192	0,739	X ₇	

1) Проверка по Q критерию:

$$Q_1 = (X_2 - X_1)/(X_n - X_1) = 0,14 < 0,59 \quad Q (P_{\text{дов}} = 0,95, n = 7) = 0,59$$

$$Q_n = (X_n - X_{n-1})/(X_n - X_1) = 0,14 < 0,59$$

По Q критерию все результаты относятся к одной совокупности.

2) Среднее отклонение единичного измерения (среднеквадратичное отклонение).

$$s = \left(\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1} \right)^{1/2} = 0,050$$

3) Коэффициент Стьюдента t (P_{дов} = 0.95, n = 7) = 2.36

$$\mu = \bar{X} \pm \frac{t \times s}{\sqrt{n}} = 0,676 \pm 0,045 \text{ мг/г}$$

Извлечение ионола из жевательной резинки "STIMOROL" составило 0,68 ± 0,05 мг/г.

Кроме того было проверено, какое количество антиоксиданта можно обнаружить в использованной жевательной резинке "STIMOROL". Извлечение составило 0,02 мг/г. Соответственно 97% антиоксиданта при использовании переходит из жевательной резинке в организм.

4.3.2. Для жевательной резинки "DIROL" были получены следующие результаты (Таблица 15):

Таблица 15. Математическая обработка результатов

Площадь пика, О.Е.*сек	Концентрация, мг/мл	Содержание ионола в жевательной резинке, мг/г	X	$\bar{X} = 0,165$
0,550	0,034	0,132	X ₁	
0,573	0,037	0,137	X ₂	
0,621	0,039	0,147	X ₃	
0,636	0,040	0,153	X ₄	
0,673	0,042	0,160	X ₅	
0,834	0,053	0,197	X ₆	
0,952	0,058	0,226	X ₇	

1) Проверка по Q критерию:

$$Q_1 = (X_2 - X_1)/(X_n - X_1) = 0,06 < 0,59 \quad Q (P_{\text{дов}} = 0,95, n = 7) = 0,59$$

$$Q_n = (X_n - X_{n-1})/(X_n - X_1) = 0,31 < 0,59$$

По Q критерию все результаты относятся к одной совокупности.

2) Среднее отклонение единичного измерения (среднеквадратичное отклонение).

$$s = \left(\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1} \right)^{1/2} = 0,034$$

3) Коэффициент Стьюдента $t (P_{\text{дов}} = 0,95, n = 7) = 2,36$

$$\mu = \bar{X} \pm \frac{t \times s}{\sqrt{n}} = 0,165 \pm 0,030 \text{ мг/г}$$

Извлечение ионола из жевательной резинки "DIROL" составило $0,17 \pm 0,03$ мг/г.

4.4. Подбор экстрагента и условий выделения антиоксиданта СО-3 из масла

0,01 г СО-3 растворяли в 10 г масла. Раствор экстрагировали трижды экстрагентом по 1 мл в делительной воронке. В качестве экстрагентов использовали ацетонитрил, этанол. Получили следующие результаты (Таблица 16).

Таблица 16. Сравнение извлечения СО-3 из масла различными экстрагентами

Название экстрагента	Площадь пика, о.е*мкл	Извлечение, %
этанол	0,13	25,00
ацетонитрил	0,43	75,44

В качестве экстрагента выбрали ацетонитрил, так как при его использовании получено более полное извлечение.

Для увеличения извлечения СО-3 из масла провели следующие опыты (Таблица 17).

Таблица 17.

Описание методики	Площадь пика, о.е*мкл	Извлечение, %
Навеску 0,001г СО-3 растворяли в 10 г масла. К смеси добавляли 3 мл гексана, и раствор встряхивали 1 минуту. Проводили экстракцию 3 раза ацетонитрилом по 1 мл. Анализировали ацетонитрильную фракцию.	0,45	79,95
Приготовили 0,01% (по массе) раствор СО-3 в масле, отобрали 5 мл этого раствора в пробирку на 10 мл, добавили 5 мл ацетонитрила. Нагревание проводили в течение 30 мин на глицериновой бане с холодильником. По истечению времени нагрева смесь охладили до комнатной температуре. Пробу для анализа отбирали из ацетонитрильной фракции.	0,28	49,13
К 5 мл раствора добавили 5 мл ацетонитрила. Сосуд со смесью поместили в микроволновую печь на 2 мин.	0,08	14,04
К 5 мл раствора добавили 5 мл ацетонитрила. Сосуд со смесью поместили в ультразвуковую баню на 10 минут при нагревании 50 ⁰ С.	извлечение не наблюдалось	

Для каждого из вышеперечисленных опытов был проведен холостой опыт. Также был приготовлен раствор 0,001г СО-3 в 3 мл ацетонитрила (стандарт). Один из примеров приведен ниже (Рис. 12, 13, 14).

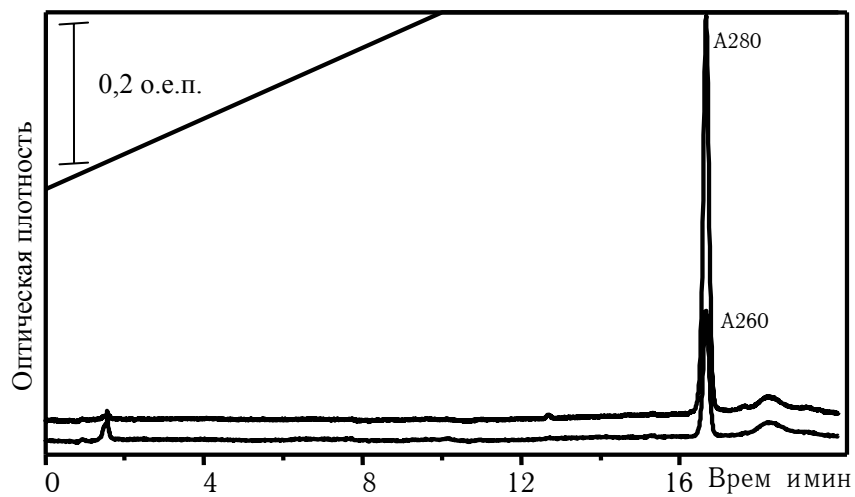


Рис. 12. Хроматограмма стандарта СО-3.

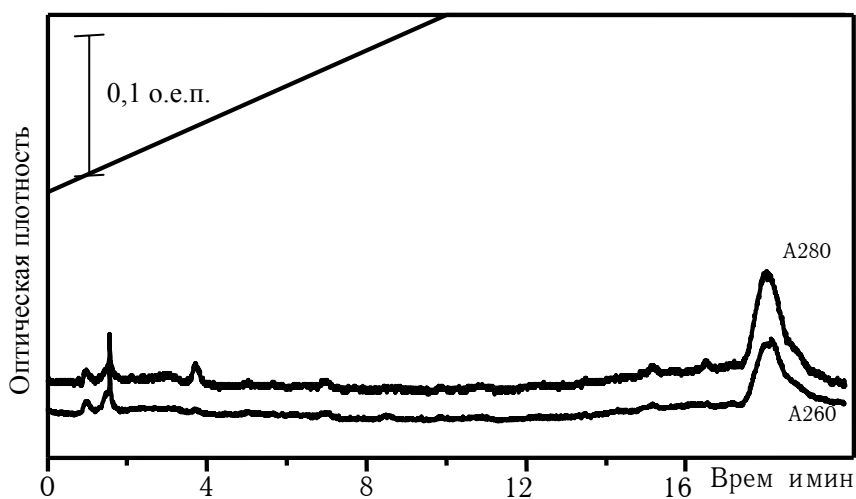


Рис. 13. Хроматограмма экстракта из масла (холостой опыт).

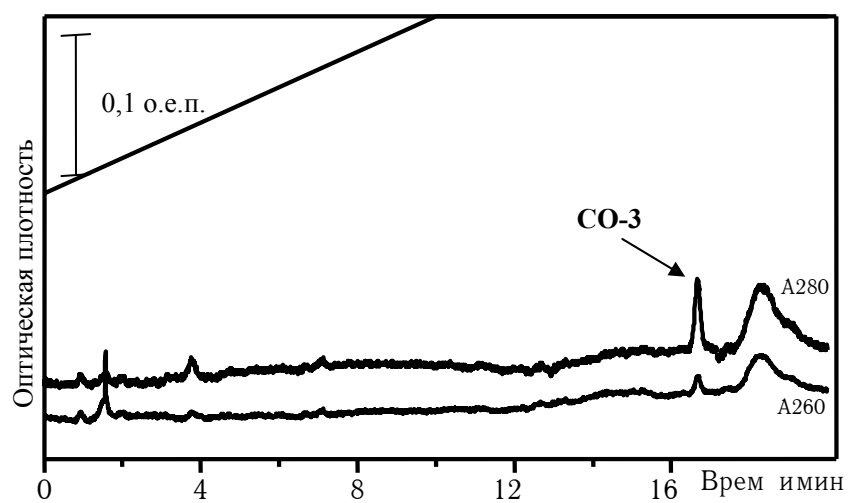


Рис. 14. Хроматограмма экстракта из масла с добавкой СО-3.

4.5. Проверка воспроизводимости результатов:

Площадь пика компонента СО-3 при экстракции ацетонитрилом составила 0,43 о.е.*мкл, площадь пика компонента СО-3 при разбавлении 3 мл ацетонитрила (стандарт) составила 0,57 о.е. * мкл. По этим данным рассчитали извлечения СО-3 из масла, оно составило 75,96%.

Для проверки воспроизводимости данных результатов провели еще 6 анализов:

$$X_1 = 71.75 \%$$

$$X_2 = 74.56 \%$$

$$X_3 = 75.96 \%$$

$$X_4 = 79.65 \% \quad \bar{X} = 80.10$$

$$X_5 = 81.75 \%$$

$$X_6 = 87.39 \%$$

$$X_7 = 89.65 \%$$

1) Проверка по Q критерию:

$$Q_1 = (X_2 - X_1)/(X_n - X_1) = 0.16 < 0.59 \quad Q (P_{\text{дов}} = 0.95, n = 7) = 0.59$$

$$Q_n = (X_n - X_{n-1})/(X_n - X_1) = 0.13 < 0.59$$

По Q критерию все результаты относятся к одной совокупности.

2) Среднее отклонение единичного измерения (среднеквадратичное отклонение).

$$s = \left(\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1} \right)^{1/2} = 6,64$$

3) Коэффициент Стьюдента $t (P_{\text{дов}} = 0.95, n = 7) = 2.36$

$$\mu = \bar{X} \pm \frac{t \times s}{\sqrt{n}} = 80\% \pm 6\%$$

Извлечение СО-3 из масла составило 80% ± 6%.

4.6. Подбор экстрагента и условий выделения антиоксиданта дифенилолпропана из пластиката

3 грамма пластиката и 20 мл экстрагента помещали в прибор для экстракции Сокслета. В качестве экстрагентов использовали этанол, хлороформ, уксусную кислоту (4 %) и ацетонитрил. Полученные данные приведены на рисунке 15:



Рис.15. Сравнение площади пика дифенилолпропана при извлечении из пластика различными экстрагентами.

Из графика видно, что после длительного (более 3-х часов) нагрева наблюдается снижение количества извлекаемого антиоксиданта, что может объясняться разрушением дифенилолпропана при длительном нагревании.

Таблица 18. Зависимость извлечения антиоксиданта дифенилолпропана различными экстрагентами от температуры и времени.

Название экстрагента	Температура бани, °С	Время, мин	Площадь пика, е.о.п.*мкл	Степень извлечения, %
Этанол	90	180	2,659	34
Ацетонитрил	85	210	10,976	100
Уксусная кислота 4%	100	210	1,767	22,3
Хлороформ	65	Извлечение не наблюдается		

В таблице приведены данные о максимальном наблюдаемом извлечении дифенилолпропана из пластика различными экстрагентами.

Исходя из вышеизложенного, была выбрана методика извлечения в приборе Сокслета, с применением в качестве экстрагента ацетонитрила и времени экстракции 210 минут, так как этот экстрагент извлекает максимальное количество антиоксиданта за указанный промежуток времени.

4.7. Идентификация пика дифенилолпропана

Идентификацию антиоксиданта в анализируемом образце проводили по времени удерживания обнаруженной в экстракте примеси, по её УФ-спектру поглощения и спектральным отношениям при 5 длинах волн.

Далее представлена хроматограмма исследуемого образца пластика (Рис. 16).

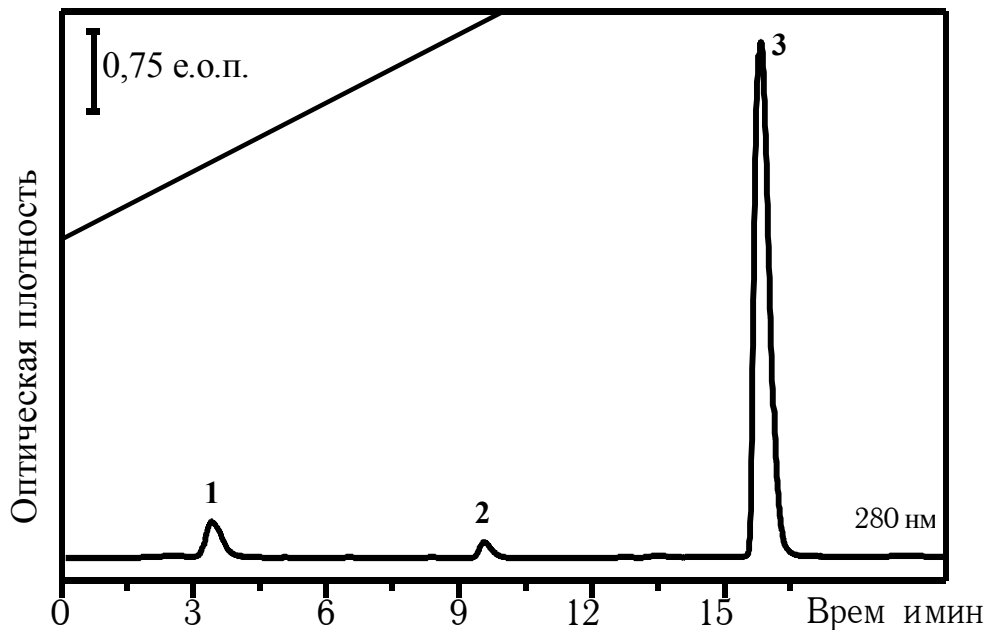


Рис. 16. Хроматограмма экстракта из пластика

Хроматограмма стандартного образца дифенилолпропана представлена на рис 17.

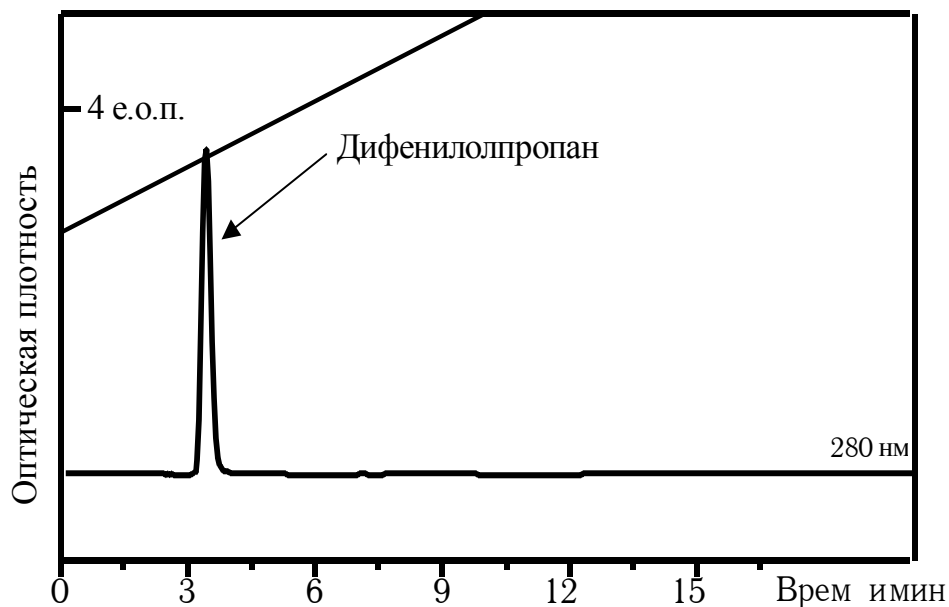


Рис. 17. Хроматограмма стандарта дифенилолпропана

Время удерживания стандартного образца дифенилолпропана совпадает со временем удерживания обнаруженной в экстракте примеси (пик 1 на рис.16), это позволило сделать предположение, что он соответствует дифенилолпропану.

Для более достоверной идентификации провели сравнение УФ-спектров примеси и стандарта дифенилолпропана (Рис.18).

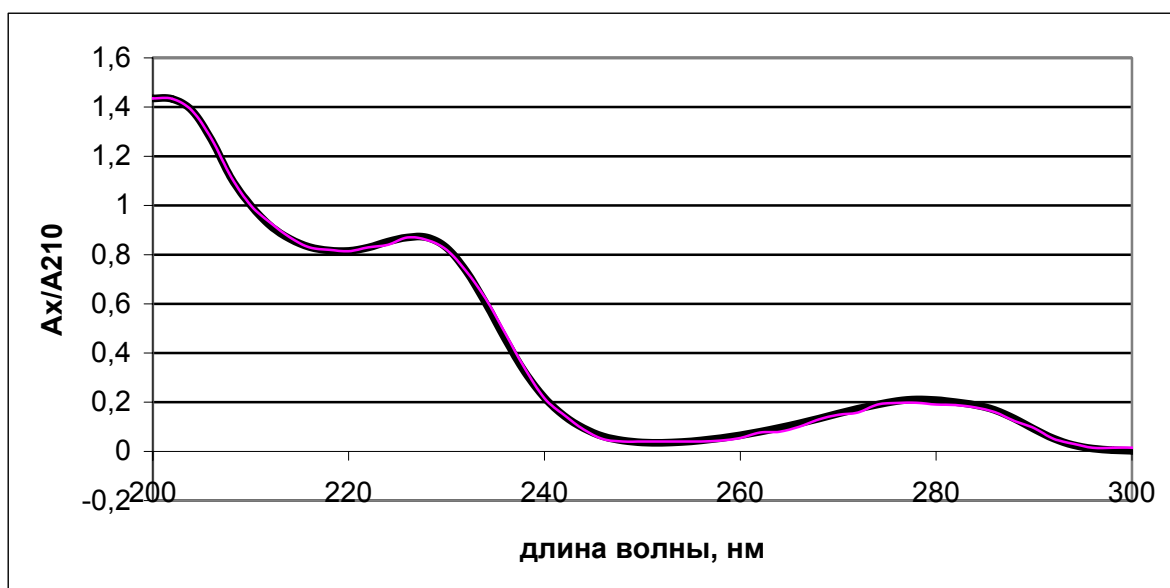


Рис. 18. Сравнение спектра дифенилолпропана и пика примеси из экстракта пластиката

Таблица 19. Сравнение спектральных отношений дифенилолпропана и пика примеси из экстракта пластиката

	S_{λ}/S_{210}					
	S_{220}	S_{230}	S_{240}	S_{250}	S_{260}	S_{280}
Дифенилолпропан	0,82	0,83	0,22	0,04	0,07	0,21
пик 1	0,81	0,82	0,22	0,04	0,05	0,19

Как видно из рисунка и таблицы, получено полное соответствие спектров поглощения и спектральных отношений примеси выделенной из пластиката.

4.8. Проверка воспроизводимости результатов:

Для воспроизводимости результатов провели опытов с образцом пластиката. Получили следующие результаты (Таблица 20):

Таблица 20. Математическая обработка результатов измерений

Степень извлечения дифенилолпропана, %	X	
84,23	X_1	
85,22	X_2	
85,88	X_3	

97,70	X ₄	$\bar{X} = 96,40$
98,62	X ₅	
108,95	X ₆	
114,22	X ₇	

1) Проверка по Q критерию:

$$Q_1 = (X_2 - X_1)/(X_n - X_1) = 0,03 < 0,59 \quad Q (P_{\text{дов}} = 0,95, n = 7) = 0,59$$

$$Q_n = (X_n - X_{n-1})/(X_n - X_1) = 0,18 < 0,59$$

По Q критерию все результаты относятся к одной совокупности.

2) Среднее отклонение единичного измерения (среднеквадратичное отклонение).

$$s = \left(\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1} \right)^{1/2} = 12,01$$

3) Коэффициент Стьюдента $t (P_{\text{дов}} = 0,95, n = 7) = 2,36$

$$\mu = \bar{X} \pm \frac{t \times s}{\sqrt{n}} = 96,40 \pm 10,21 \%$$

Степень извлечения дифенилолпропана из пластиката составила $96 \pm 10 \%$.

4.9. Идентификация диоктилфталата.

На хроматограмме экстракта из пластиката мы наблюдали 3 пика, помимо дифенилолпропана нами был идентифицирован ещё один компонент.

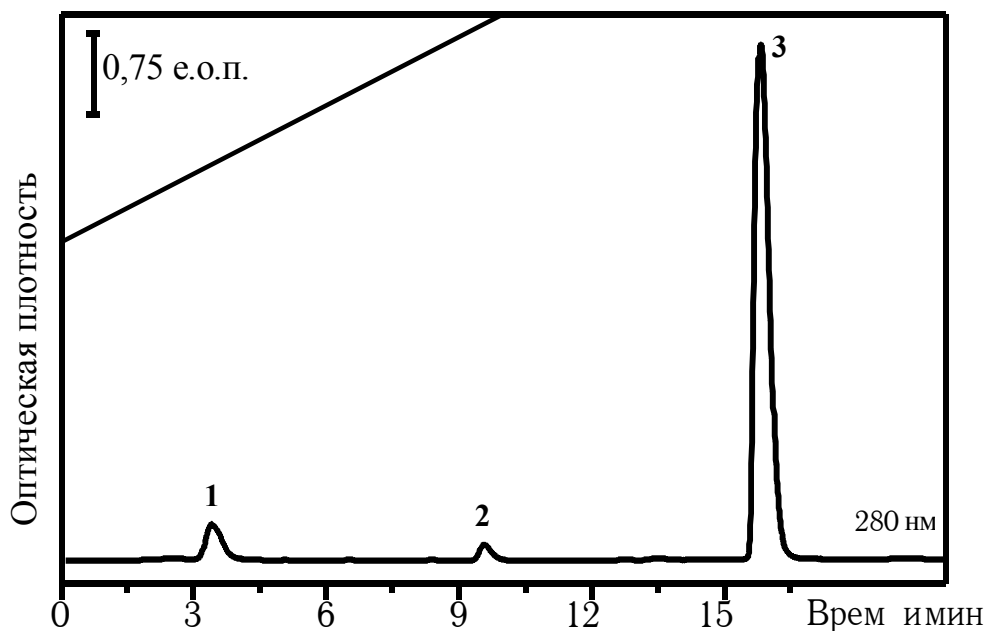


Рис. 19. Хроматограмма экстракта из пластиката

Хроматограмма стандартного образца диоктилфталата представлена на рис 20.

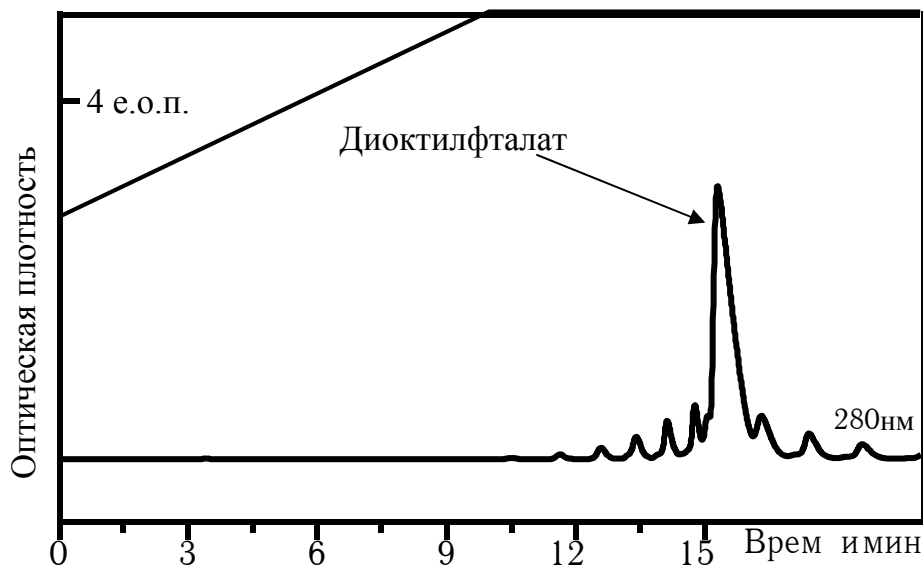


Рис. 20. Хроматограмма стандарта диоктилфталата.

Время удерживания стандартного образца диоктилфталата совпадает со временем удерживания обнаруженного в экстракте примеси (пик 3 на рис.19), это позволило сделать предположение, что он соответствует диоктилфталату.

Для более достоверной идентификации провели сравнение УФ-спектров примеси и стандарта диоктилфталата (Рис.21).



Рис. 21. Сравнение спектра диоктилфталата и пика примеси из экстракта пластика

Таблица 21. Сравнение спектральных отношений диоктилфталата и пика примеси из экстракта пластиката

	S_{λ}/S_{210}					
	S_{220}	S_{230}	S_{240}	S_{250}	S_{260}	S_{280}
Диоктилфталат	0,72	0,69	0,40	0,15	0,09	0,10
пик 3	0,73	0,70	0,41	0,16	0,09	0,10

Как видно из рисунка и таблицы, получено полное соответствие спектров поглощения и спектральных отношений примеси выделенной из пластиката.

5. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.

5.1. Оборудование

В работе использовали жидкостный хроматограф "Милюхром А-02" (ЗАО "ЭкоНова", Новосибирск), весы аналитические "Adventurer" и весы технические "Scout II" фирмы "Ohaus Europe" (Швейцария), ультразвуковая баня УЗВ-1/100 (Российская электротехническая компания "РЭЛТЕК", центрифуга "Mini Spin" фирмы "Eppendorf", бытовая микроволновая печь фирмы "Electa" .

5.2. Материалы и реактивы

жевательные резинки "DIROL" и "STIMOROL"

подсолнечное масло "Золотая семечка"

пластикат поливинилхлорида с антиоксидантом дифенилолпропаном получен в Новосибирском объединении "ХИМПЛАСТ"

ионол получен в НИОХ СО РАН

стабилизатор СО-3 получен В НИОХ СО РАН

1% водный раствор ТИРОЗОЛа-С Опытный цех НИОХ СО РАН

дифенилолпропан

вода дистиллированная

ацетонитрил для хроматографии с. 1. "Криохром", С.-Петербург

этанол гидролизный, перегнанный

гексан ч

5.3. Условия анализа

МЕТОД: однолучевой

КОЛОНКА: 2x75 мм Prontosil 120- 5-C18 AQ

ЭЛЮЭНТ А:	вода
ЭЛЮЭНТ Б:	ацетонитрил
ОБРАЗЕЦ:	4 мкл
ДЕТЕКТОР:	260, 280 нм. Время 0,34 с.
ПОТОК:	100 мкл/мин
РЕГЕНЕРАЦИЯ:	8 минут, Б 60%
ЭЛЮИРОВАНИЕ:	10 минут Б 60-100%, 10 минут Б 100%.

5.4. Методики

5.4.1. Методика определения ионола в жевательной резинке

1) Построение градуировочного графика:

0,0015 г ионола растворяли в 10 мл этанола, получен раствор с концентрацией 0,15мг/мл. Отбирали аликвоты по 1 мл и к ним добавляли нужное количество этанола. Были получены растворы с концентрацией 0,15-0,03 мг/мл.

Хроматографирование каждого из растворов проводили в условиях, описанных в разделе 5.3.

Полученные хроматограммы обработали с помощью программы МультиХром (обработка данных), и был построен градуировочный график. СКО при этом составило 1,06% (Рис.22). Фактор отклика (градуировочный коэффициент) равен 0,2488.

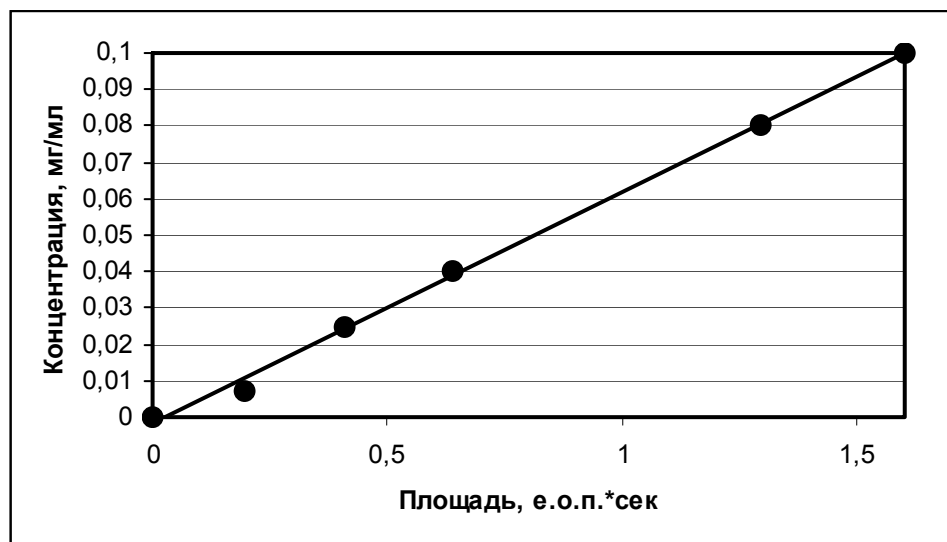


Рис.22. Градуировочный график для определения ионола.

2) Подготовка проб:

3 подушечки жевательной резинки и 20 мл этанола помещали в прибор для экстракции Сокслета. В течение 120 минут экстрагировали резинки этанолом на водяной бане при 90 °С с обратным холодильником. Спиртовые экстракты из прибора Сокслета для отделения взвешенных частиц помещали в центрифужные пробирки и

центрифугировали 10 мин при 7400 об/мин. Надосадочную жидкость отбирали для анализа.

3) Анализ

Хроматографирование отобранных проб проводили в условиях, описанных в разделе 5.3. Все хроматограммы обработали с помощью программы МультиХром. Время удерживания ионола 11,2 мин. Хроматограммы представлены на Рис. 23 и 24.

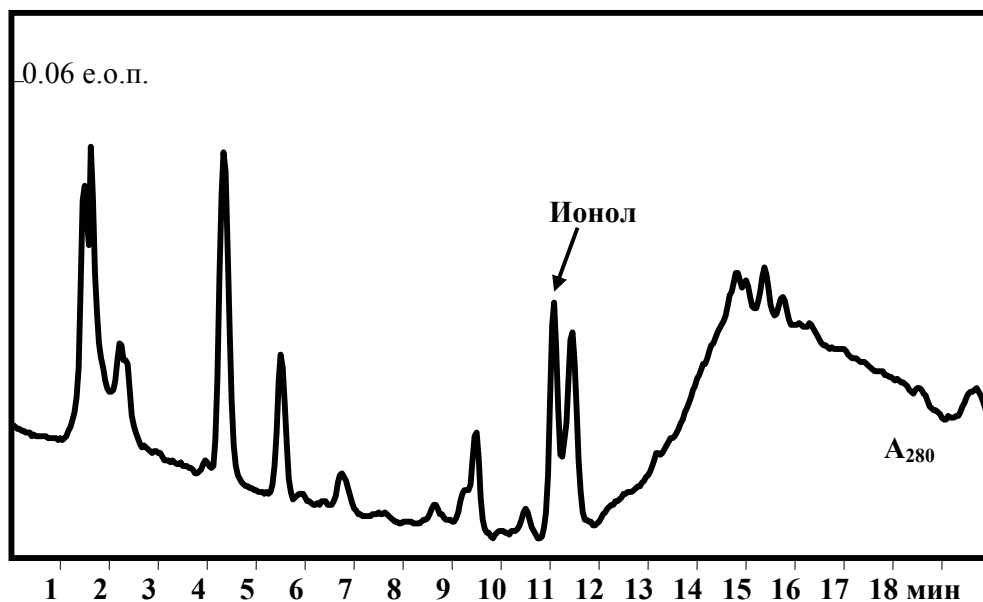


Рис.23. Хроматограмма экстракта из жевательной резинки "STIMOROL"

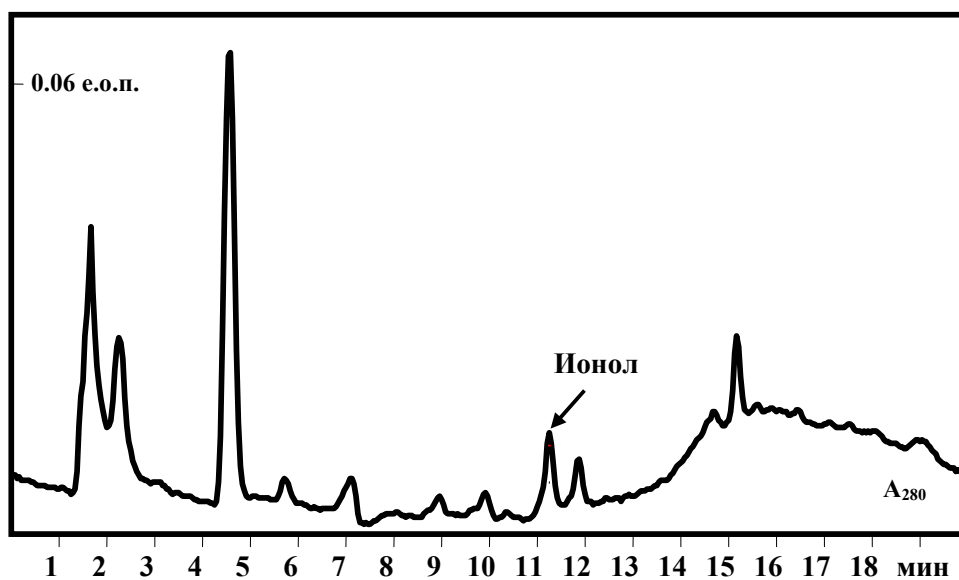


Рис. 24. Хроматограмма экстракта из жевательной резинки "DIROL"

5.4.2. Методика определения СО-3 в масле

1) Построение градуировочного графика:

0,0015 г СО-3 растворяли в 10 мл ацетонитрила, получили раствор с концентрацией 0,15 мг/мл. Из этого раствора отобрали аликвоты по 1 мл и к ним добавили необходимое количество ацетонитрила. Получили растворы с концентрацией 0,15-0,03 мг/мл.

Провели хроматографирование каждого из растворов в условиях, описанных в разделе 5.3.

Полученные хроматограммы обработали с помощью программы МультиХром (обработка данных), строили градуировочный график зависимости площадей пиков от концентрации антиоксиданта. СКО при этом составило 1,014% (Рис.25). Фактор отклика (градуировочный коэффициент) равен 0,13961.

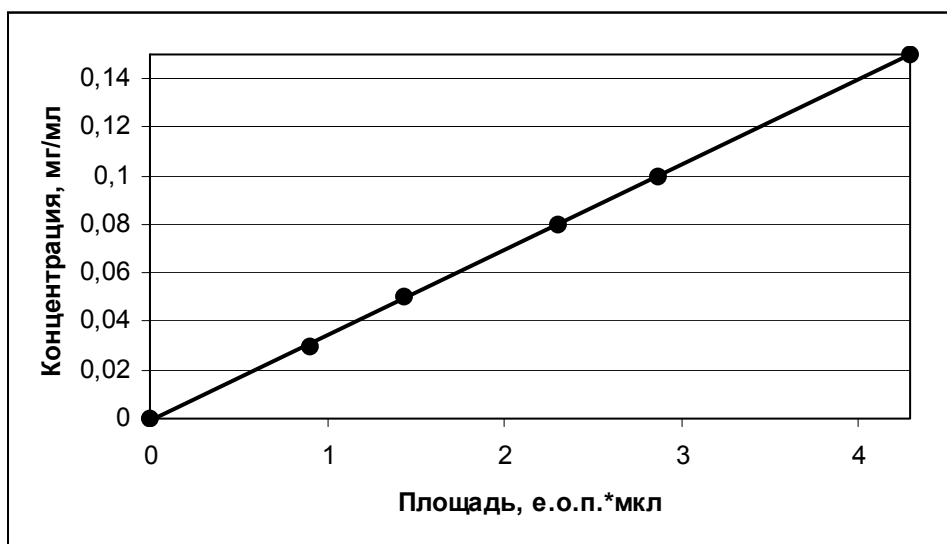


Рис.25. Градуировочный график СО-3

2) Подготовка проб

0,01 г СО-3 растворяли в 10 г масла. Раствор экстрагировали трижды ацетонитрилом по 1 мл. Все ацетонитрильные фракции объединяли, для отделения взвешенных частиц помещали в центрифужные пробирки и центрифугировали 10 мин при 7400 об/мин.

3) Анализ

Хроматографирование отобранных проб проводили в условиях, описанных в разделе 5.3. Все хроматограммы обработали с помощью программы МультиХром. Время удерживания СО-3 16,7 мин. Хроматограмма представлена на Рис. 26.

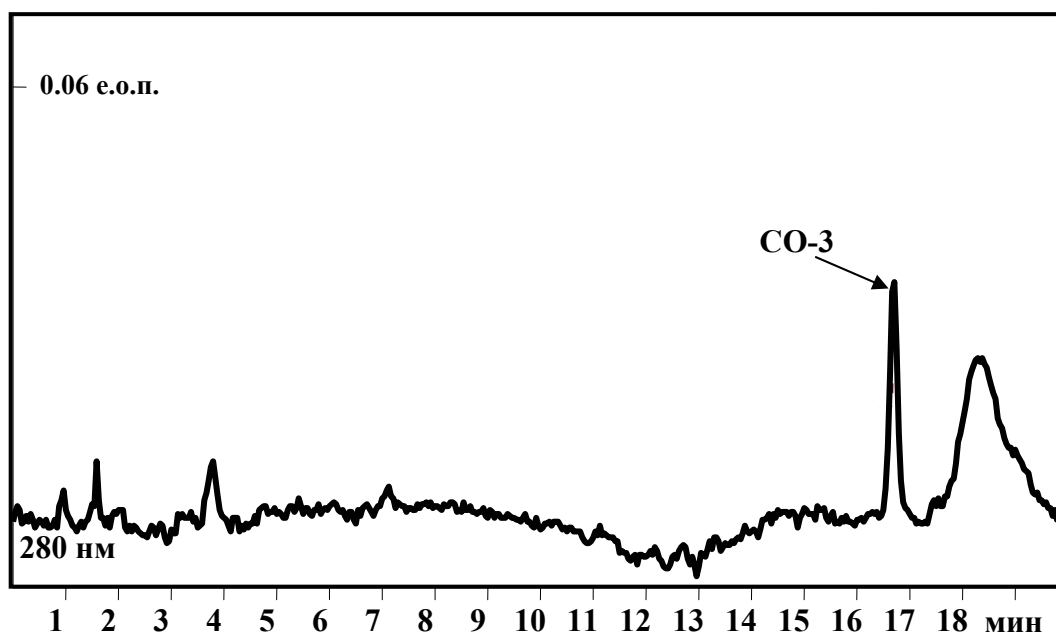


Рис.26. Хроматограмма экстракта СО-3 из масла

5.4.3. Методика определения дифенилолпропана в пластикате

1) Построение градуировочного графика:

0,002 г дифенилолпропана растворяли в 10 мл ацетонитрила, получен раствор с концентрацией 0,20 мг/мл. Отбирали аликвоты по 1 мл и к ним добавляли нужное количество ацетонитрила. Были получены растворы с концентрацией 0,20-0,01 мг/мл.

Хроматографирование каждого из растворов проводили в условиях, описанных в разделе 5.3.

Полученные хроматограммы обработали с помощью программы МультиХром (обработка данных), и был построен градуировочный график. СКО при этом составило 0,24 % (Рис.27). Фактор отклика (градуировочный коэффициент) равен 0,0764.

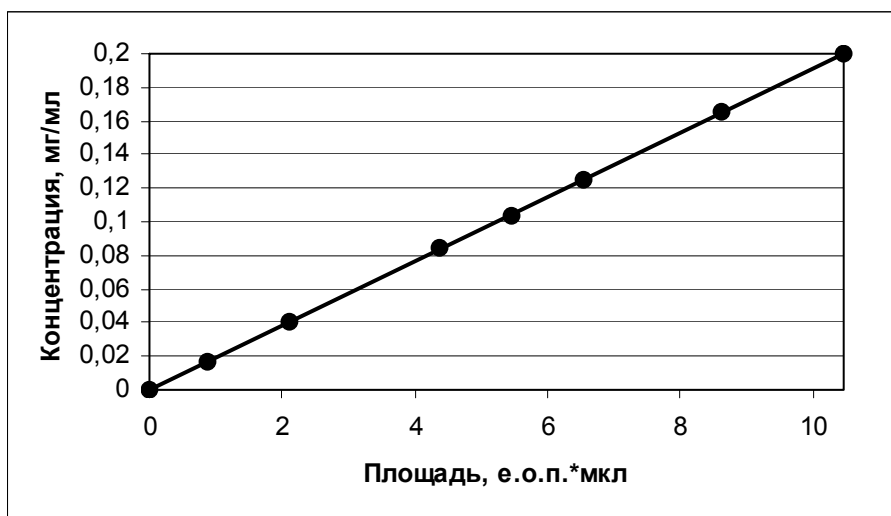


Рис. 27. Градуировочный график для определения дифенилолпропана

2) Подготовка проб:

3г пластиката и 20 мл ацетонитрила помещали в прибор для экстракции Сокслета. В течение 210 минут экстрагировали пластикат ацетонитрилом на водяной бане при 85 °С с обратным холодильником. Ацетонитрильные экстракты из прибора Сокслета для отделения взвешенных частиц помещали в центрифужные пробирки и центрифугировали 10 мин при 7400 об/мин. Надосадочную жидкость отбирали для анализа.

3) Анализ

Хроматографирование отобранных проб проводили в условиях, описанных в разделе 5.3. Все хроматограммы обработали с помощью программы МультиХром. Время удерживания дифенилолпропана 3,3 мин. Хроматограмма представлена на Рис.28.

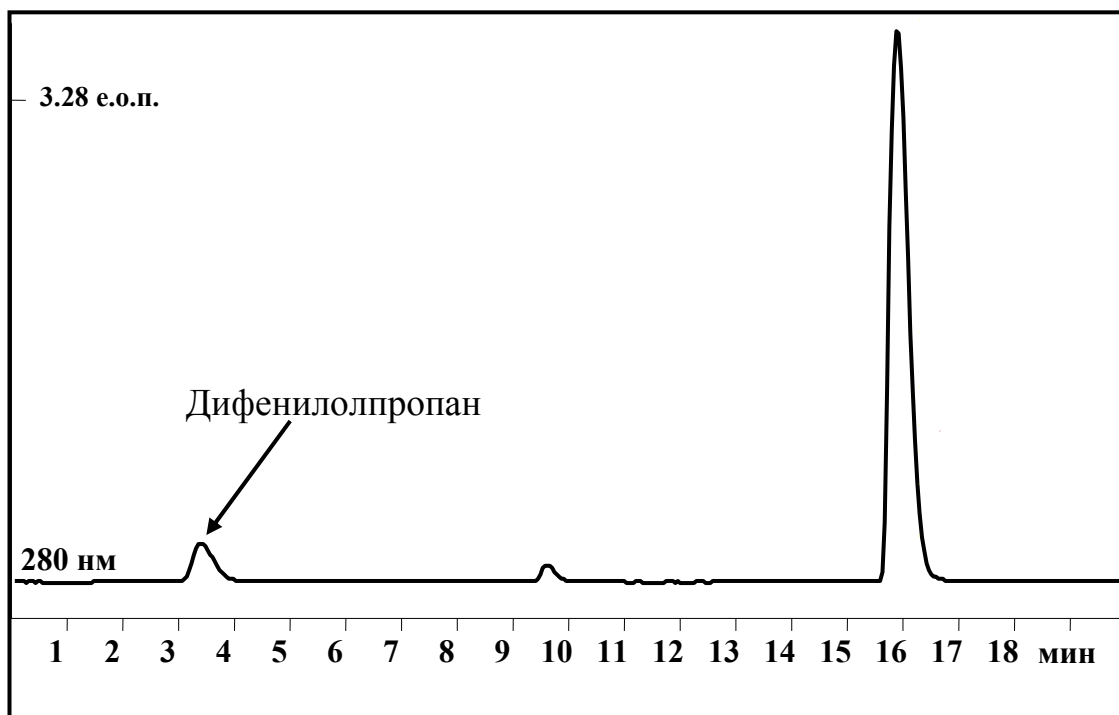


Рис. 28. Хроматограмма экстракта из пластиката

5.4.4. Методика определения тирозола-С в воде

1) Условия анализа:

КОЛОНКА:	2x75 мм Prontosil 120 -5-C18 AQ
ЭЛЮЭНТ А:	вода
ЭЛЮЭНТ Б:	ацетонитрил
ОБРАЗЕЦ:	4 мкл
ДЕТЕКТОР:	260, 280 нм. Время 0,34с.
ПОТОК:	100 мкл/мин
ЭЛЮИРОВАНИЕ:	5 минут.Б 20%

2) Построение градуировочного графика:

Приготовили растворы для градуировки. Разбавили имеющийся 1% водный раствор ТИРОЗОЛа-С водой до концентраций 0,2; 0,1; 0,067 и 0,05 мг/мл.

Проводили хроматографирование каждого раствора в условиях описанных в предыдущем пункте.

Полученные хроматограммы обработали с помощью программы МультиХром – (обработка данных), и построили градуировочный график. СКО при этом не должно превышать 2%. (Рис.29). Фактор отклика (градуировочный коэффициент) равен 0,01413.

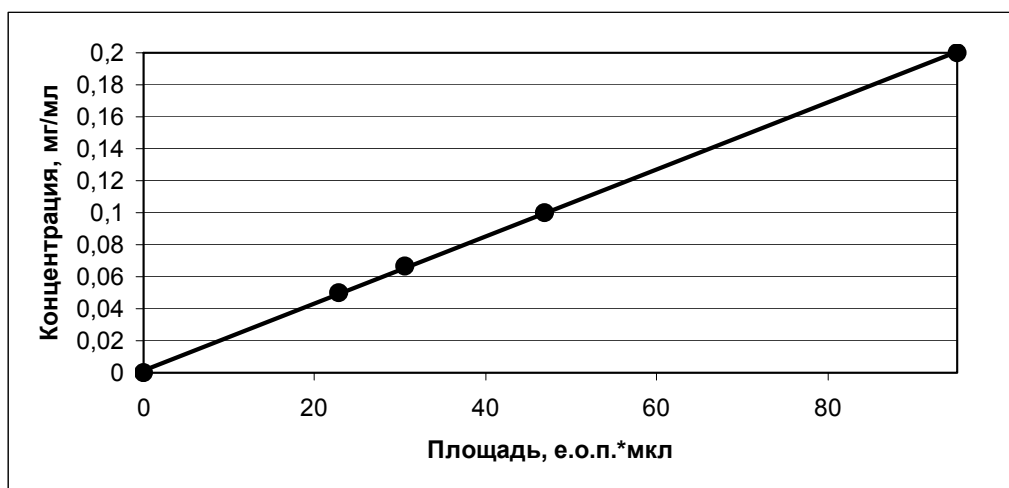


Рис. 29. Градуировочный график ТИРАЗОЛа-С

3) Анализ

Исследуемый раствор хроматографировали в условиях описанных в пункте 1 (Рис. 30).

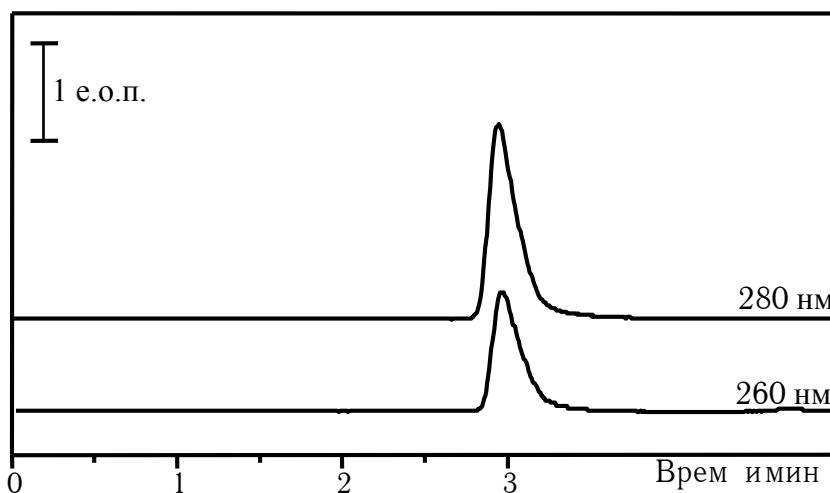


Рис.30. Хроматограмма образца ТИРАЗОЛа-С

С помощью полученного градуировочного графика определили концентрацию тирозола в исследуемом растворе.

Предел обнаружения тирозола - 0,07 мг/мл.

6. ВЫВОДЫ

1. В условиях обращенно-фазовой хроматографии исследовано влияние различных элюентов на хроматографическое поведение фенольных антиоксидантов

Установлено, что растворы кислот и солей практически не влияют на удерживание фенольных антиоксидантов, исключение представляют антиоксиданты, содержащие свободные аминогруппы.

Показано, что замена метанола на ацетонитрил позволяет изменять селективность.

2. Исследовано влияние температуры колонки на характеристики удерживания. Показано, что при повышении температуры удерживание высокомолекулярных стабилизаторов заметно уменьшается.

3. Исследовано влияние "крутизны" градиента на характеристики удерживания. Показано, что наилучшее разделение наблюдается при начальном содержании элюента Б 80%.

4. Разработаны методики определения антиоксидантов, пригодные для рутинного анализа. Показана возможность определения ионола, СО-3, дифенилолпропана и тирозола в различных объектах.

5. Подобраны условия и экстрагенты для выделения антиоксидантов из различных матриц.

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Эмануэль, Н.М., Денисов, Е.Т., Майзус, З.К. Цепные реакции окисления углеводов в жидкой фазе. - М.: Наука, 1965. - 375 с.
2. Рагинский, В.А. Фенольные антиоксиданты. Реакционная способность и эффективность. - М.: Наука, 1998. - 192-242 с.
3. Pfahler, G., Lotzsch, K. Stabilisierung von Polyolefinen für Anwendungen in Extrahierenden Medien // Kuntstoffe. - 1998. - № 78. - P. 142-148.
4. Шляпников, Ю.А., Кирюшкин, С.Г., Марьин, А.П. Антиокислительная стабилизация полимеров. - М.: Химия, 1986. - 252 с.
5. Химические добавки к полимерам. Справочник / Под ред. И.П. Масловой, - М.: Химия, 1981 - 5-45 с.
6. Стабилизатор СО-3 // Рекламный проспект Новосибирского института органической химии имени Н.Н.Ворожцова. СО РАН.
7. Стабилизатор Бензон-П // Рекламный проспект Новосибирского института органической химии имени Н.Н.Ворожцова. СО РАН.
8. Стабилизатор СО-4 // Рекламный проспект Новосибирского института органической химии имени Н.Н.Ворожцова. СО РАН.
9. Медоуз, Д.Х., Медоуз, Д.А., Рэндерс, Й. За пределами роста. М.: Прогресс, 1994. - 303 с.
10. Роль фенольных антиоксидантов в повышении устойчивости органических систем к свободно-радикальному окислению / Сорокина, И.В., Крысин, А.П., Хлебникова, Т.Б. и др. - Новосибирск, 1997. - 15 с.
11. Finley, J.W., Given, J.R. Technological necessity of antioxidants in the food industry // Food and Chemical Toxicology. - 1986. - Vol.24. № 10/11. - P.999.
12. Rehvaldt, R. Tracking the use of antioxidants through industry surveys // Food and Chemical Toxicology. - 1986. - Vol.24. № 10/11. - P. 1039.
13. Haigh, R. Safety and necessity of antioxidants: EES approach // Ibid. - P.1031.
14. Kirkpatrick, D.C., Lauer, B.H. Intake of phenolic antioxidants from foods in Canada // Ibid. - P. 1035.
15. Поздняковский, В.М. Гигиенические основы питания и экспертизы продовольственных товаров. - Новосибирск: издательство НГУ, 1996.
16. Шмулович, В.Г. Применение антиоксидантов в России для стабилизации жиров, пищевых и кормовых продуктов // Вопр. Питания. - 1994. - № 1-2. С.42-44.
17. Pratt, D.E. Natural Antioxidants from Plant Material // Chang J. Lee. Series 507. - Washington, 1992. - P.54.

18. Min, D.B., Wen, J. Qualitative and quantitative effects of antioxidants on the flavor stability of oil // J. Food Sci. - 1983. - Vol.48. № 4. - P. 1172-1182.
19. Хубулава, З.И. Длительное хранение пищевых жиров // Хлебопекарная и кондитерская промышленность. - 1983. - Вып. 12. - С. 18-20.
20. Изучение влияния бутилгидрокситолуола на термическую стойкость различных жиров / М. Пещевская, Х. Юруков, Н. Янишлиева и др. // Программа и тез. нац. науч.-технич. конф. "Новые тенденции развития масложировой промышленности. Бальчик, 8-10 окт., 1987 г." - София, 1987. - С. 44-45.
21. Coulter, R.B. Extending shelf life by using traditional phenolic antioxidants // Cereal Foods World. - 1988. - Vol. 33. № 2. - P. 207-210.
22. Augustin, M.A., Berry, S.K. Efficacy of the antioxidants BHA and BHT in palm olein during heating and frying // J. Amer. Oil Chem. Soc. - 1983. - Vol. 60. № 8. - P. 1520-1523.
23. Warner, C.R., Daniels, D.H. Fate of antioxidants and antioxidant-derived products in deepfat frying and cookie baking // J. Agr. and Food Chem. - 1986. - Vol. 34. № 1. - P. 1-5.
24. Ольшанская, Н.З., Васягина, М.И. Сохраняемость крестьянского масла в различных упаковочных материалах // Товароведение. - 1986. - Вып. 19. - С. 32-33.
25. Рудавская, М.В., Тищенко, Е.В., Шкарупа, В.Ф., Онищук, Г.А. Стабилизация качества яичного порошка при хранении // Совершенствование ассортимента и сохранение качества товаров народного потребления. - 1988. - С. 10-16.
28. Tokao Yuji, Lee Ho Chul, Kohra Shinya, Arizono Koji. J. Health Sci 2002. 48 №4 с 331-334. РЖ Хим 2003,00.03-19P2.57.
29. Nogyera-Orti J. F., Villanueva-Camanas R. M., Ramis-ramos G.. Anal. Chem. Acta, 402(1-2), 81-86 (English) 1999. CA 1999, 132: 121579.
30. Hu Xiaozhong, Yu Jianxin, Sun Guobao, Qian Haoming, Shao Junjie. Fenxi Ceshi Xuebao, 18(5), 21-24 (Chinese) 1999. CA 1999, 132: 193368.
31. Gagliardi L., DeOrsi D.. J. Liq. Chromatogr. And Relat. Technol-1997-20 № 11. С 1797-1808. РЖ Хим 2002, 00.02- 19P2.49
32. Wang Xiaoqiang, Hu Wenji. Fenxi Huaxue, 23(8), 930-932 (Chinese) 1995, CA 1998, 129: 193481.
33. Gagliardi L., De Orsi D., Manna L., J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol., 20(11), 1797-1808 (English) 1997, CA 1998, 127: 70588.
34. Meng Pengrui, Li Lianbo, Song Guilan. Suliao Gongye, 25(5), 104-105 (Chinese) 1997, CA 1998, 128: 141457.
35. Demertzis P. G., Franz R. Food Addit. Contam., 15(1), 93-99 (English) 1998, CA 1997, 128:269735.

36. Kawamura, Yoko, Miura. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 37(5), 272-280 (Japanese) 1996, CA 1997, 126:381037.
37. Kawamura, Yoko, Miura. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 38(1), 27-32 (Japanese) 1997, CA 1998, 126:263320.
38. Kawamura, Yoko, Watanabe. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 38(5), 307-318 (Japanese) 1997, CA 1998, 127:359616.
39. Macko T., Fyrtner B., Lederer K.. *Int.Journal Polym. Anal. Charact.*, 3(4), 368-379 (English) 1997, CA 1998, 127: 278982.
40. Garde Jose a., Catala Ramon, Gavara Rafael. *Food Addit. Contam.*, 15(6), 701-708 (English) 1998, CA 1998, 129: 274906.