

НОВОСИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ФАКУЛЬТЕТ ЕСТЕСТВЕННЫХ НАУК
Кафедра аналитической химии
Научно-учебно-методический Центр "Хроматография"

Курсовая работа

**Жидкостная хроматография антиоксидантов,
производных 2,6-ди-*трет*-бутилфенола**

Работу выполнила:

Метелёва Елизавета Сергеевна

студентка 047 группы

Научный руководитель:

К.х.н. Кобрина Виолетта Николаевна

Новосибирск - 2004

Содержание

Литературный обзор.	
1. Применение антиоксидантов	3
2. Определение антиоксидантов в различных объектах	7
Результаты и обсуждения.	
1. Исследование зависимости характеристик удерживания антиоксидантов от состава элюирующих смесей	10
2. Исследование зависимости характеристик удерживания антиоксидантов..... от температуры	13
3. Разработка методик определения антиоксидантов:	
3.1 Разработка методики определения тирозола в воде	14
3.2 Разработка методики определения фенозана 43 в полиэтилене	16
Выводы	19
Список литературы	20

Литературный обзор

Применение и анализ антиоксидантов методом ВЭЖХ

1. Применение антиоксидантов

Характерной чертой любого индустриального общества является рост объемов потребляемых материалов и сопутствующий ему рост отходов на всем пути производства, эксплуатации и потребления. Подсчитано, что тонне мусора, накапливающегося у потребителей, соответствуют 5 т отходов, образующихся на стадии изготовления продукции, и 20 т 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 [1]. 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.).

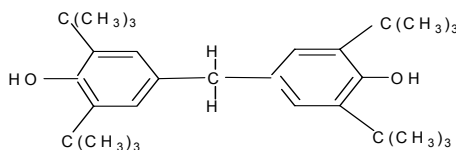
Антиоксидант полностью подавляет процесс окисления в полимере до тех пор, пока его активность не утратится. Далее процесс окисления развивается и приводит к разрушению полимера.

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 отчищают материал от перекисных продуктов.

Далее приводятся основные свойства нескольких антиоксидантов, используемых в промышленности полимеров. Для каждого продукта приведены структурная формула, физико-химические свойства, области применения.

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



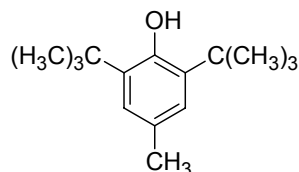
Светло-желтый кристаллический порошок; температура плавления 155-155,5°C; температура кипения 217°C(133 Па) и 289°C(53 гПа). Растворяется в ацетоне, бензоле, толуоле, метилэтилкетоне; ограниченно растворяется в этаноле и метаноле, не растворяется в воде. Относится к числу малоокрашивающих стабилизаторов.

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.

Инол (2,6-Ди-*трет*-бутил-4-метилфенол).



Белый кристаллический порошок, температура плавления 70°C; температура кипения 265°C. 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.

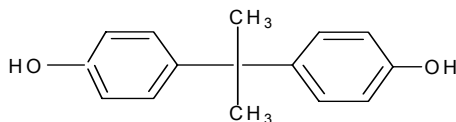
Стабилизатор различного вида синтетических каучуков (бутадиен-стирольных, бутадиен-метилстирольных, бутадиен-нитрильных, бутадиеновых, изопреновых, уретановых и др.); эффективен в сочетании с производными вторичных аминов. Дозировка до 2%.

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

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

Дифенилолпропан.

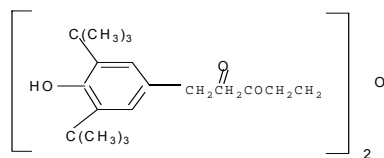


Бесцветный кристаллический продукт; температура плавления 156-157°C (18гПа). Растворяется в метиловом, этиловом, изопропиловом и бутиловом спиртах, уксусной кислоте, ацетоне, диэтиловом эфире; ограниченно растворяется в воде.

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.

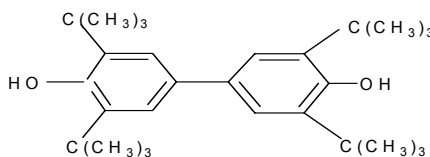
Фенозан 28 (Эфир 3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенилпропионовой кислоты и диэтиленгликоля)



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'



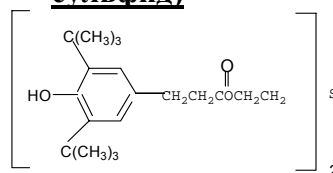
Светло-желтый кристаллический порошок; температура плавления 186°C. Растворяется в этаноле, изопентане, толуоле; не растворяется в воде, растворах щелочей. Относится к числу неокрашивающих стабилизаторов.

Стабилизатор диеновых каучуков; по эффективности действия равноценен смеси неозона Д и ДФФД.

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 блок-сополимеров бутадиена и стирола. В дозировке до 0,3% разрешен для применения в полимерах, контактирующих с пищевыми продуктами [2].

Помимо того, что антиоксиданты используют в промышленности полимеров, их успешно используют и в пищевой промышленности. 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.

Поиск соединений, замедляющих окисление создаваемых материалов и пищевых продуктов, привел к тому, что уже в начале 20-го века было известно свыше 500 природных и синтетических антиокислителей, включая производные фенолов. В

настоящее время в мире сложился устойчивый рынок различных по назначению и химической структуре антиоксидантов, в котором фенольные антиокислители занимают отдельную нишу. Благодаря своей малой токсичности они находят применение прежде всего в материалах, контактирующих с человеком (в производстве медицинского оборудования, пищевых упаковок, детских игрушек и т.д.), а также в продуктах питания и кормах.

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. [3]. 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 [4]. В России синтетические антиоксиданты используются в производстве некоторых видов пищевых жиров и масел в том числе в маслах для медицинских препаратов [5].

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°C в течении двух месяцев, тогда как за тот же срок при $+5^{\circ}\text{C}$ становится полностью непригодным к употреблению. Включение антиокислителей в упаковочные материалы позволяет резко усилить их защитные свойства.

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.

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.

2. Определение 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 $80-100^{\circ}\text{C}$ 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 [6].

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 Noguera-Orti, J. F.; Villanueva-Camanas, R. M.; Ramis-Ramos 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 (pH =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 [7]

В этом же году вышла еще одна статья, но уже китайских ученых Hu, Xiaozhong; Yu, Jianxin; Sun, Guobao; Qian, Haoming; Shao, Junjie, которые описали методику одновременного определения девяти антиоксидантов в маслах и жирах с помощью обращено-фазной ВЭЖХ. В качестве подвижной фазы использовалась кислая система метанол-вода-уксусная кислота, элюирование - градиентное, длительность анализа составляла 30 минут [8]

Что касается косметических и фармацевтических препаратов, то в 1997 году в J.Liq.Chromatogr. and Relat.Technol. была опубликована статья об одновременном определении антиоксидантов в косметических и фармацевтических препаратах с помощью обращено-фазной 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 УФ-детектором. Концентрацию соединений определяли при 254, 263, 280 нм и сравнивали с калибровочными графиками [9].

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 соэкстрагирующихся 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 [10].

Описывается одновременный метод определения многочисленных добавок в косметике на масляно - водной основе и фармацевтических препаратах с помощью метода ВЭЖХ. Используется фаза RP-8 select B, линейный градиент и УФ-детектирование. Разделение проводится для 9 антиоксидантов и 7 консервантов, которым хорошо подходят выбранные хроматографические условия. Были получены удовлетворительные результаты, в частности, хорошая воспроизводимость. [11]

Метод ВЭЖХ используют для определения стабилизаторов в поливинилхлориде. Так, в 1997 году китайскими учеными 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 [12].

В 1998 году германские ученые 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 для того, чтобы получить приемлемый количественный анализ. Результаты показали, что 4 добавки были устойчивы во всех образцах в данных условиях. Только один показал отклонения в заменителях, содержащих этанол. Был сделан вывод, что метод ВЭЖХ приемлем для изучения стабильности добавок в водных и жировых пищевых заменителях [13].

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 нагретым до температуры 37°C. Экстракты концентрировали и растворяли в теплом ацетонитриле. Анализ проводили методом обращено-фазовой ВЭЖХ с УФ-детектированием при длине волны 225 нм. Применяли линейный градиент 3:2 ацетонитрил - вода - ацетонитрил. Все 28 видов добавок были идентифицированы [14].

Год спустя эти же ученые провели исследования этих же 28 видов антиоксидантов и светостабилизаторов в полиэтиленовых изделиях. 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 тубики. 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 в течение 30 минут. Некоторые были растворены в *n*-гептане при 25°C в течение 60 минут. [15]

Kawamiga применил метод одновременного определения для 53-х полимерных добавок в полиэтилене, таких как 21 антиоксидант, 9 УФ-стабилизаторов, 20 лубрикантов и 3-х пластификаторов. Все компоненты могут быть качественно идентифицированы с помощью газовой хроматомасс-спектрометрии, используя пятиметровую колонку с силикагелем или стальную капиллярную колонку заполненную диметилполисилоксаном. Образцы были приготовлены по опубликованным данным для анализа методом ВЭЖХ. Предел обнаружения – 50-500 мг/г – зависит от компонентов. В полиэтиленовых изделиях было идентифицировано 9 компонентов. Предложенный метод пригоден для обнаружения полимерных добавок в полиэтиленовых изделиях, например, пищевых упаковках [16]

Описан новый метод количественного определения сульфосодержащих антиоксидантов в полиэтилене. Полимерная матрица была растворена в *n*-гептане/изопропанол (97:3 по объёму) при 160°C 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 [17]

Были исследованы 6 антиоксидантов в различных образцах полипропилена двух-ступенчатой сверхкритической флюидной экстракцией (СКЭ), в которой обе ступени есть критическая и динамическая часть анализа. Аналитические условия были оптимизированы при анализе 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 объем молекул этих антиоксидантов отвечает за значительное уменьшение эффективности. Размеры и форма частиц образцов полимеров также важны. Увеличение отношения поверхности к объёму повышает эффективность [18]

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

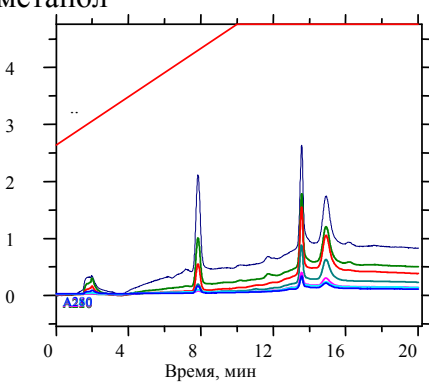
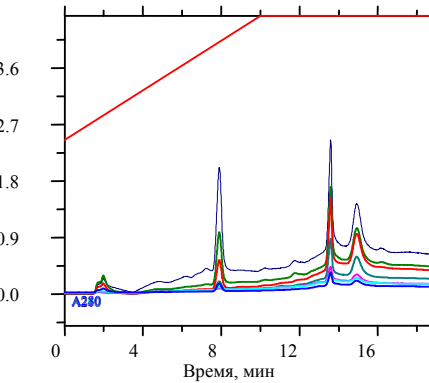
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

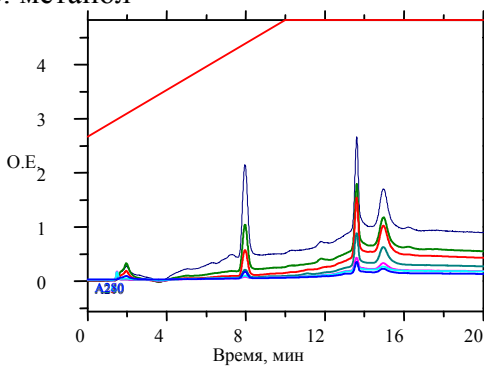
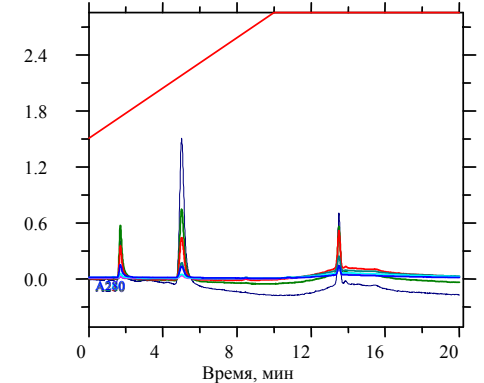
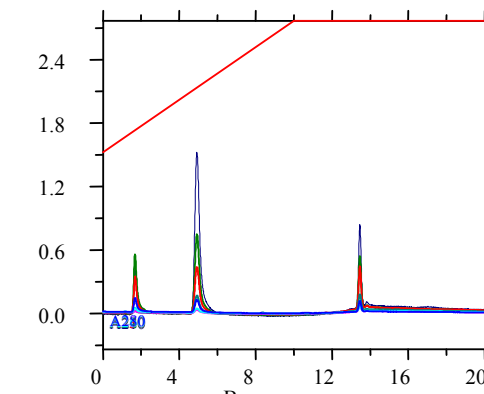
I. Исследование зависимости характеристик удерживания антиоксидантов от состава элюирующих систем

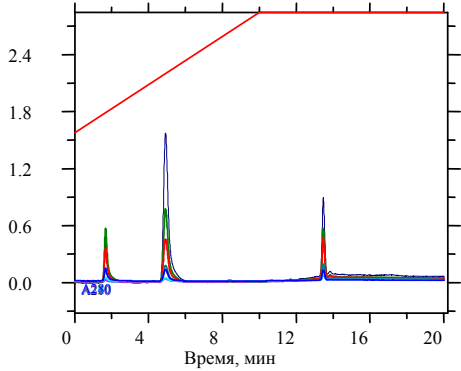
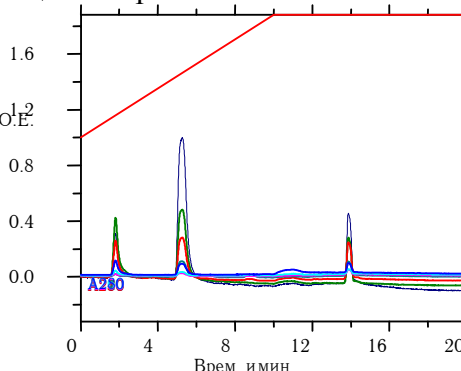
В прошлом семестре нами были изучены характеристики удерживания 20 антиоксидантов с применением обращено-фазной хроматографии на колонке с сорбентом Prontosil C 18 AQ и с элюентом метанол - 0.005 М фосфорная кислота. Эта система оказалась пригодной для всех исследуемых антиоксидантов, однако большая 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 и были исследованы их характеристики удерживания в различных элюентах. Результаты исследований приведены в таблице 1. Следует отметить, что для антиоксидантов со свободной аминогруппой ни одна из новых элюирующих систем не оказалось пригодной.

Таблица 1: Зависимость время удерживания антиоксидантов от элюентов.

Состав элюента и хроматограмма	Время удерживания, мин (№пика)		
	тирозол	дитретбутил-фенилпропан	фенозан 43
А: фосфорная кислота Б: метанол 	13,57 (2)	7,85 (1)	14,92 (3)
А: трифторуксусная кислота Б: метанол 	13,58 (2)	7,90 (1)	14,92 (3)

Состав элюента и хроматограмма	Время удерживания, мин (№пика)		
	тирозол	дитретбутил-фенилол-пропан	фенозан 43
А: вода Б: метанол 	13,58 (2)	7,90 (1)	14,92 (3)
А: трифторуксусная кислота Б: ацетонитрил 	1,71 (1)	5,02 (2)	13,51 (3)
А: фосфорная кислота Б: ацетонитрил 	1,83 (1)	4,98 (2)	13,48 (3)

Состав элюента и хроматограмма	Время удерживания, мин (№пика)		
	тирозол	дитретбутил-фенилол-пропан	фенозан 43
А: вода Б: ацетонитрил 	1,70 (1)	4,95 (2)	13,50 (3)
А: водный раствор перхлорат лития Б: ацетонитрил 	1,81 (1)	5,26 (2)	13,87 (3)

По хроматограммам видно, что при замене элюента А особых изменений не произошло. Добавки солей и кислот в элюент не оказывают существенного влияния на характеристики удерживания антиоксидантов.

Замена 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 антиоксидантов, производных 2,6-ди-*трет*-бутилфенола, 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) (рис. 1).

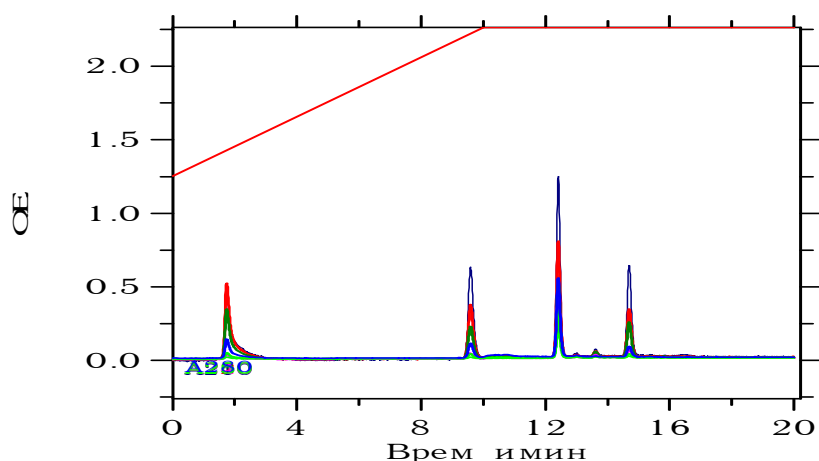


Рис. 1. Хроматограмма смеси: ионол, СО-3, бензон П, роддендрол, (4-(2-аминоэтил)-2,6-ди-*трет*-бутилфенол).
Элюент: ацетонитрил-вода.

Таблица 2. Сравнительные характеристики удерживания веществ для систем метанол-фосфорная кислота и ацетонитрил-вода

Название антиоксиданта	t_R для системы метанол-фосфорная кислота, мин	t_R для системы ацетонитрил- вода, мин
Ионол	11,3	9,6
Роддендрол	11,4	1,8
(4-(2-аминоэтил)-2,6-ди- <i>трет</i> -бутилфенол)	11,4	Не элюируется
Бензон П	13,7	12,4
СО-3	14,3	14,7

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.

II. Исследование зависимости 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:

МЕТОД:	однолучевой
КОЛОНКА:	2x75 мм с Prontosil-120-5-C18 AQ
ЭЛЮЕНТ А:	вода
ЭЛЮЕНТ В:	ацетонитрил
ОБРАЗЕЦ:	4 мкл
ДЕТЕКТОР:	210, 220, 230, 240, 250, 260, 280 нм. Время 0,06 с.
ПОТОК:	100 мкл/мин
РЕГЕНЕРАЦИЯ:	8 минуты (60% Б)
ГРАДИЕНТ:	10 мин от 60 до 100% Б; 10 мин 100% Б.

Таблица 3: Зависимость времени удерживания от температуры.

температура, °С.	Хроматограмма	время удерживания, мин.		
		тирозол	дитретбутилфенилолпропан	фенозан 43
40		1,67	4,93	13,47
50		1,70	4,67	13,05
60		1,67	4,43	12,65

Из табл. 3 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.

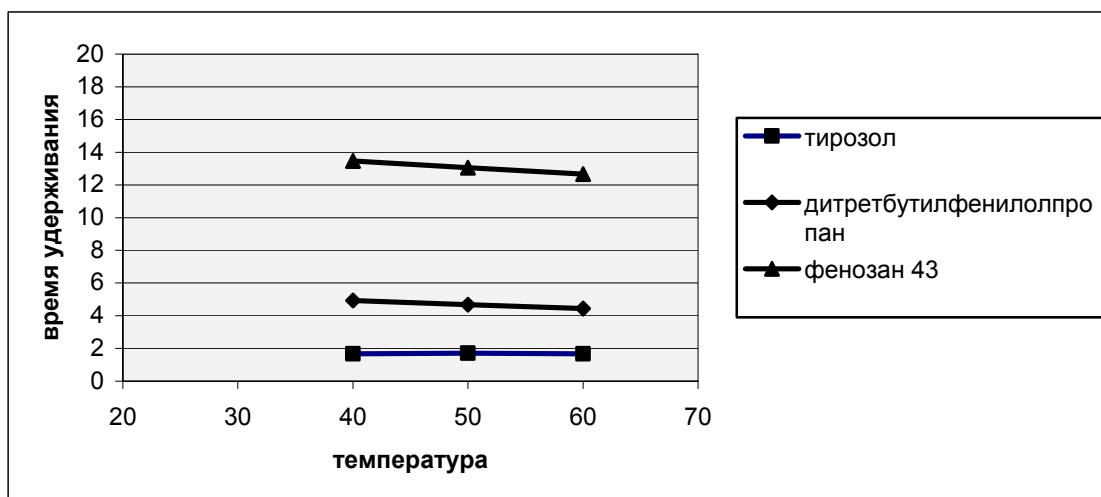


Рис. 2.. Зависимость характеристик удерживания антиоксидантов от температуры.

III. Разработка методик определения стабилизаторов

3.1. Как отмечено выше, фенольные антиоксиданты широко используются в различных областях хозяйства для стабилизации различных продуктов и материалов. Нам представлялось интересным на основе полученных данных о хроматографическом поведении исследуемых производных 2,6-ди-*трет.*бутилфенола разработать методики их определения, пригодные для практического применения.

Тирозол (аурол) в течение ряда лет испытывается ветеринарами для подкормки молодняка крупного и мелкого скота. Его дают телятам и поросятам с питьевой водой. Такие подкормки уменьшают падеж молодняка и увеличивают привес.

Кроме того, в последние годы начаты испытания этого препарата как биологически активной пищевой добавки для человека. Тирозол показал обнадеживающие результаты как адаптоген, способствует облегчению похмельного синдрома, помогает снять усталость при длительных ночных дежурствах.

Поэтому, нами была разработана методика определения тирозола в воде. Для работы был взят препарат, полученный в Опытном химическом цехе НИОХ СО РАН.

Разработка методики определения тирозола-С в воде.

1. Принцип метода: количественное определение с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), на приборе МИЛИХРОМ А-02.

2. Реактивы и материалы:

1% водный раствор ТИРОЗОЛа-С Опытный цех НИОХ СО РАН
 вода дистиллированная
 ацетонитрил для хроматографии с. 1. "Криохром", С.-Петербург.

3. Подготовительные операции.

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 следующих условиях:

МЕТОД:	однолучевой
КОЛОНКА:	2x75 мм Prontosil 120 5С-8 АQ
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
 РЕГЕНЕРАЦИЯ: 3 минуты Б20%
 ЭЛЮИРОВАНИЕ: 5 минут. Б 20%

Полученные хроматограммы обработали с помощью программы МультиХром – (обработка данных), и построили градуировочный график. СКО при этом не должно превышать 2%. (Рис.3). Фактор отклика (градуировочный коэффициент) равен 0,01413.

Градуировочная зависимость: $Q = 0.0141335 \cdot A$
 СКО: 1.569 %

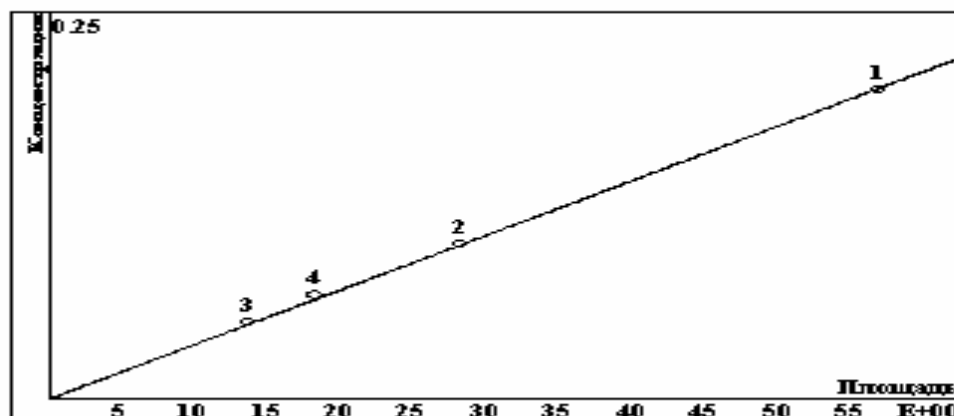


Рис. 3. Зависимость площади пика тирозола от концентрации образца мг/мл

4. Анализ.

Исследуемый раствор хроматографировали в условиях описанных в предыдущем пункте. (Рис.4).

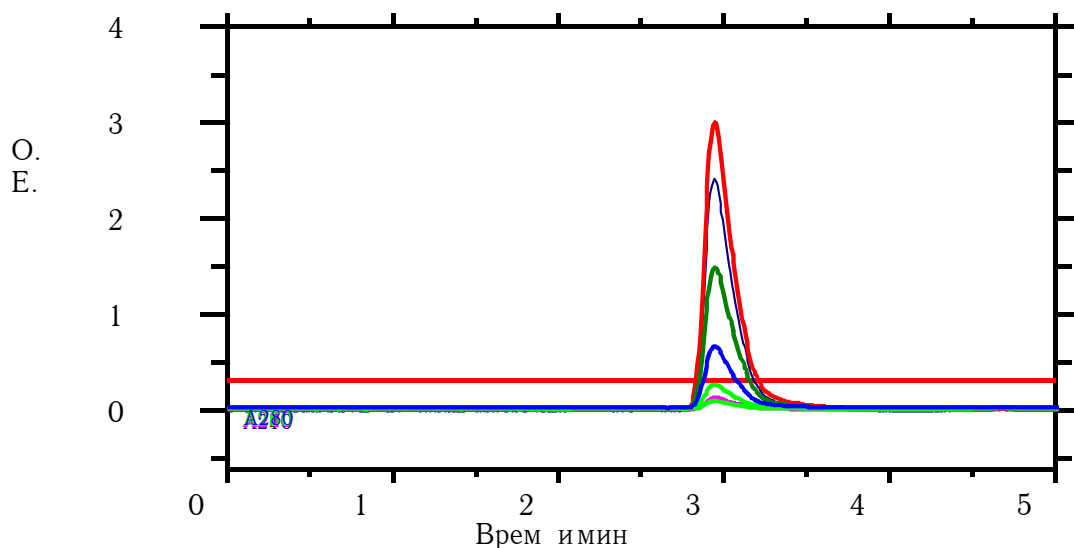


Рис. 4. Хроматограмма образца тирозола

С помощью полученного градуировочного графика определили концентрацию тирозола в исследуемом растворе. Предел обнаружения тирозола - 0,07 мг/мл. СКО не более 3%.

3.2. Антиоксидант фенозан 43 широко используется в качестве стабилизатора различных полимерных материалов, в том числе полиэтилена. Нами был взят полиэтилен из упаковочного материала и в него был добавлен фенозан 43. В качестве экстрагента применен хлороформ. Экстракцию проводили стряхиванием а затем настаиванием образцов мелко измельченного полиэтилена в хлороформе.

Методика определения фенозана 43 в полиэтилене.

1. Принцип метода: количественное определение с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), на приборе МИЛИХРОМ А-02.

2. Реактивы и материалы.

- Пакеты из полиэтилена
- Хлороформ техн., перегнанный
- Фенозан 43
- Вода дистиллированная
- Ацетонитрил для хроматографии с. 1 "Криохром" С.-Петербург.

3. Подготовительные операции.

3.1 Подготовка проб

Измельчили полиэтиленовые пакеты. Отобрали по 10 г измельченного полиэтилена в две колбы. В одну из колб добавили 0.1 г фенозана 43 (контрольная проба). В обе колбы налили по 20 мл хлороформа. Оставили примерно на 24-48 ч.

3.2. Построение градуировочного графика.

Взяли навеску 0,01 г фенозана 43. Приготовили растворы фенозана 43 в хлороформе с концентрациями 10; 3,33; 2,5; 2 мг/мл. Проводили хроматографирование в следующих условиях:

- МЕТОД: однолучевой
- КОЛОНКА: 2x75мм Prontosil 120 5C-8 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
- РЕГЕНЕРАЦИЯ: 8 минут 60%Б
- ГРАДИЕНТ: 10 мин от 60 до 100%Б, 10 мин 100%Б.

Полученные хроматограммы обработали с помощью программы МультиХром – (обработка данных, и построили градуировочный график (рис 5). СКО при этом не должно превышать 8%. Фактор отклика (градуировочный коэффициент) равен 0,04751.

Градуировочная зависимость: $Q = 0.0475049 \cdot A$
 СКО: 7.445 %

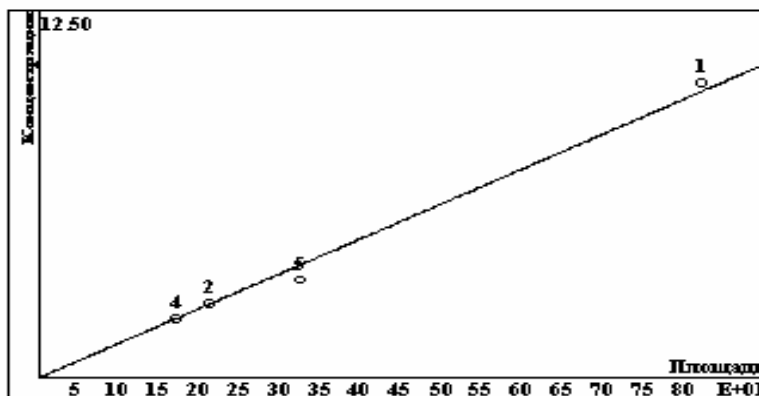


Рис.5 Зависимость площади пика фенозана 43 от концентрации образца мг/мл.

4. Анализ.

Подготовленную по п. 3.1 пробу полиэтилена вводили в хроматограф и записывали в тех же условиях, что и градуировочные растворы (рис.6).

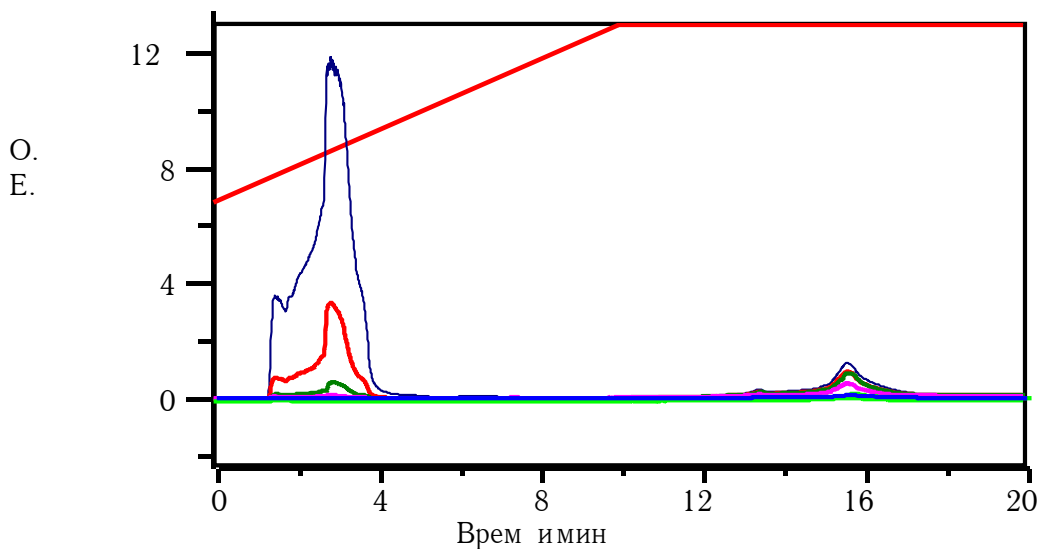


Рис. 6 Хроматограмма экстракта образца полиэтилена без стабилизатора (холостой опыт)

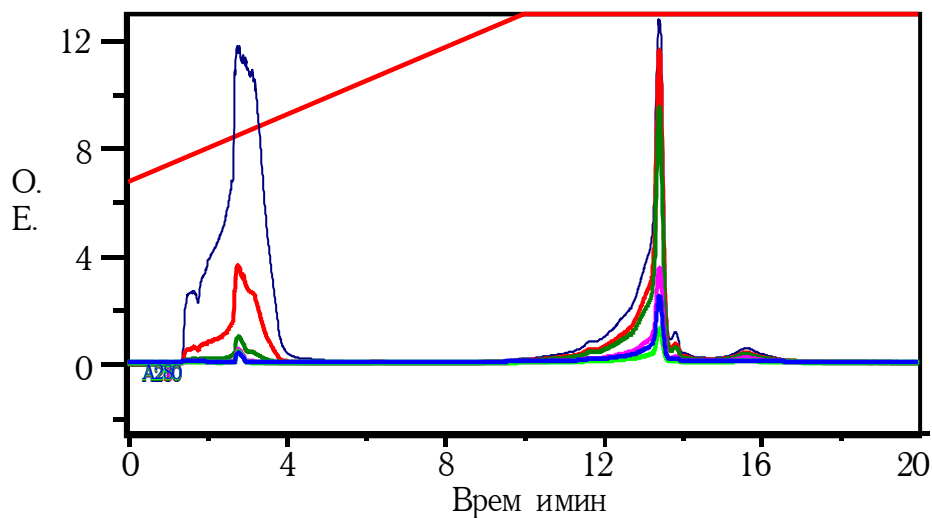


Рис.7 Хроматограмма экстракта образца полиэтилена с добавкой фенозана 43.

Хроматограммы обрабатывали с помощью программы «Мультихром». Предел обнаружения стабилизатора в полиэтилене не более 0.1%..

Выводы

1. В условиях обращенно-фазной хроматографии исследовано влияние различных элюентов на хроматографическое поведение антиоксидантов, производных 2,6-ди-*трет.*бутилфенола. Установлено, что кислоты и соли практически не влияют на удерживание веществ. Показано, что замена метанола на ацетонитрил позволяет изменять селективность.
2. Показано, что при повышении температуры удерживание высокомолекулярных стабилизаторов заметно уменьшается.
3. Разработаны методики определения антиоксидантов, пригодные для рутинного анализа. Показана возможность определения тирозола в препаратах, предназначенных для ветеринарии и фенозана 43 - в полимерных материалах.

Список литературы

1. Медоуз Д.Х., Медоуз Д.Л., Рэндерс Й. За пределами роста. - М.: Прогресс, Пангея, 1994. стр. 303.
2. Химические добавки к полимерам. Справочник. Под редакцией Масловой И.П.. Москва "Химия" , 1981 год.
3. Rehwoldt R. Tracking the use of antioxidants through industry surveys // Food and Chemical Toxicology - 1986.- vol. 24, № 10/11. – P.1039
4. Haigh R. Safety and necessity of antioxidants: EES approach // Ibid. – P. 1031.
5. Поздняковский В.М. Гигиенические основы питания и экспертизы продовольственных товаров. Новосибирск. Издательство НГУ, 1996.
6. 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.
7. 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.
8. Hu Xiaozhong, Yu Jianxin, Sun Guobao, Qian Haoming, Shao Junjie. Fenxi Ceshi Xuebao, 18(5), 21-24 (Chinese) 1999. CA 1999, 132: 193368.
9. Gagliardi L., DeOrsi D.. J. Liq. Chromatogr. And Relat. Technol-1997-20 № 11. С 1797-1808. РЖ Хим 2002, 00.02- 19P2.49
10. Wang Xiaoqiang, Hu Wenji. Fenxi Huaxue, 23(8), 930-932 (Chinese) 1995, CA 1998, 129: 193481.
11. Gagliardi L., De Orsi D., Manna L., J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol., 20(11), 1797-1808 (English) 1997, CA 1998, 127: 70588.
12. Meng Pengrui, Li Lianbo, Song Guilan. Suliao Gongye, 25(5), 104-105 (Chinese) 1997, CA 1998, 128: 141457.
13. Demertzis P. G., Franz R. Food Addit. Contam., 15(1), 93-99 (English) 1998, CA 1997, 128:269735.
14. Kawamura, Yoko, Miura. Shokuhin Eiseigaku Zasshi, 37(5), 272-280 (Japanese) 1996, CA 1997, 126:381037.
15. Kawamura, Yoko, Miura. Shokuhin Eiseigaku Zasshi, 38(1), 27-32 (Japanese) 1997, CA 1998, 126:263320.
16. Kawamura, Yoko, Watanabe. Shokuhin Eiseigaku Zasshi, 38(5), 307-318 (Japanese) 1997, CA 1998, 127:359616.
17. Macko T., Fyrtner B., Lederer K.. Int.Journal Polym. Anal. Charact., 3(4), 368-379 (English) 1997, CA 1998, 127: 278982.
18. Garde Jose a., Catala Ramon, Gavara Rafael. Food Addit. Contam., 15(6), 701-708 (English) 1998, CA 1998, 129: 274906.