



Antioxidánsok és bomlástermékeik kimutatása folyadékkromatográfiás módszerrel étolajból

TDK dolgozat

Szerző: **Veréb Zsolt**
IV. évfolyam, vegyészmérnök BSc

Témavezetők: Dr. Fejes Zsolt¹, Dr. Mentés Dóra²
¹ egyetemi docens, Miskolci Egyetem, Kémiai Intézet
² tudományos munkatárs, Miskolci Egyetem, Kémiai Intézet

Lezárva: 2024. december 17.

Tartalomjegyzék

Rezümé	2
Rövidítésjegyzék.....	3
1. Bevezetés	4
2. Irodalmi összefoglaló.....	5
2.1 Az antioxidánsok szerepe az élelmiszeriparban	5
2.1.1 Gallátok (propil-gallát, oktil-gallát, lauril-gallát)	5
2.1.2 Di- <i>terc</i> -butil-hidroxi-toluol (BHT)	7
2.1.3 Butil-hidroxi-anizol (BHA).....	7
2.1.4 <i>Terc</i> -butil-hidrokinon (TBHQ)	8
2.2 Antioxidánsok olajból való mennyiségi meghatározása	9
2.3 Nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC).....	9
2.4 Az antioxidánsok bomlástermékeinek hatásai a szervezetre	11
3. Kísérleti rész	14
3.1 Extrakciós módszer	14
3.2 Centrifugás módszer	14
3.3 Folyadékkromatográfiás mérés	15
3.4 A BHT és a TBHQ bomlásának vizsgálata	17
4. Eredmények és kiértékelésük.....	17
4.1 Extrakciós módszer	17
4.1.1 Az extrahálószer olajoldó képessége	17
4.1.2 Visszanyerés az extrakciós módszer esetében	18
4.2 Centrifugás módszer.....	19
4.3 Az eluens pH értékének befolyása a HPLC mérésre	24
4.4 Folyadékkromatográfiás kalibráció	25
4.5 A BHT és a TBHQ olajban történő bomlásának vizsgálata	26
4.5.1 A BHT és a TBHQ bomlása melegítés hatására	26
4.5.2 A BHT és TBHQ bomlásának vizsgálata fény hatására	29
4.5.3 A bomlásvizsgálatok eredményeinek összegzése	31
5. Összefoglalás	31
6. Irodalomjegyzék	32

Rezümé

A különböző növényi olajok minőségének megőrzése érdekében napjainkban különböző antioxidánsokat alkalmaznak. Ezen antioxidánsok azonban nagy mennyiségben egészségre ártalmasok lehetnek, így mennyiségi ellenőrzésük szükséges. Erre a célra a vonatkozó magyar és az európai szabvány egy hosszas extrakciós módszert ír elő, ennek egy egyszerűbb eljárással történő kiváltása volt munkám egyik célja. Amennyiben az adott növényi olajat nem tárolják megfelelően, az antioxidánsok még a felhasználás előtt bomolhatnak, viszont ezen bomlástermékek vizsgálatát a szabvány nem írja elő. Fő célom egy olyan analitikai módszer kidolgozása, amely alkalmas az összes jelenleg forgalomban lévő, étolajban használatos antioxidáns, valamint bomlástermékeik egyidejű mennyiségi meghatározására.

Első lépésben megvizsgáltam a jelenleg hatályos szabvány reprodukálhatóságát hatféle antioxidánsra és kétféle bomlástermékre. Az egyik bomlástermék esetében sem a reprodukálhatóság, sem a visszanyerés nem volt megfelelő, viszont a többi komponens esetében elfogadhatók az eredmények. Ezt követően egy QuEChERS SPE módszerre alapozva megkezdtem egy ultrahangos kioldást és centrifugálást magában foglaló módszer kidolgozását, három különböző oldószert is kipróbálva. A módszer reprodukálhatósága minden komponens esetén megfelelő, a visszanyerési értékek viszont bizonyos komponensek esetében nem megfelelőek, így ezeknél egy szorzófaktorot vezettem be a további mérések során.

Tudományos diákköri kutatásaim másik célja az antioxidánsok bomlásának vizsgálata volt különböző körülmények között. Ehhez kétféle antioxidánst hasonlítottam össze, ehhez rendelkezésemre állt ezek egy-egy bomlásterméke is. A bomlást melegítéssel, illetve fényel idéztem elő. Az eredményekből megállapítható, hogy az olajok sütésre való felhasználása esetén nem célszerű a sütést 30–60 percnél tovább végezni, mivel ekkor már az antioxidánsok többsége elbomlik és több bomlástermék keletkezik, amelyek egy határértékhez közeli vagy a feletti koncentrációjú antioxidánst tartalmazó olaj esetében egészségügyi kockázattal járhatnak. Vizsgáltam továbbá az olajban lévő antioxidánsok fényben való bomlását, ebben az esetben is megfigyelhető volt az antioxidánsok koncentrációjának csökkenése. Így a szabványok esetében érdemes lenne ezen bomlástermékeket is vizsgálni, mert egy fénynek kitett olaj esetében az eredetileg bevitt, esetlegesen határértéknél nagyobb koncentrációjú antioxidánsok pár hónap alatt a nem vizsgált bomlástermékek megjelenése révén fognak csak a szabványnak megfelelni.

Rövidítésjegyzék

ACN	acetonitril
AOAC	Association of Official Analytical Collaboration
BHA	butylated hydroxyanisole (2(3)- <i>terc</i> -butil-4-hidroxianizol)
BHT	butylated hydroxytoluene (2,6-di- <i>terc</i> -butil-4-metilfenol)
DTBBQ	2,5-di- <i>tert</i> -butyl-1,4-benzoquinone (2,5-di- <i>terc</i> -butil-1,4-benzokinon)
GC	Gas Chromatography (gázkromatográfia)
GC-MS	Gas Chromatography – Mass Spectrometry (gázkromatográfiával kombinált tömegspektrometria)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia)
LC	Liquid Chromatography (folyadékkromatográfia)
LC-MS	Liquid Chromatography – Mass Spectrometry (folyadékkromatográfiával kombinált tömegspektrometria)
LG	lauril-gallát
n.d.	nem detektálható (kimutatási határ alatti koncentrációjú)
OG	oktil-gallát
PG	propil-gallát
ppm	parts per million, mg/kg egységben
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (analitikai mintaelőkészítési technika)
RSD	Relative Standard Deviation (relatív szórás)
SPE	Solid Phase Extraction (szilárd fázisú extrakció)
TBBQ	2- <i>tert</i> -butyl-1,4-benzoquinone (2- <i>terc</i> -butil-1,4-benzokinon)
TBHQ	2- <i>tert</i> -butyl-hydroquinone (2- <i>terc</i> -butil-hidrokinon)
UV-VIS	Ultraviolet – Visible (ultraibolya – látható)

1. Bevezetés

Az antioxidánsokat napjainkban a teljes élelmiszeriparban alkalmazzák. Használatuk célja hasonló a tartósítószerkéhez, viszont hatásmechanizmusuk nem egyezik meg. Fő feladatuk az adott élelmiszer eltarthatósági idejének növelése azáltal, hogy a terméket hátrányosan érintő oxidációs folyamatokat visszaszorítják. Az európai uniós jogszabály alapján az antioxidánsok „olyan anyagok, amelyek az oxidáció okozta romlás – mint a zsírok avasodása és a színváltozások – megakadályozásával meghosszabbítják az élelmiszerek eltarthatóságát” [1]. Vagyis az uniós rendelet világosan kimondja, hogy egy adott antioxidánsnak két fő feladata van: az avasodás és a színváltozás megakadályozása. Az avasodáshoz feltétlen szükséges a levegő jelenléte, de a folyamatot felgyorsítja a fény és a magasabb hőmérséklet is. Fontos alapelv továbbá, hogy az avasodás és minőségromlás elleni védelem nem egyezhet meg a rossz gyártási körülmények okozta termékhibák elfedésével, ugyanis az már kategorikusan élelmiszerhamisításnak tekinthető. Az antioxidánsok adott termékben mért koncentrációja alapvetően meghatározza egy adott élelmiszer élettartamát, viszont nagyobb mennyiségben ezek az antioxidánsok már ártalmasok lehetnek a szervezetre. Előfordulhat, hogy egy rossz módszerrel gyártott olajban már a gyártás során elkezdenek megindulni oxidációs folyamatok, amit a gyártók megpróbálhatnak elfedni nagyobb mennyiségű antioxidáns hozzáadásával. Az Európai Unió rendeletben szabályozza minden, olajban és zsírban használható antioxidáns koncentrációját, megjelölve azok felhasználási területét, tehát azt, hogy az adott antioxidánst milyen típusú olajokban lehet alkalmazni. Az élelmiszerhamisítások felderítése érdekében fontos tehát az olajok és zsírok antioxidáns tartalmának ellenőrzése. Erre rendelkezésre áll uniós és magyar szabvány is. A szabvány azonban nem veszi figyelembe azt a körülményt, hogyha a gyártás során az adott antioxidáns valamilyen oknál fogva bomlást szenved, például túlzott hő- vagy fényhatás miatt. Ebben az esetben az olajban akár határérték alá is csökkenhet az eredetileg határérték feletti antioxidáns koncentráció, így az élelmiszerhamisításra nem derül fény. Ezen körülmény miatt a munkám során foglalkoztam az antioxidánsok bomlás-termékeinek meghatározásával is.

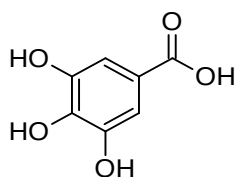
2. Irodalmi összefoglaló

2.1 Az antioxidánsok szerepe az élelmiszeriparban

Növényi olajok esetében az alkalmazott antioxidánsok hosszabb-rövidebb ideig gátolni tudják az olajban lejátszódó oxidatív folyamatokat, továbbá képesek megkötni az oxidációt katalizálni képes fémionokat. Az antioxidánsok bizonyos mennyiség felett károsak lehetnek az emberi szervezetre, így ezek koncentrációját hatóságilag szabályozzák. A következőkben ismertetem az általam vizsgált antioxidánsok tulajdonságait.

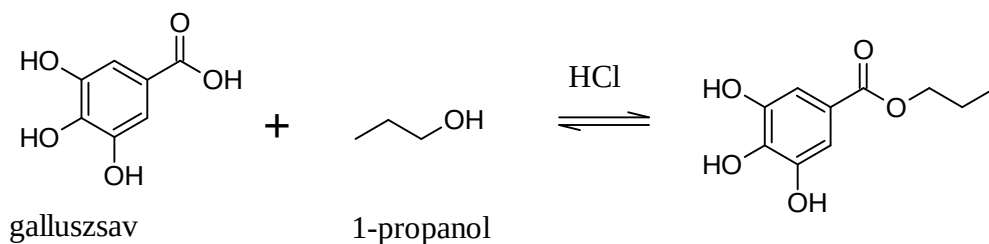
2.1.1 Gallátok (propil-gallát, oktil-gallát, lauril-gallát)

A gallátok a galluszsav (1. ábra) észterei. A galluszsav szerkezetét tekintve egy hidroxikarbonsav, amely a karbonsavakra jellemző karboxilcsoporton kívül három hidroxilcsoportot is tartalmaz. Ezen hidroxilcsoportok aktiváló szubsztituensek lévén a legtöbb reakcióban növelik a molekula reaktivitását. A karboxilcsoportja révén a karbonsavakra jellemzően képezhető a molekulából észter, a hidroxilcsoportokból pedig éter [2].



1. ábra. A galluszsav szerkezeti képlete

A gallátokat előállíthatjuk a galluszsavból észterképződési reakcióval. A 2. ábrán látjuk a propil-gallát lehetséges előállításának egyenletét. Az észterképződés egy kondenzációs reakció, amely során két molekula reagál egymással, melléktermékként pedig kilép egy jellemzően kis molekula, esetünkben víz. A reakciót erős savak katalizálják.

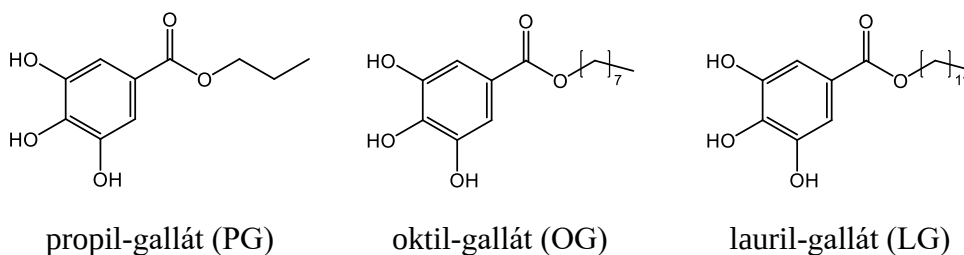


2. ábra. A propil-gallát előállításának egyenlete

A reakció (Fischer-féle direkt észterezés) egy hat elemi lépésből összetevődő többlépéses addíciós–eliminációs reakció, amelynek minden lépése reverzibilis [3].

A galluszsav észterezésének nagy előnye, hogy befolyásolja a molekula oldhatóságát, az észterek jobban oldódnak olajokban és zsírokban, mint a karbonsavak. Ez az oka annak, hogy a galluszsav helyett, – ami szintén rendelkezik antioxidáns tulajdonsággal – olajokban és zsírokban inkább az észtereit alkalmazzák. Ezen észterek a már említett propil-gallát (PG), oktil-gallát (OG) és dodecil-, vagy másnéven lauril-gallát (LG). Ezen gallátok egymástól kizárólag az észtercsoportban lévő szénlánc hosszában különböznek.

A 3. ábra mutatja a gallátok különböző jellemzőit. Az élelmiszeriparban használatos háromféle gallát tulajdonságaikban szinte megegyeznek. Oldhatóságuk szinte azonos: vízben nem, a legáltalánosabban alkalmazott szerves oldószerekben jól oldódnak. [4].



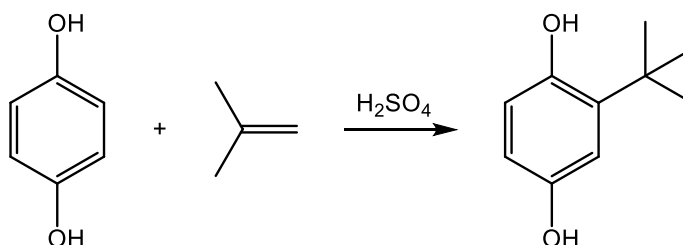
3. ábra. Az élelmiszeriparban használatos gallátok szerkezeti képletei.

A gallátokat főként az élelmiszer- és a kozmetikai iparban alkalmazzák elsősorban antioxidáns tulajdonságuk miatt. Legelterjedtebb a propil-gallát. A gallátok képesek érzékenységet okozni az emberi szervezetben, a legnagyobb mértékben a lauril-gallát.

Habár a gallátallergia ritka, az elmúlt 3 évtizedben a kimutatott allergiás esetek száma növekedett. Emiatt alkalmazásukat a 70-es évek óta elkezdték csökkenteni. Amerikában betiltották az alkalmazásukat, az Európai Unió területén határértéket meg nem haladó koncentrációban alkalmazhatóak. Az uniós szabályozás előírja a különböző élelmiszeradalékok címkén való feltüntetését. A bizonyítottan gallát intoleranciával rendelkezőknek célszerű mindenféle gallát tartalmú élelmiszer kerülése [5][6].

2.1.2 Di-*terc*-butil-hidroxi-toluol (BHT)

A BHT-t többek között az élelmiszeriparban, gyógyszeriparban, vegyiparban és gumiiparban alkalmazzák antioxidánsként. *p*-Krezol és izobutilén reakciójával állítják elő kénsav katalizátor segítségével, a reakcióegyenlet a 4. ábrán látható [7].

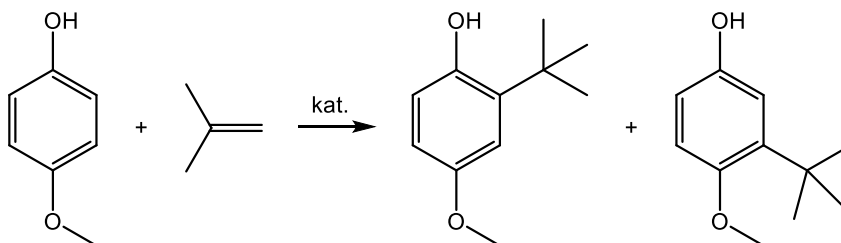


4. ábra. A BHT előállítási egyenlete

A BHT esetében állatkísérleteket végeztek az antioxidáns toxicitásának vizsgálata érdekében. A BHT nagy dózisban véralvadási zavarokat okozott, valamint a tüdőre is káros hatásai voltak. Hosszú távú kísérletekben a BHT májdaganatot idézett elő. Nagyobb mennyiségben a BHT karcinogén hatású, azonban megállapítható, hogy az élelmiszerekben és kozmetikumokban alkalmazott mennyiségben a BHT emberi szervezetre ártalmatlan, az előírt határértékeket ebben az esetben is fontos betartani [8].

2.1.3 Butil-hidroxi-anizol (BHA)

A BHA-t különböző élelmiszerekben alkalmazzák, mint antioxidáns. Főként olajokban és zsírokban használják, gyökmegkötő képessége miatt. Az 5. ábrán látható a BHA előállításának reakcióegyenlete. A reakció során a BHT előállításával analóg módon a fenolkomponenst (ebben az esetben a 4-metoxifenolt) izobutilénnel reagáltatják katalizátor jelenlétében. A reakció kétféle szerkezeti izomert ad eredményül [7].

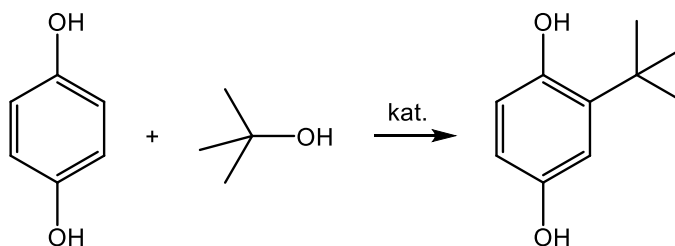


5. ábra. A BHA előállításának egyenlete

Toxicitását tekintve is végeztek állatkísérleteket hasonlóképpen, mint a BHT esetében. Ahhoz hasonlóan nagyobb dózisban a BHA is képes véralvadási problémákat okozni. Hosszabb távú adagolásakor állatoknál a BHA előgyomor daganatot idézett elő. Nagyobb dózisokban a BHA karcinogén hatású lehet, ezért kerülni kell a határértéket meghaladó fogyasztását, határérték alatti mennyiségben viszont az emberi szervezetre ártalmatlan [8].

2.1.4 *Terc*-butil-hidrokinon (TBHQ)

A TBHQ egy gyakran használt, nagyon hatékony antioxidánsként számon tartott vegyület. A többi antioxidánshoz hasonlóan élelmiszerekben, kozmetikumokban és gyógyszeripari termékekben alkalmazzák. Egyik nagy előnye, hogy BHT-val és BHA-val együtt is alkalmazható, viszont ebben az esetben ügyelni kell a megfelelő határértékek betartására, amelyek rendkívül fontosak az antioxidánsok biztonságos alkalmazását illetően. További előnye a TBHQ alkalmazásának, hogy vas jelenlétében sem okozza az anyag elszíneződését [9].



6. ábra. A TBHQ előállításának egyenlete

A 6. ábrán látható a TBHQ előállításának reakcióegyenlete. A TBHQ-t hidrokinon és *terc*-butanol reakciójával állítják elő savkatalizátor jelenlétében [10].

A TBHQ nagyobb dózisú, hosszú távú expozíciója egészségügyi szempontból veszélyt jelent és számos mellékhatással jár az emberi szervezetre nézve. Hatásait tekintve lehet citotoxikus, genotoxikus, karcinogén és mutagén. Azonban elérhetők olyan beszámolók, amelyek a TBHQ terápiás felhasználásáról szólnak, így ebben az esetben némi ellentmondásba ütközhetünk. Az azonban vitathatatlan, hogy a TBHQ határértéket meg nem haladó mennyiségben az emberi szervezetre ártalmatlan [10].

2.2 Antioxidánsok olajból való mennyiségi meghatározása

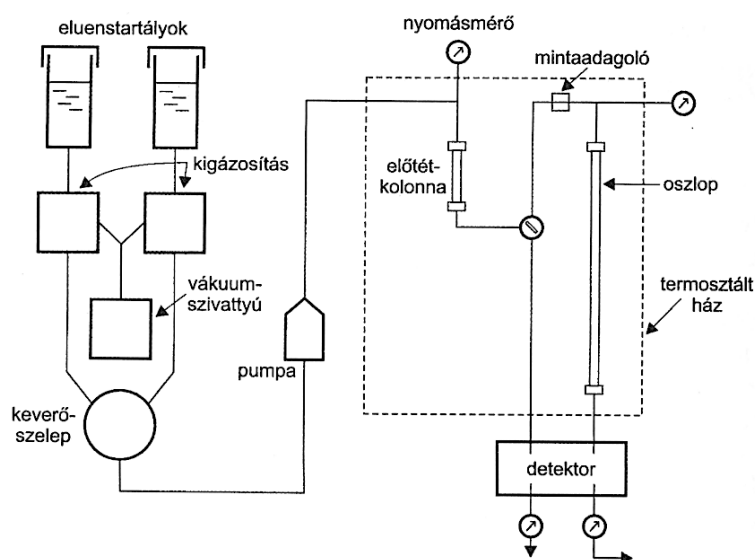
Az antioxidánsok olajból való kinyerésének egyik fő problémája, hogy a mintaelőkészítés során alkalmazható oldószerek száma korlátozott, mivel mindenképp olyan oldószert kell választani, amely az olajjal nem elegyedik, viszont az olajból képes átoldani a meghatározandó komponenseket. Több antioxidáns egyidejű meghatározására a különböző kromatográfiás módszerek alkalmazhatóak. A gázkromatográfiás módszerek korlátja, hogy a hatféle antioxidáns közül – származékképzés nélkül – csupán négy vizsgálható. Ezek a BHT, PG, BHA és a TBHQ. A többi antioxidáns molekulatömege és/vagy hőstabilitása miatt nem vizsgálható gázkromatográfián. A másik lehetőség a mennyiségi meghatározásra a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC).

A Vidékfejlesztési Minisztérium Élelmiszer-feldolgozási Főosztálya által 2012-ben kibocsátott rendelet avasodásgátlók meghatározására az MSZ 14474-7:1986 szabványt írja elő. A szabvány mintaelőkészítésként egy három lépéses extrakciót ír elő. Első lépésben a vizsgálandó olaj egy részét hexánnal mérőlombikban adott térfogatra oldja. Homogenizálást követően az oldat meghatározott térfogatát rázótolcsérben hexánnal telített acetonitrillel extrahálja háromszor. Az így kapott egyesített extraktumokat választótölcsérben elválasztja az átjutott olajcseppektől, majd rotációs vákuumbepárlóval bepárolja kb. 3 ml térfogatra. Ezt követően a maradékot kvantitatívan átviszi egy 10 ml-es mérőlombikba, és acetonitril-izopropanol 1:1 térfogatarányú elegyével jelre tölti. Az így kapott oldatból végzi el az antioxidánsok mennyiségi meghatározását folyadékkromatográf segítségével. Eluensként hangyasavas vizet és acetonitrilt alkalmaz, a detektor diódasoros [11][12].

2.3 Nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC)

Folyadékkromatográfia esetében a állófázison áramló mozgófázis (eluens) folyadék, általában minimum kétféle folyadék elegye. A legtöbbször alkalmazott fordított (apoláros) állófázisok esetében ez acetonitril vagy metanol, valamint víz elegye. A folyadékkromatográfiában – szemben a gázkromatográfiával – a mozgófázis összetétele is változtatható a mérés során. Az elválasztás hatékonysága az állófázis típusán kívül így az eluens összetételével is befolyásolható. A 7. ábrán látható a HPLC készülék elvi felépítése. Az eluenstartályokból a folyadékok egy kigázosító egységbe jutnak, mivel a készülék üzemszerű működését, valamint az elválasztás és a detektálás hatékonyságát nagy mértékben csökkenti a gázbuborékok bejutása. A mozgófázist alkotó folyadékok összekeverése történhet a pumpa

előtt vagy után. A pumpa után opcionálisan egy előtét kolonnába jut az oldószer, amely az esetleges szennyeződésekét távolítja el a folyadékból. Az előtét kolonna alkalmazásával növelhetjük az oszlop élettartamát, ezért alkalmazása ajánlott. Ezután található az injektor, itt történik a minta bevitele a folyadékaramba. Az oszlopon megtörténik a komponensek szétválasztása. A komponensek egymástól különböző fizikai és fizikai-kémiai tulajdonságaik miatt válnak szét, mivel ezen tulajdonságok befolyásolják az állófázishoz való megkötődésük módját és mértékét. Az oszlopról végül a detektorba jutnak a komponensek, ahol a koncentrációjukkal arányos jelet szolgáltatnak. A leggyakrabban alkalmazott kromatográfias detektorok a különböző típusú tömegspektrométerek, a diódasoros detektor, a törésmutató detektor és a fényszórási detektor.

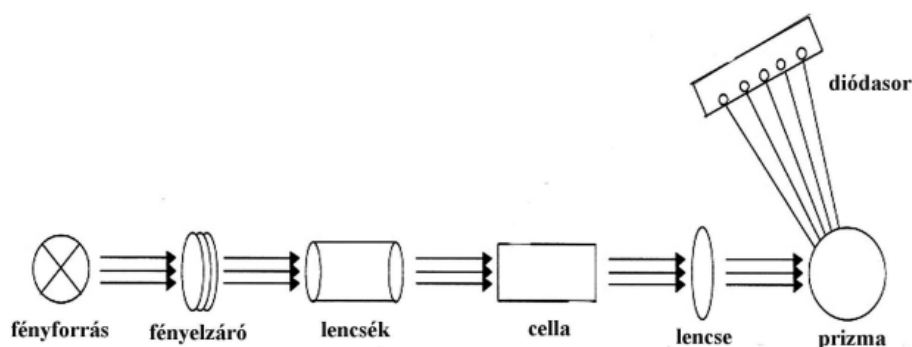


7. ábra. Nagy hatékonyságú folyadékkromatográf (HPLC) elvi felépítése [13]

A mérés végén kapott kromatogramot ki kell értékelni. Mennyiségi elemzéskor a minta mérését megelőzően elvégzünk egy minimum három pontos kalibrációt, amelyet nagy tisztaságú standardokból készített különböző koncentrációjú oldatokkal hajtunk végre. A kalibrációs függvényt a csúcs alatti területnek az adott mérendő komponens koncentrációjától való függése adja. A modern HPLC készülékek képesek önmaguk is tárolni a kalibrációs adatokat és az adott kalibrációs függvényt alkalmazva a program képes automatikusan kiszámítani az adott komponens mintában lévő koncentrációját. A kromatogramon tehát mennyiségi információt a csúcs alatti területből (ritkán a csúcs magasságából), minőségi információt a csúcsok számából és azok retenciós idejéből nyerhetünk ki. A mérések során az adott kromatogramon található csúcsok száma minden esetben megadja a mintában minimálisan jelen lévő, az adott detektorral detektálható komponensek számát.

Folyadékkromatográfiával főként a gázkromatográfiával nem vizsgálható, közepes molekulatömegű vegyületeket vizsgáljuk, amelyek nem hőstabilak [13][14].

Az egyik legáltalánosabban alkalmazott folyadékkromatográfiás detektor az ultraibolya-látható (UV-VIS) detektor. Ezzel azok a molekulák határozhatók meg, amelyek kromofor csoportot tartalmaznak. Napjainkban már szinte kizárólag diódasoros UV-VIS detektorokat alkalmaznak, amelyek egyidejűleg képesek az egész UV és látható tartományban mérni. A 8. ábrán látható a diódasoros detektor elvi felépítése. Sugárforrásként leggyakrabban deutérium lámpát alkalmaznak. Ezen detektornak nagy előnye, hogy képes egy időben az adott beállítási paraméterek mellett idő, intenzitás és hullámhossz adatokat gyűjteni. A teljes fehér fény áthalad a mintán, majd ezt követően megtörténik a fény komponenseire való bontása, amit egy fotodiódákból álló sorra vetítenek [14].

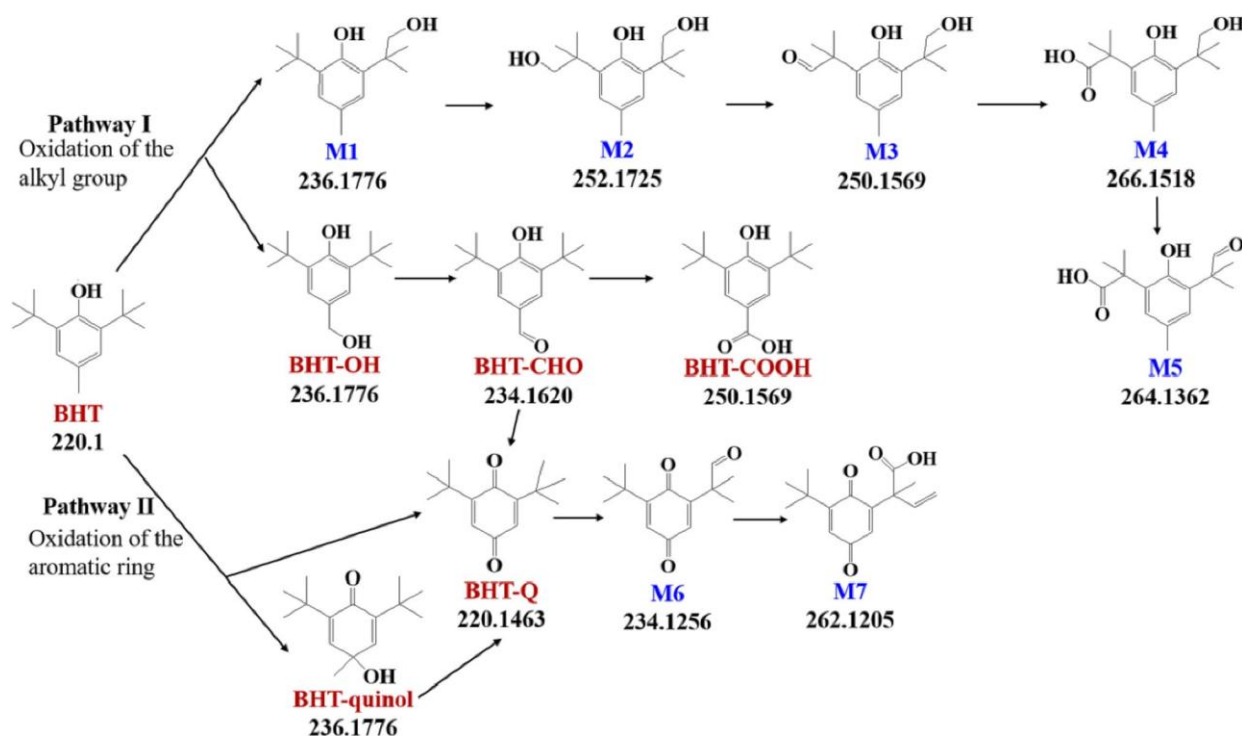


8. ábra. A diódasoros detektor felépítése [14]

2.4 Az antioxidánsok bomlástermékeinek hatásai a szervezetre

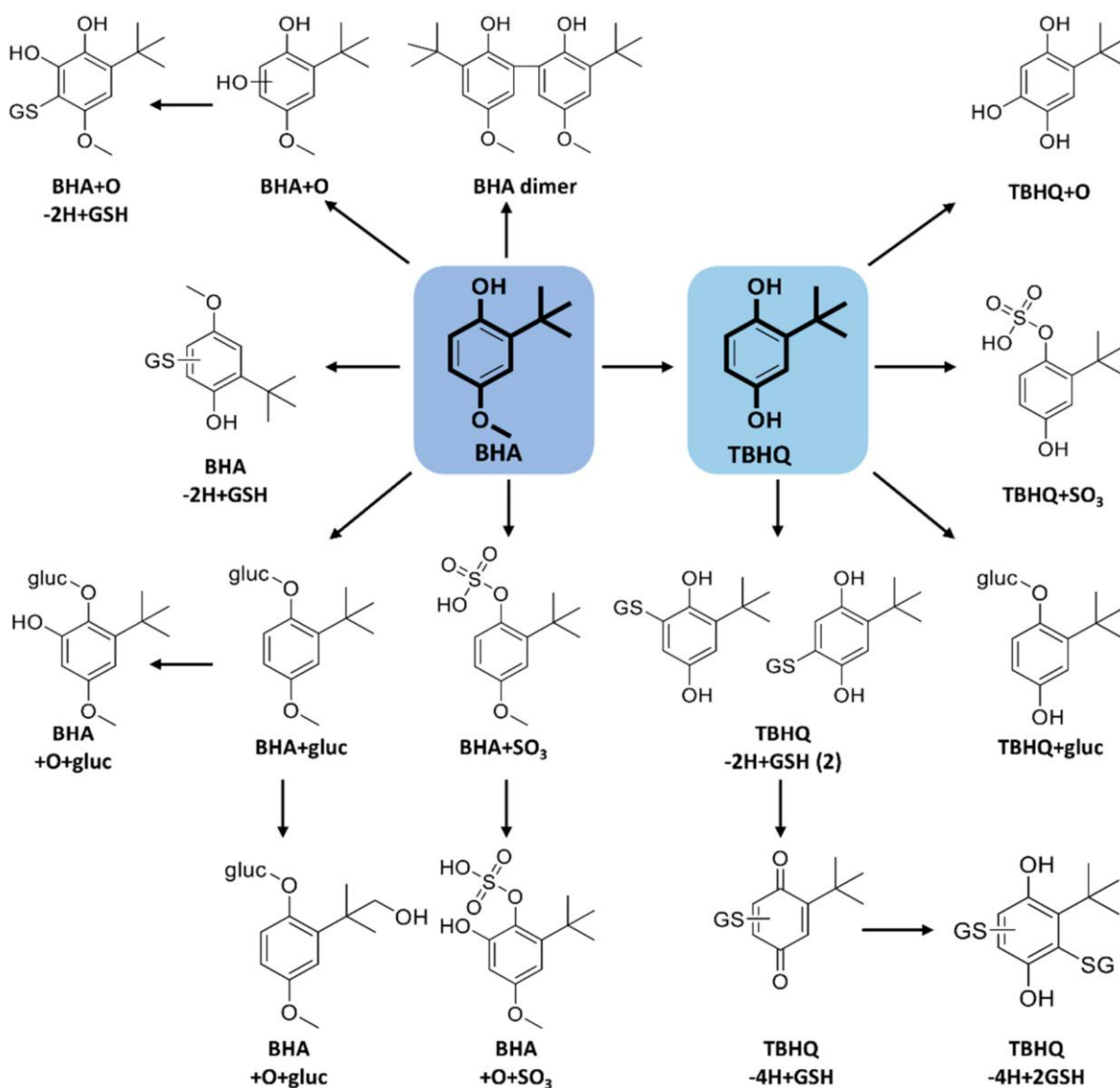
A két leggyakrabban alkalmazott antioxidáns a BHT és a TBHQ. Ebben a részben ezek bomlását, valamint a bomlástermékek élő szervezetre gyakorolt hatását szeretném röviden ismertetni.

A BHT esetében nőstény egereken vizsgálták az antioxidáns lebomlását a szervezetben. A 9. ábra összefoglalja azokat a vegyületeket, amelyek a BHT bomlásakor keletkezhetnek. A BHT alapvetően kétféle módon képes bomlást szenvedni: az alkil csoportjain és az aromás gyűrűjén keresztül. A fő metabolitok (a 9. ábrán pirossal jelölve) képesek felhalmozódni az anyagcserét végző szervekben, mint például a májban és vesében. A különböző bomlástermékek toxicitása meghaladja a BHT toxicitását [15].



9. ábra. A BHT lebomlásának lehetséges módjai [15]
(A számok a molekulatömegeket jelzik.)

A TBHQ bomlását vizsgálva fontos megemlíteni azt, hogy maga a TBHQ is lehet bomlástermék. Ugyanis a BHA demetiliződésével TBHQ képződhet. A 10. ábra összefoglalja azokat a lehetséges bomlástermékeket, amelyek a két antioxidánsból képződhetnek. A bomlástermékeket alapvetően LC-MS technikát alkalmazva határozták meg. A kimutatott vegyületek között számos oxidációs metabolit, glutation-adduktum (GSH-adduktum), glükuronid és szulfátkonjugátum található. A vizsgálatokat emberi és patkánymáj mikroszómákkal végezték, így a vizsgálatok emberi szervezetre nézve is helytállóak. Ezek a bomlástermékek nagyobb mennyiségben veszélyt jelentenek az emberi szervezetre, ezért is fontos, hogy az adott antioxidánsokat valóban csak határértéket meg nem haladó koncentrációban alkalmazzuk [16].



10. ábra. A BHA és a TBHQ bomlása során keletkező termékek [16]
(gluc=glükuronid, GSH=glutation)

Azt is érdemes azonban figyelembe venni, hogy ezen bomlástermékek az emberi szervezetből kiürülve a környezetbe jutnak, a környezetre gyakorolt hatásukat viszont eddig még nem vizsgálták. A későbbiekben ez is egy fontos kutatási téma lehetne.

3. Kísérleti rész

3.1 Extrakciós módszer

Az olajokból történő extrakciós mintaelőkészítéshez az MSZ 14474-7:1986 szabványt vettem alapul. Ez alapján analitikai pontossággal kb. 20 g olajmintát mértem be, amelyet hexánban oldottam, majd szintén hexánnal mérőlombikban 100 cm³-re egészítettem ki. Ebből az oldatból kivettem 25,00 cm³-t, amelyet 3 × 50 cm³, hexánnal telített acetonitrillel extraháltam. Kiprobáltam a módszert 3 × 25 cm³ extrahálószerrel is, viszont ebben az esetben a visszanyerés nem volt kielégítő. Ezt követően az extraktumot 3-4 cm³-re pároltam be rotációs vákuumbepárló készülékkel 40 °C-on, majd acetonitril (ACN) : izopropanol (IPA) 1:1 térfogatarányú elegyével egy 10 cm³-es mérőlombikba vittem át a bepárolt mintát, jelre töltöttem, majd HPLC-vel vizsgáltam. A módszer legnagyobb hátránya, hogy rendkívül időigényes a mintaelőkészítés folyamata, valamint nagy az oldószerigénye: egy minta előkészítéséhez 150 cm³ oldószerre van szükség.

3.2 Centrifugás módszer

Az MSZ 14474-7:1986 szabvány átdolgozása céljából új módszer kidolgozását kezdtem el. Az új módszerben szerettem volna egyszerűsíteni a nagy oldószerigényű extrakciós részlépést. További cél volt az előkészítési folyamat felgyorsítása. A módszer kidolgozásához egy QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) elnevezésű technikát [17] vettem alapul, amely 2008 óta a növényi alapú élelmiszerekből történő növényvédőszer maradványok meghatározásához az Európai Szabványügyi Bizottság is elfogadott [18].

50 ml-es centrifugacsövekbe analitikai pontossággal bemértem egyenként 2 g olajat, majd mindegyikhez adtam 10,00 ml oldószert. Kiprobáltam az acetonitrilt, a metanolt és a dimetilformamidot. Ezt követően a csöveket 1 percen át kézzel alaposan ráztam, majd 5 percre ultrahangos fürdőbe helyeztem. Ezután kiegyensúlyoztam azokat analitikai mérlegen, a pluszban hozzáadott oldószert automata pipettával adagoltam, így a végtérfogat is pontosan ismert volt. Ezután 5 percig 3000 fordulat/perc fordulatszámra centrifugáltam az elegyeket. A metanol és acetonitril esetében az oldószeres fázis felül helyezkedett el, ebből injektáltam közvetlenül a HPLC-be. Dimetilformamid esetében az olajos fázis volt a felső, ezért beiktattam egy 1,5 órás kifagyasztást, amely során a felső olajos fázis még jobban elkülönült az alsótól, és így könnyebb volt kinyerni azt a HPLC-s méréshez. A kifagyasztásnak további előnye, hogy

csökkenti az olaj oldhatóságát az oldószerben, így kíméli a fordított fázisú, C18-as kromatográfiás oszloptöltetet. Amennyiben sokszor, rutinszerűen végzünk ilyen vizsgálatot, célszerű tehát a többi oldószer esetében is végrehajtani az olaj kifagyasztását.

3.3 Folyadékkromatográfiás mérés

A folyadékkromatográfiás méréseket minden esetben a Kémiai Intézetben található Shimadzu márkájú nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiás készülékkel végeztem, amely a *11. ábrán* látható.

A készülék adatai:

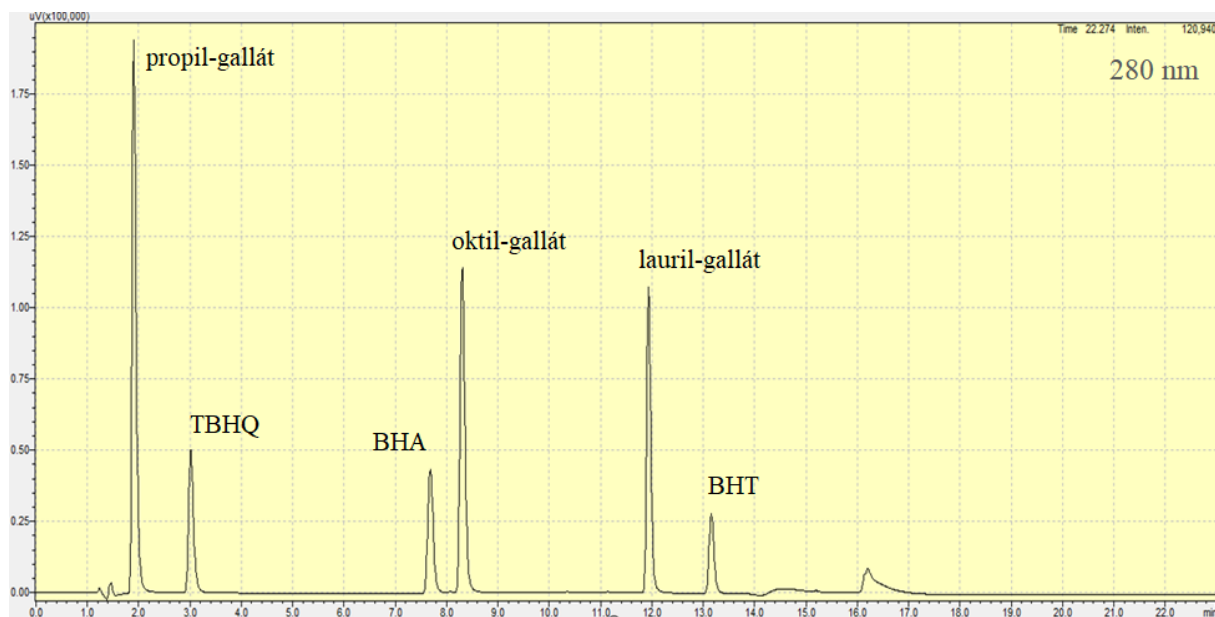
- Shimadzu LC-20AD pumpák
- Shimadzu SIL-20AC injektor
- Shimadzu DGU-20A3R kigázosító egység
- Shimadzu CTO-20A kolonnatér
- Shimadzu SPD-M20A diódasoros detektor
- Kolonna: Avantor ACE UltraCore SuperC18 (2.5 μ m, 150 x 3.0 mm)
- Előtét kolonna: Avantor ACE 5 SuperC18 (5 μ m, 10 x 3.0 mm)

- Mérési paraméterek:
 - Injektálási térfogat: 1 μ l
 - Eluens: acetonitril (ACN) / víz, gradiens program:
0 perc: 45%, 0–3 perc: 45%, 3–11,5 perc: 85%, 11,5–15 perc: 100%, 15,01–23 perc: 45% ACN
 - Áramlási sebesség: 0,5 ml/perc
 - Kolonnatér hőmérséklete: 40 °C



11. ábra. A mérésekhez használt HPLC készülék

A 12. ábrán látható egy 6 féle antioxidánst, egyenként 200 ppm koncentrációban tartalmazó metanolos oldat HPLC kromatogramja. A komponensek növekvő retenciós idők sorrendjében a következők: PG, TBHQ, BHA, OG, LG és BHT. A 23 perces futási idő 20 percre is csökkenthető; a 23 perc abban az esetben szükséges, ha tokoferol típusú antioxidánsokat is szeretnénk meghatározni. A módszer kidolgozásának kezdetén még fennállt ez a lehetőség, viszont a továbbiakban nem került rá sor.



12. ábra. Antioxidánsokat tartalmazó kalibrációs oldat HPLC kromatogramja 280 nm-en

3.4 A BHT és a TBHQ bomlásának vizsgálata

A BHT és a TBHQ bomlásának vizsgálata két különböző módon történt. Egyrészt az antioxidánsok termikus bomlását vizsgáltam: ehhez feloldottam a határértékkel közel azonos koncentrációban az adott antioxidánst étolajban. Ezt követően egy gömblombikban 190–200 °C hőmérsékletűre melegítettem az oldatot, amelyből 5, 15, 30, 60, 120 és 180 perc eltelte után mintát vettem. Az antioxidáns mennyiségének fogyását centrifugás módszerrel (3.2 fejezet), DMF oldószert használva vizsgáltam HPLC-vel (3.3 fejezet).

A másik vizsgálat során a természetes fény hatására bekövetkező bomlást követtem. A határérték körüli koncentrációhoz szükséges antioxidáns mennyiséget feloldottam étolajban, majd több hónapig egy átlátszó, színtelen üvegben, egy állandó helyen hagytam a laborban. Ezt követően 1, 2 és 3 hónap után vizsgáltam centrifugás módszerrel (metanolból) az antioxidáns koncentrációjának változását.

4. Eredmények és kiértékelésük

4.1 Extrakciós módszer

4.1.1 Az extrahálószer olajoldó képessége

A HPLC esetében az oszloptöltetnek nem tesz jót, ha túl sok olajat viszünk fel rá, mert a hosszú szénláncú glicerideket a C18 állófázis nagyon erősen képes megkötni. Lemosásuk idő- és oldószerigényes folyamat, és nem biztos, hogy az összes glicerid leszorítható a töltetről. Ez lassan az állófázis elhasználódásához, így nem megfelelő minőségű kromatogramokhoz vezet. Bár az előtét kolonna alkalmazása segíthet ezen a problémán, azonban azt is viszonylag gyakran újra kell cserélni. Ezért meghatároztam három különböző extrahálószer esetében, hogy az olajból történő extrakció során mennyi olajat képesek oldani. Mindegyik extrahálószer azonos térfogatban alkalmaztam, az olajminták is azonos mennyiségűek voltak. Az extraktumokból az oldószert rotációs bepárlón eltávolítva megmértem a maradék, azaz az átoldott olaj tömegét. Az eredményeket az 1. táblázat foglalja össze.

1. táblázat. Az extrakció során átvitt olaj tömege adott oldószer esetében.

Extrahálószer	Átvitt olaj tömege [g]
Acetonitril	0,1192
Hexánnal telített acetonitril	0,0980
Metanol	0,7404

Jól látható, hogy a metanollal visszük át a legtöbb olajat az extrakció során. Ennek az lehet az oka, hogy az olajban nagy szénatomszámú telített karbonsavak glicerinnel alkotott észterei találhatók, amelyek képesek más molekulákkal a hidrogénkötésben akceptorként részt venni. A metanolmolekulák képesek donorént funkcionálni a hidrogénhídban, tehát képesek a gliceridekkel hidrogénkötés kialakítására. Az acetonitril (és a hexán) nem képes donorként viselkedni, így ebben az esetben csak gyenge dipól-dipól kölcsönhatások alakulhatnak ki a gliceridekkel. Az acetonitril előzetesen hexánnal történő telítésének előnye, hogy az extrakció során a telített acetonitril már nem képes több olajos hexánt beoldani, ezzel is csökkentve az átvitt olaj mennyiségét.

4.1.2 Visszanyerés az extrakciós módszer esetében

A visszanyerést a BHT és bomlásterméke, a DTBBQ esetében 100 ppm, a többi komponens esetében 200 ppm névleges koncentrációjú olajos oldatokkal végeztem, külön az antioxidánsokra, illetve külön a bomlástermékekre. Három párhuzamos mérést végeztem, ezek eredményeit hasonlítottam össze. Az MSZ 14474-7:1986 szabvány a párhuzamos mérések között 10 % relatív szórás eltérés enged meg. A visszanyerés a szabvány alapján erre a módszerre 90 és 100 % között van. [12]. Az AOAC, mint analitikával foglalkozó nemzetközi szervezet ajánlása alapján a 100 ppm koncentráció tartományba eső analitok esetében a relatív szórás elvárt értéke max. 5,3 %, az elvárt visszanyerés pedig 90–107 % [19].

A 2. táblázat alapján elmondható, hogy ez a módszer a visszanyerés értékének és szórásának tekintetében egyedül a TBBQ esetében nem megfelelő, erre a komponensre nézve rossz a reprodukálhatósága, azonban a szabvány nem írja elő a bomlástermékek vizsgálatát.

2. táblázat. Az antioxidánsok és bomlástermékeik visszanyerése extrakciós mintaelőkészítési módszer esetében.

Komponens	Bemérési koncentráció [ppm]	Visszakapott koncentráció [ppm]			Átlag [ppm]	Relatív szórás [%]	Visszanyerés [%]
		1.	2.	3.			
BHT	107	102	99	98	100	2,2	93,0
BHA	223	227	226	224	226	0,7	101
PG	209	219	219	215	218	1,1	104
OG	200	205	204	202	204	0,8	102
TBHQ	208	205	207	207	206	0,6	99,0
LG	233	233	232	230	232	0,7	99,6
TBBQ	202	121	136	125	127	6,1	63,0
DTBBQ	129	121	124	121	122	1,4	94,4

4.2 Centrifugás módszer

A 3.2 fejezetben leírt módszerrel elvégzett mérések eredményeit a 3–5. táblázatok foglalják össze. A módszer kidolgozása során három különböző oldószert használtam.

A kromatográfiás mérés alapján kapott koncentrációból az alábbi képlet alapján számoltam ki az olajban lévő antioxidáns koncentrációt:

$$c = \frac{V_e}{m_{\text{olaj}}} \times c_{\text{mért}}, \text{ ahol}$$

c : a komponens koncentrációja a kiindulási olajban [ppm].

V_e : az extrahálószer térfogata [cm^3],

m_{olaj} : a bemért olaj tömege [g],

$c_{\text{mért}}$: a kromatográfiás mérés során kapott koncentráció [$\mu\text{g}/\text{cm}^3$],

A 3. táblázat tartalmazza az acetonitrillel végzett mérések eredményeit. Az adatok alapján elmondható, hogy visszanyerés tekintetében a PG és a TBHQ bizonyult csak megfelelőnek. A többi komponens esetében a visszanyerés értéke kiesik a 90–107 %-os intervallumból, viszont a módszer reprodukálhatósága jó, mivel a relatív szórások értéke legfeljebb 2,0 %.

Nem volt meglepő az a kísérleti eredmény, hogy az acetonitril bizonyult visszanyerés szempontjából a legrosszabb oldószernek. Az eredeti extrakciós módszerben hexánnal telített acetonitrilt kell alkalmazni az antioxidánsok olajból való kinyerésére. Azonban ennél a módszernél három lépéses extrakciót ír elő a szabvány. Továbbá az extrakciót egy hexánban oldott olajból kell végrehajtani, tehát sokkal kisebb a folyadék viszkozitása, mint esetünkben, ahol egyszeri „extrakciót” kell végezni sokkal kevesebb oldószerrel és viszkózusabb komponenssel.

A módszer javítása érdekében az acetonitriltől polárosabb oldószert kerestem, a választás a metanolra esett. A 4. táblázat tartalmazza a metanollal végzett mérések eredményeit. Visszanyerés szempontjából a PG, OG, LG, TBHQ esetében megfelelőek az értékek, a többi komponens esetében viszont nem felelnek meg a már említett elvárt tartománynak.

Mivel a módszer alapvetően jól reprodukálható ($RSD \leq 2,0 \%$) azokra a komponensekre is, amelyek visszanyerése nem éri el a 90 %-ot, ez lehetővé teszi egy korrekciós szorzó faktor (f) beiktatását. Ennek segítségével a komponens korrigált koncentrációja ($C_{korrigált}$) a kapott átlagkoncentrációból ($C_{átlag}$) következő formában adható meg:

$$C_{korrigált} = C_{átlag} \times f$$

A metanol alkalmazásának előnye, hogy a szerves fázis ebben az esetben felül helyezkedik el, tehát sokkal könnyebben el lehet különíteni az olajtól. Továbbá egy 2 órás kifagyasztást beiktatva, gyakorlatilag minimálisra csökkenthető a metanol olajtartalma, ugyanis az olaj kidermedésekor az oldószer gyakorlatilag leönthető az alsó olajos fázisról anélkül, hogy olajcseppeket vinne magával.

A 5. táblázat egy harmadik kipróbált extrahálószerrel, a dimetilformamiddal végzett kísérlet eredményeit tartalmazza. Az adatok alapján elmondható, hogy PG, LG, OG, TBHQ esetében a visszanyerés megfelelő. A reprodukálhatóság az összes komponens esetében jónak mondható, mivel a relatív szórás értéke kisebb, mint 1,6 %. A legjobb visszanyeréseket ezzel az extrahálószerrel sikerült elérnem. A 2 órás kifagyasztást itt is célszerű alkalmazni annak érdekében, hogy a felső olajos fázis a lehető legkisebb mértékben jusson át az extrahálószerbe, annak lepipettázása során. Előnye a dimetilformamidnak, hogy sokkal kisebb mértékben párolog, mint a metanol vagy az acetonitril.

3. táblázat. Visszanyerés és szórás adatok a centrifugás, ultrahangos módszernél, *acetonitril* extrahálószer esetén
(Pirossal a nem megfelelő visszanyerési értékek vannak jelölve.)

Komponens	Eredeti koncentráció [ppm]	Visszanyert koncentráció 1. [ppm]	Visszanyert koncentráció 2. [ppm]	Visszanyert koncentráció 3. [ppm]	Visszanyert koncentráció átlag [ppm]	RSD [%]	Visszanyerés [%]	Korrektációs szorzófaktor
PG	209	208	207	208	207,9	0,3	99,4	1,01
OG	200	171	172	172	171,5	0,4	85,7	1,16
LG	233	150	153	154	152,0	1,5	65,2	1,54
TBHQ	208	197	197	198	197,4	0,3	94,8	1,05
BHA	223	174	176	176	175,2	0,4	75,2	1,33
BHT	107	52	53	53	52,7	1,3	49,3	2,04
TBBQ	202	153	152	151	151,9	0,8	75,1	1,33
DTBBQ	129	71	69	72	70,5	2,0	54,5	1,82

4. táblázat. Visszanyerés és szórás adatok a centrifugás, ultrahangos módszernél, *metanol* extrahálószer esetén
(Pirossal a nem megfelelő visszanyerési értékek vannak jelölve.)

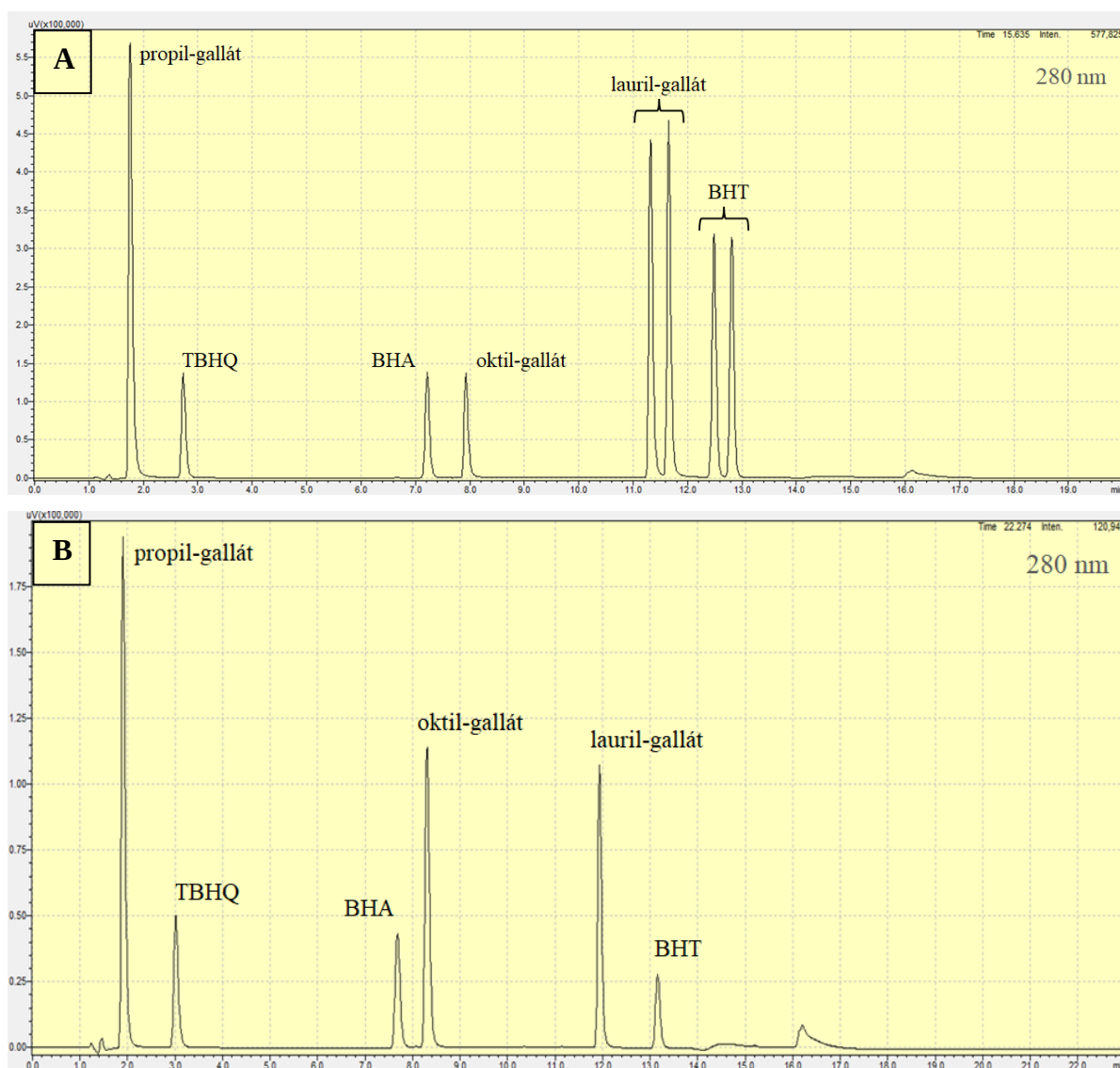
Komponens	Eredeti koncentráció [ppm]	Visszanyert koncentráció 1. [ppm]	Visszanyert koncentráció 2. [ppm]	Visszanyert koncentráció 3. [ppm]	Visszanyert koncentráció átlag [ppm]	RSD [%]	Visszanyerés [%]	Korrekciós szorzófaktor
PG	209	213	215	214	214,0	0,5	102,4	0,98
OG	200	194	198	196	195,8	1,1	97,9	1,02
LG	233	210	215	212	212,2	1,1	91,1	1,10
TBHQ	208	204	209	204	205,5	1,3	98,9	1,01
BHA	223	176	180	178	178,1	1,2	79,9	1,25
BHT	107	52	53	52	52,1	1,2	48,7	2,04
TBBQ	202	125	123	121	123,2	1,6	61,0	1,64
DTBBQ	129	65	64	63	64,3	1,4	49,8	2,00

5. táblázat. Visszanyerés és szórás adatok a centrifugás, ultrahangos módszernél, *dimetilformamid* extrahálószer esetén
(Pirossal a nem megfelelő visszanyerési értékek vannak jelölve.)

Komponens	Eredeti koncentráció [ppm]	Visszanyert koncentráció 1. [ppm]	Visszanyert koncentráció 2. [ppm]	Visszanyert koncentráció 3. [ppm]	Átlag [ppm]	Relatív szórás [%]	Visszanyerés [%]	Korrekciós szorzófaktor
PG	209	208	207	205	206,6	0,9	98,8	1,01
OG	200	195	195	194	194,7	0,5	97,4	1,03
LG	233	217	216	214	215,6	0,8	92,5	1,08
TBHQ	208	201	202	199	200,6	0,7	96,4	1,04
BHA	223	189	190	185	187,7	1,3	84,2	1,19
BHT	107	71	71	69	70,2	1,6	65,6	1,52
TBBQ	202	142	141	142	141,5	0,6	70,0	1,43
DTBBQ	129	81	81	81	81,3	0,1	63,0	1,59

4.3 Az eluens pH értékének befolyása a HPLC mérésre

A vizsgált antioxidánsok mindegyike legalább egy hidroxil csoportot tartalmaz, emiatt a vízzel szemben gyenge savként képes viselkedni. A reakciók egyensúlyra vezetnek, tehát ha az adott rendszerben növeljük az oxóniumionok számát abban, a reakciók az alsó nyíl irányába tolódnak el. Ha az elválasztást vizet tartalmazó eluenssel végezzük, a sav-bázis reakció következtében bizonyos komponensek két csúcsot is adhatnak a kromatogramon, ezenkívül a csúcs alakja is változhat. Ezt mutatja a 13. ábra.



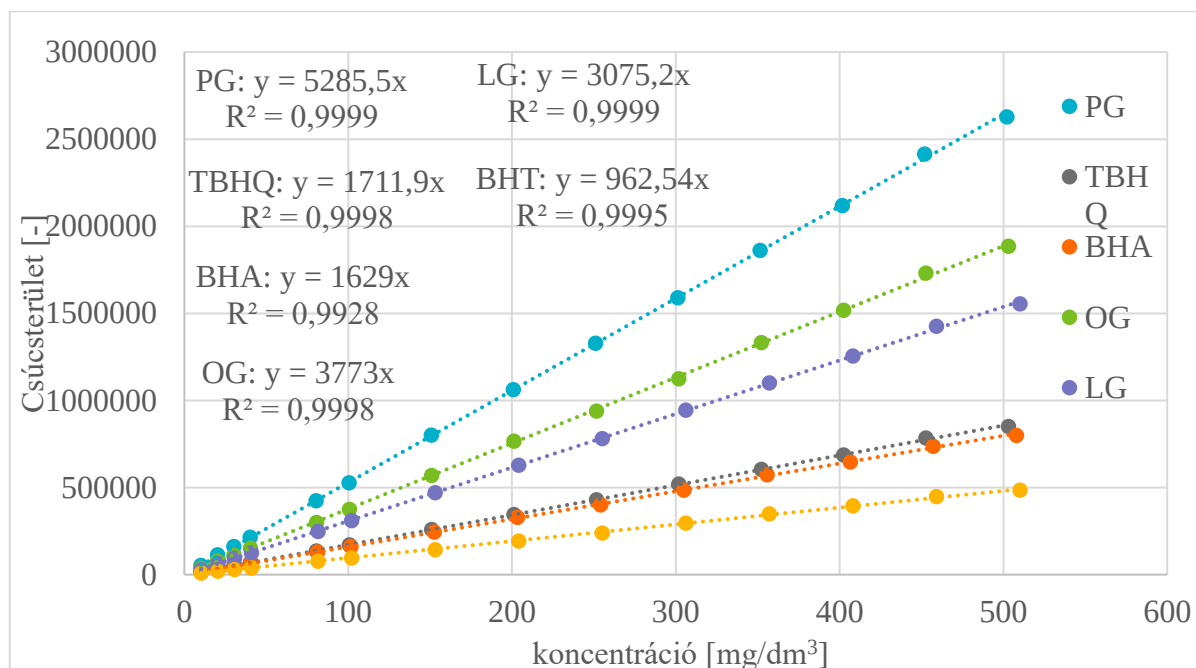
13. ábra. Az eluens pH értékének hatása az antioxidánsok kromatogramjára
„A”: ACN/H₂O eluens; „B”: ACN/H₂O+H₃PO₄ (pH=2,9) eluens

A két csúcsot az adott vegyület protonált és deprotonált formája adja. A sav-bázis egyensúlyt ezért valamelyik irányban vissza kell szorítani. Ezt úgy tudjuk elérni, ha a vizes eluens pH értékét például a savas tartományba visszük. Az MSZ 14474-7:1986-os szabvány

erre a célra 5 tömeg% ecetsavat tartalmazó vizes eluenst javasol. Ennek pH-ja kb. 2,4. A mérések során kipróbáltam ecetsavas, hangyasavas és foszforsavas eluenseket is. A legjobb csúcsalakokat a foszforsav esetében kaptam, ezenkívül a fajlagos UV-elnyelése is ennek a savnak a legkisebb a három közül. A további méréseknél 85 tömeg%-os foszforsavval 2,9-es pH értékre pH-mérővel beállított vizet használtam ($c_{\text{foszforsav}}=1,5 \text{ mmol/dm}^3$), a másik eluens összetevő tiszta acetonitril volt. Az alkalmazott kromatográfiás töltet a dokumentációja alapján 1,5–11 pH-tartományban használható.

4.4 Folyadékkromatográfiás kalibráció

A mennyiségi meghatározáshoz a mérési módszer kalibrációja szükséges, ezt külön végeztem el a bomlástermékekre, illetve az antioxidánsokra. Az adott komponensekre nézve egyenként közel 500 mg/dm^3 -es törzsoldatot készítettem metanollal, majd ebből a törzsoldatból végeztem a többi kalibrációs pont felvételéhez szükséges törzsoldat-hígítást, Hamilton fecskendőket alkalmazva. Az antioxidánsok esetében a 280 nm-en mért csúcsterületet vettem figyelembe, mert ezen vegyületeknek 280 nm-es hullámhossz körül van a fényelnyelési maximuma. A különböző antioxidánsok kalibrációs egyeneseit, valamint az adott függvényekhez tartozó egyenleteket és R^2 értékeket a 14. ábra tartalmazza. A függvényillesztés minden komponens esetében lineáris.

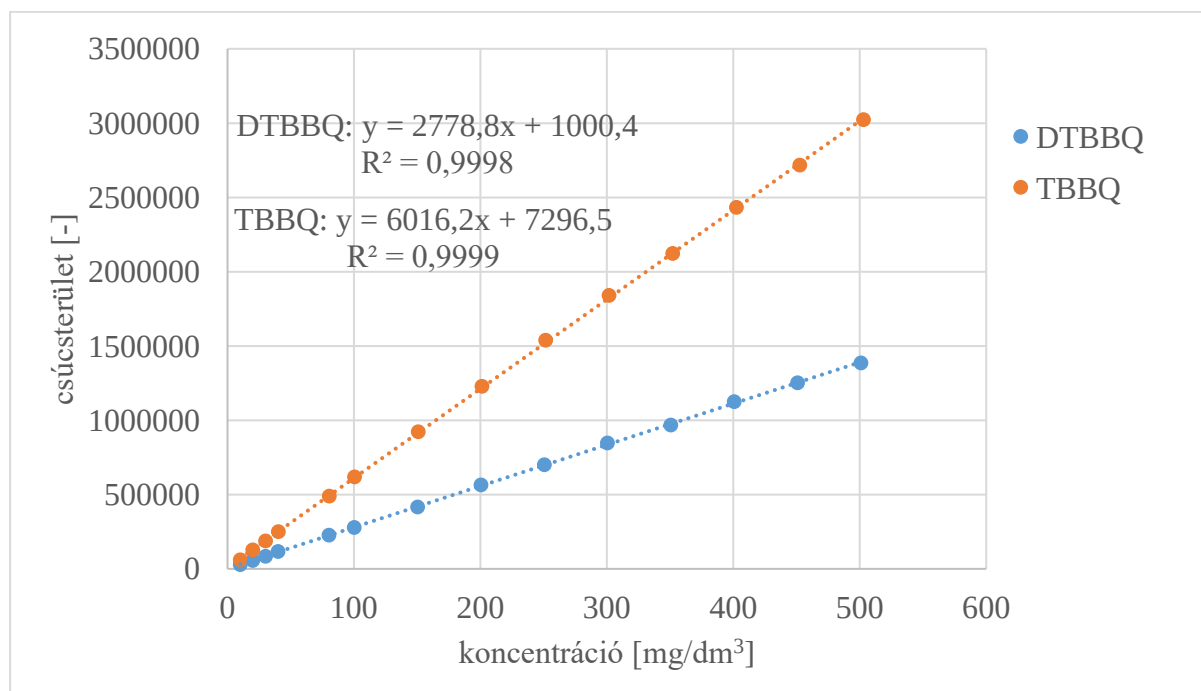


14. ábra. Antioxidánsok HPLC kalibrációs egyenesei (280 nm)

Amint említettem, a bomlástermékek esetén külön kalibrációt végeztem, erre azért volt szükség, mert az összemérések során tapasztalható volt, hogy a bomlástermékek már szilárd állapotban reakcióba lépnek az antioxidánsokkal. Az összemérés után ugyanis piros és fekete gócpontok kezdtek megjelenni a keverékben.

A két komponensből (TBBQ és DTBBQ) mindkettőre egyenként nézve 500 mg/dm³ névleges koncentrációjú törzsoldatot készítettem metanollal, majd ebből a törzsoldatból végeztem a többi kalibrációs pont felvételéhez szükséges oldathígítást Hamilton fecskendővel. A kiértékelés során a 233 nm-hez tartozó csúcsterületeket vettem figyelembe, mert ezeknek a vegyületeknek ezen hullámhossz körül van az elnyelési maximuma. A bomlástermékek kalibrációs egyenesei a 15. ábrán láthatók. Mindkét kalibrációs egyenes esetében lineáris függvényt alkalmaztam.

Összességében minden egyes komponensre nézve az illesztés kiváló ($R^2 > 0,992$).



15. ábra. Bomlástermékek HPLC kalibrációs egyenesei (233 nm)

4.5 A BHT és a TBHQ olajban történő bomlásának vizsgálata

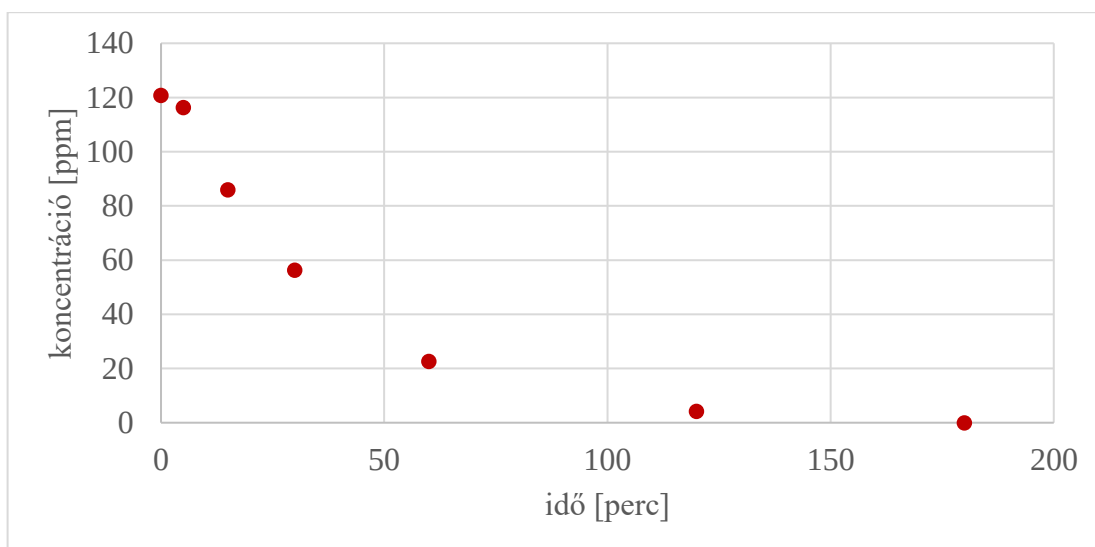
4.5.1 A BHT és a TBHQ bomlása melegítés hatására

A 6. táblázat mutatja a BHT hőbomlása során mért adatokat. A bomlástermékeket tekintve mindkét mérés esetében csak azokat tüntettem fel, amelyekhez rendelkezésre álltak referencia vegyületek és elvégeztem rájuk a kalibrációt. A 16. ábra alapján jól látszik, hogy a

BHT mennyisége exponenciálisan csökken az idő függvényében. A TBBQ bomlástermék 15 perc elteltével jelenik meg, majd ezt követően nem kimutatható, majd 120 percnél jelentkezik ismételten kimutatási határ feletti mennyiségben. Valószínűsíthető, hogy a melegítés során tovább alakult vagy elreagált valamely komponenssel. A BHT mennyisége 180 perc elteltével kimutatási határ alá csökkent. Az olaj 60 perc után megsárgult és avasodásra emlékeztető szaga lett. 180 perc elteltével a kromatogramon 233 nm-en 20 komponens volt látható, tehát ez idő alatt az olajban 20 féle olyan komponens keletkezett, amelyek UV aktívak. Ezen vegyületek meghatározására idő, valamint műszerezettség hiányában nem került sor.

6. táblázat. A BHT és a TBBQ koncentrációjának változása az idő függvényében, melegítés hatására

	BHT	TBBQ
idő [perc]	c [ppm]	c [ppm]
0	121	–
5	116	n.d.
15	85,9	3,1
30	56,3	n.d.
60	22,7	n.d.
120	4,2	1,6
180	n.d.	1,3

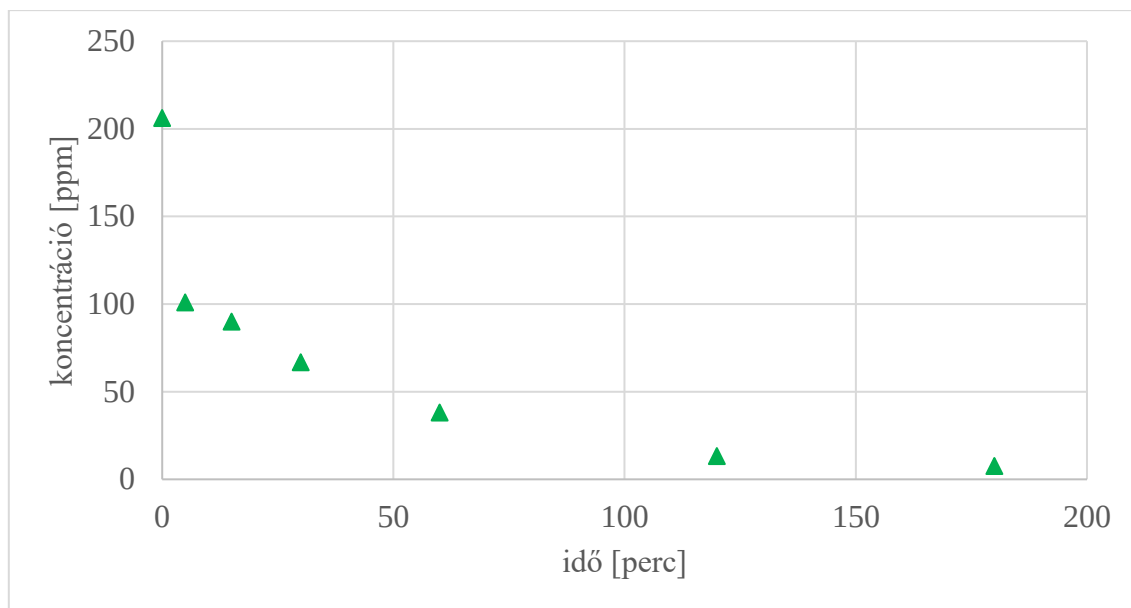


16. ábra. A BHT koncentrációjának változása a hőbomlás során

A 7. táblázat tartalmazza a TBHQ hőbomlása során mért adatokat. Ebben az esetben már mindkét általam meghatározható bomlástermék megjelent a mérés során. A 17. ábra alapján elmondható, hogy a TBHQ koncentrációja nem változott olyan egyszerű lefutás szerint, mint a BHT-nak. Az első 5 percben megfigyelhető egy feleződés, ezt követően viszont a csökkenés sebessége körülbelül a BHT bomlási sebességével azonos mértékű. A TBBQ ebben az esetben már 5 perc után megjelent, majd koncentrációja 120 percig folyamatosan nőtt, 180 percre viszont lecsökkent. Valószínűsíthető, hogy átalakult valamilyen más bomlásterméké. A DTBBQ 15 perc után jelent meg, koncentrációja 30 percnél csökkenést mutatott, viszont ezt követően a bomlástermék koncentrációja a mérés végéig nőtt. A TBHQ mennyisége nem csökkent kimutatási határ alá 180 perc elteltével sem, és az olaj színének és szagának változása is később, valahol 60 és 120 perc között következett be. A 180 perces minta kromatogramján 233 nm-en a TBHQ, TBBQ és DTBBQ-val együtt 17 különböző csúcs volt látható, tehát összesen 14 egyéb UV aktív komponens keletkezett a mérés végén. Az adatok alapján elmondható, hogy magasabb hőmérsékleten a TBHQ valamivel jobb antioxidáns, mint a BHT, mert annak ellenére, hogy 5 perc alatt elreagált az olajban lévő mennyiség fele, viszont ezt követően a csökkenés mértéke valamivel kisebb volt, mint a BHT esetében. Elmondható továbbá, hogy később voltak megfigyelhetők az avasodás jelei a TBHQ-t tartalmazó minta esetében, valamint a mérés végére nem fogyott el az antioxidáns teljes mennyisége sem.

7. táblázat. A TBHQ, TBBQ és DTBBQ koncentrációjának változása az idő függvényében, melegítés hatására

	TBHQ	TBBQ	DTBBQ
idő [perc]	c [ppm]	c [ppm]	c [ppm]
0	206	–	–
5	101	4,7	n.d.
15	90	7,1	15,3
30	66,8	7,1	13,0
60	38,0	9,0	17,5
120	13,2	9,4	20,4
180	7,6	2,7	24,5



17. ábra. A TBHQ koncentrációjának változása a hőbomlás során

4.5.2 A BHT és TBHQ bomlásának vizsgálata fény hatására

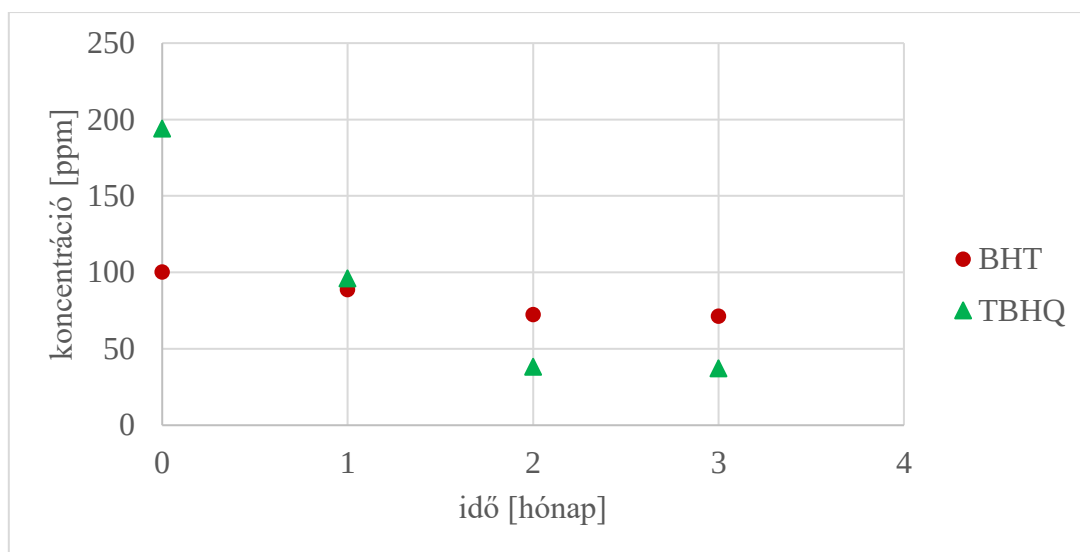
A BHT esetében egy 100 ppm antioxidánst tartalmazó olajmintát készítettem. 1 hónap után az olajminta 88,8 ppm BHT-t tartalmazott, valamint 233 nm-en 9 egyéb más UV aktív komponens volt megfigyelhető a kromatogramon. 2 hónap után az olajminta 72,3 ppm BHT-t, valamint 233 nm-en 5 egyéb más UV aktív komponens tartalmazott. A 3 hónapos minta 71,4 ppm BHT-t tartalmazott, valamint 233 nm-en 14 egyéb UV-aktív komponens volt látható a kromatogramon.

A TBHQ esetében 194 ppm antioxidánst tartalmazó olajmintát készítettem. 1 hónap után az olajminta 96 ppm TBHQ-t tartalmazott, valamint 4,8 ppm TBBQ is megjelent a mintában. Emellett 8 egyéb UV aktív komponens volt látható a kromatogramon. 2 hónapot követően a mintában a TBHQ mennyisége 38,2 ppm volt, a TBBQ mennyisége 6,8 ppm volt. A 3 hónapos minta tartalmazott 37,2 ppm TBHQ-t, 2,4 ppm TBBQ, valamint 16 egyéb UV-aktív komponens. A DTBBQ 3 hónap után nem volt megtalálható a mintában valószínűsíthetően tovább alakult.

Az olajminta színe mindkét esetben változott: a TBHQ-t tartalmazó minta esetében nagyobb mértékben, a BHT-t tartalmazó esetében kevésbé. Mindkét minta esetében változott az olaj szaga. A TBHQ esetében több egyéb UV aktív komponens jelent meg a kromatogramon, míg a BHT esetében valamivel kevesebb. Ez összeegyeztethető azzal a kísérleti adattal, hogy a TBHQ nagyobb mértékű bomláson ment keresztül a mérés során.

8. táblázat. A BHT és a TBHQ koncentrációjának változása az idő függvényében, fény hatására

	BHT	TBHQ
idő [hónap]	c [ppm]	c [ppm]
0	100	194
1	88,8	96,0
2	72,3	38,2
3	71,4	37,2



18. ábra. A BHT és TBHQ koncentrációjának csökkenése fény hatására

A 18. ábra alapján elmondható, hogy a két antioxidáns különbözőképpen viselkedik. A TBHQ esetében megfigyelhető egy hirtelen koncentrációcsökkenés az 1 hónapos mintában: az antioxidáns kezdeti mennyiségének közel fele elbomlott. A hozzávetőleges feleződés fennáll a 2 hónapos minta esetében is. A 3 hónapos minta esetében a koncentráció már alig változott tovább. A BHT esetében jóval kisebb mértékű csökkenések figyelhetők meg, ezenkívül 2 hónap eltelte után már itt sem mérhető számottevő koncentrációcsökkenés. Ezek alapján elmondható, hogy a BHT kevésbé hajlamos bomlásra fény hatására, mint a TBHQ, mivel a BHT esetében az eredeti mennyiség 71 %-a, míg a TBHQ esetében az eredeti mennyiség 19 %-a volt jelen a mintában 3 hónap után.

4.5.3 A bomlásvizsgálatok eredményeinek összegzése

A hő-, valamint a fénystabilitást vizsgáló kísérletek alapján elmondható, hogy a BHT és a TBHQ viselkedésében különbségek és hasonlóságok is mutatkoznak. A BHT-t tartalmazó olajnál mindkét esetben megfigyelhető egy viszonylag egyenletes koncentrációcsökkenés, míg a TBHQ-t tartalmazó mintánál előbb egy gyors csökkenés volt tapasztalható, majd egy, a BHT-hoz hasonló fokozatos fogyás. A hőbomlás esetében 3 óra alatt a BHT koncentrációja kimutatási határ alá csökkent, míg a TBHQ még 3 óra után is kimutatható volt, viszont sokkal jobban fogyott a kísérlet elején, mint a BHT. A fény hatására történő bomláskor a BHT sokkal stabilabbnak bizonyult, mint a TBHQ.

A kísérleti eredmények alapján elmondható, hogy a BHT bomlása más, egyszerűbb kinetikát követ, mint a TBHQ átalakulása: a TBHQ hőbomlása a folyamat elején sokkal gyorsabb, mint a végén. Ez valószínűleg összhangban áll azzal, hogy szabvány szerint a TBHQ-t kétszeres mennyiségben lehet alkalmazni a BHT-hoz képest.

5. Összefoglalás

A munkám során megvizsgáltam a hatályban lévő magyar szabvány reprodukálhatóságát és visszanyerési korlátait, hatféle antioxidánsra és kétféle bomlástermékre. A nyolc komponensből csak egy, a TBBQ bomlástermék esetében nem volt megfelelő az eredmény, viszont a bomlástermékekre a szabvány nem is ír elő elemzést. Ez alapján látszik, hogy ez a módszer valóban alkalmas az antioxidánsok mennyiségi meghatározására, viszont a módszer oldószer- és időigénye miatt megújításra szorul. Ezt követően egy, a peszticidek meghatározására vonatkozó QuEChERS módszerből indultam ki. Így dolgoztam ki egy ultrahangos-centrifugás módszert három különböző oldószerre. Az oldószerbe átjutó olajmennyiség csökkentése érdekében lehetőség van elvégezni egy kifagyasztást is a mintaelőkészítés végén. Maga a módszer reprodukálhatóságát tekintve minden komponensre elfogadható. Visszanyerés szempontjából bizonyos komponensek esetében nem kielégítő, ezért a kiértékeléskor ezekre bevezettem egy szorzófaktorot. Ezt követően összehasonlítottam kétféle antioxidáns (BHT és TBHQ) termikus, valamint fotostabilitását étolajban. A mérések során a mennyiségi meghatározást az általam kifejlesztett centrifugás módszerrel végeztem. A bomlásvizsgálat eredményei azt mutatták, hogy a BHT fényre kisebb mértékben érzékeny, mint a TBHQ, és hő hatására is kevésbé gyorsan kezd bomlani. A bomlásvizsgálat, valamint a bomlástermékek stabilitásának meghatározása és analitikájuk további vizsgálatokat igényelne.

6. Irodalomjegyzék

- [1] Az Európai Parlament és a Tanács 1333/2008/EK rendelete az élelmiszer-adalékanyagokról, I. melléklet. 2008. december 16.
- [2] Furka Á., Szerves kémia. Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest, 2002.
ISBN: 963-19-2784-9
- [3] <https://www.masterorganicchemistry.com/2022/11/16/fischer-esterification/>
(elérés: 2024. szept. 10.)
- [4] Az Európai Bizottság 231/2012/EU rendelete az 1333/2008/EK európai parlamenti és tanácsi rendelet II. és III. mellékletében felsorolt élelmiszer-adalékok specifikációinak meghatározásáról. 2012. március 9.
- [5] Hausen BM, Beyer W. The sensitizing capacity of the antioxidants propyl, octyl, and dodecyl gallate and some related gallic acid esters. *Contact Dermatitis* 1992, 26(4), 253-258. DOI: 10.1111/j.1600-0536.1992.tb00238.x
- [6] Gamboni SE, Palmer AM, Nixon RL. Allergic contact stomatitis to dodecyl gallate? A review of the relevance of positive patch test results to gallates. *Australasian Journal of Dermatology* 2013, 54(3), 213-217. DOI: 10.1111/j.1440-0960.2012.00941.x
- [7] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/31404> (elérés: 2024. szept. 10.)
- [8] Regine K, Hermann K, Toxikologie der synthetischen Antioxidantien BHA und BHT im Vergleich mit dem natürlichen Antioxidans Vitamin E. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung* 1993, 196, 329-338. DOI: 10.1007/bf01197931
- [9] Richard D. O'Brien, Fats and oils: Formulating and Processing for Applications, Third Edition. CRC Press (Taylor & Francis Group), Boca Raton, 2009.
ISBN: 978-1-4200-6166-6
- [10] <https://www.chemicalbook.com/synthesis/tert-butylhydroquinone.htm>
(elérés: 2024. szept. 10.)
- [11] Élelmiszeripari szabványok kivonatos jegyzéke, Vidékfejlesztési Minisztérium Élelmiszer-feldolgozási Főosztály. Összeállította: Zobor Enikő, 2012. szeptember.
- [12] Élelmiszerek adalékanyag-tartalmának vizsgálata. Avasodásgátlók meghatározása nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiával (HPLC). MSZ 14474-7:1986
- [13] Burger K., Az analitikai kémia alapjai. Semmelweis kiadó, Budapest, 2012.
ISBN: 978-963-331-229-2.
- [14] Lakatos J., Bánhidi O., Lengyel A., Lovrity Z., Muránszky G., Analitikai kémia anyamérnököknek. Nemzeti tankönyvkiadó, 2011.

- [15] Zhang R, Li J, Cui X, Tissue distribution, excretion, and metabolism of 2,6-di-*tert*-butyl-hydroxytoluene in mice. *Science of the total environment* 2020, 739, 139862. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.139862
- [16] Ousji O, Sleno L, Identification of In Vitro Metabolites of Synthetic Phenolic Antioxidants BHT, BHA, and TBHQ by LC-HRMS/MS. *International journal of molecular sciences* 2020, 21(24), 9525. DOI: 10.3390/ijms21249525
- [17] Anastassiades M., Lehotay S.J., Stajnbaher D., Schenck F.J.; Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and dispersive solid-phase extraction for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International* 2003, 86(2), 412-431. DOI: 10.1093/jaoac/86.2.412
- [18] EN 15662:2008 európai szabvány: Foods of plant origin – Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE - QuEChERS-method. (Technical Committee, CEN/TC 275.)
- [19] Latimer, GW, Jr. (ed.), Official Methods of Analysis of AOAC International, 22nd Ed. AOAC INTERNATIONAL, Rockville, MD, USA, 2023. DOI: 10.1093/9780197610145.002.001