

ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА: ОПРЕДЕЛЕНИЕ 2,6-ДИ-ТРЕТ-БУТИЛГИДРОКСИБЕНЗОЛА

Е.П. Цацуа¹, А.П. Асташкина², кандидат химических наук,
В.К. Шорманов^{1*}, профессор, доктор фармацевтических наук,
М.В. Рымарова¹, кандидат фармацевтических наук, А.О. Квасова¹

¹Курский государственный медицинский университет;

Российская Федерация, 305041, Курск, ул. К. Маркса, д. 3

²Национальный исследовательский Томский политехнический университет;

Российская Федерация, 634050, Томск, пр. Ленина, д. 30

Введение. 2,6-ди-трет-бутилгидроксибензол (2,6-ДТБГОБ) – вещество, обладающее антиоксидантной и противорадиационной активностью и применяющееся в качестве антиокислителя и полупродукта органических синтезов. Соединение токсично для теплокровных организмов, зафиксированы случаи отравления людей.

Цель работы – изучение особенностей определения 2,6-ДТБГОБ в тканях печени и крови.

Материал и методы. Объект исследования – модельные смеси 2,6-ДТБГОБ с тканью печени. Для идентификации и количественного определения использовали методы ТСХ, УФ- и ИК-спектрофотометрии, реакцию получения аци-нитропроизводного.

Результаты. Показана возможность очистки анализируемого вещества от эндогенных веществ биологических матриц методом адсорбционной хроматографии в колонке силикагеля L 40/100 мкм при элюировании смесью растворителей гексан–диоксан (97,5:2,5). Разработаны методики идентификации и количественного определения 2,6-ДТБГОБ в извлечениях из биологического материала методами ТСХ, ИК- и УФ-спектрофотометрии. Установлены оптимальные параметры нитрования 2,6-ДТБГОБ и последующего перевода в образующегося нитропроизводного в окрашенную аци-нитросоль.

Заключение. Предложена схема исследования тканей органов и крови с целью подтверждения присутствия в них 2,6-ДТБГОБ.

Ключевые слова: 2,6-ди-трет-бутилгидроксибензол, изолирование, хроматографическая очистка, идентификация, определение.

*E-mail: R-WLADIMIR@yandex.ru

ВВЕДЕНИЕ

2,6-Ди-трет-бутилгидроксибензол [синонимы и торговые названия: 2,6-Ди-трет-бутилфенол, 2,6-бис(1,1-диметилэтил)фенол, 2,6-бис(трет-бутил)фенол), AN 701, 2,6-ДТВР, Ethyl 701, Irganox L 140] (в дальнейшем 2,6-ДТБГОБ) – биологически активное вещество, обладающее выраженными свойствами антиоксиданта, при введении теплокровным в определенных дозах обладает радиозащитным действием [1, 2]. Установлена способность 2,6-ДТБГОБ разлагаться под воздействием бактериального штамма *Alcaligenes F-3-4* [3, 4].

Брутто формула 2,6-ДТБГОБ – $C_{14}H_{22}O$, молярная масса – 206,33. По внешнему виду 2,6-ДТБГОБ – белое с желтоватым оттенком кристаллическое вещество, растворимость которого в воде составляет $4,11 \cdot 10^{-3}$ г/л. 2,6-ДТБГОБ растворим во многих гидрофильных (ацетон, этанол, ацетонитрил) и гидрофобных (этилацетат, хлороформ, бензол, гексан) органических растворителях, плавится при температуре

36–37°C (по другим данным – при 39°C), кипит при температуре 253°C [1].

2,6-ДТБГОБ применяется в качестве антиокислителя для технических масел, полимеров, авиационного бензина, а также как полупродукт ряда органических синтезов, в частности фармакологически активных соединений [5–8].

2,6-ДТБГОБ и его производные способны ингибировать другие ферменты [9–10]. Соединение, как и другие гидроксиарены, токсично для теплокровных организмов [11–13]. LD_{50} для крыс при пероральном введении составляет 1320 мг/кг, при внутривенном – 120 мг/кг, для мышей при пероральном введении составляет 3000 мг/кг, при внутривенном – 65 мг/кг [12, 14, 15]. Есть данные об отравлении людей, в том числе с летальным исходом, веществами из группы алкилпроизводных гидроксибензола, к которым относится и 2,6-ДТБГОБ [11, 13, 16]. Эти сведения и обуславливают интерес к 2,6-ДТБГОБ как к потенциальному объекту химико-токсикологического анализа.

Цель исследования – изучение особенностей определения 2,6-ДТБГОБ в тканях органов и крови.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объект исследования – 2,6-ди-*трет*-бутилгидроксibenзол (2,6-ДТБГОБ; CAS N:128-39-2) фирмы «Sigma-Aldrich chemistry» с содержанием основного вещества $\geq 99\%$ (определено методом газожидкостной хроматографии – ГЖХ).

Проводили сравнительный анализ изолирования 2,6-ДТБГОБ из биологического материала в режиме настаивания с водой, водными растворами кислот и щелочной реакции, а также с 13 органическими растворителями различной химической структуры. Для этого готовили модельные смеси анализируемого вещества (размер частиц от 5 до 50 мкм) с мелкоизмельченной (размер частиц 2–5 мм) тканью печени, которые содержали по 25 мг 2,6-ДТБГОБ в 25 г биоматериала. Полученные смеси оставляли на 90 мин при температуре 18–22°C.

2,6-ДТБГОБ двукратно (каждый раз по 45 мин) изолировали тем или иным изолирующим агентом из модельных смесей при соотношении 2:1 между массами изолирующего агента и биологического объекта. Извлечения, полученные из каждой модельной смеси, объединяли, фильтровали через бумажный фильтр, смоченный изолирующим агентом. Часть фильтрата очищали от эндогенных веществ биологической матрицы методом адсорбционной тонкослойной хроматографии – ТСХ на пластинках «Сорбфил» ПТСХ-АФ-А-УФ, используя подвижную фазу гексан–ацетон (9,5:0,5 по объему). Хроматограммы проявляли в УФ-свете (излучение с длиной волны 254 нм). 2,6-ДТБГОБ проявлялся на хроматограммах в виде темного пятна с $R_f = 0,74 \pm 0,03$. Анализируемое соединение элюировали из сорбента 5 мл этилового спирта.

Количественное содержание 2,6-ДТБГОБ в извлечениях определяли методом электронной спектрофотометрии по интенсивности поглощения этанольного элюата в области длинноволнового максимума (280 нм). Расчеты выполняли с помощью уравнения градуировочного графика.

Следуя приведенной выше схеме изолирования, очистки и определения 2,6-ДТБГОБ, исследовали влияние продолжительности контакта изолирующей жидкости с биоматериалом, кратности настаивания, количественного соотношения изолирующего агента и биологического объекта на степень извлечения рассматриваемого соединения из биологического материала оптимальным изолирующим агентом.

На модельных смесях, содержащих 1,25 – 50,00 мг 2,4-ДТБГОБ в 25,00 г ткани печени, в найденных оптимальных условиях изолирования изучалась зависимость степени извлечения 2,6-ДТБГОБ от его содержания в биологической матрице.

Методом адсорбционной колоночной хроматографии изучали особенности очистки 2,6-ДТБГОБ,

выделенного из биоматериала. Условия анализа: колонка 490×11 мм с 10 г сорбента L 40–100 мкм; подвижная фаза – гексан–диоксан (97,5:2,5). Элюат собирали фракциями по 2 мл каждая. Присутствие 2,6-ДТБГОБ во фракциях обнаруживали методом ТСХ на пластинках «Сорбфил» ПТСХ-АФ-А-УФ, подвижная фаза – гексан–ацетон (9,5:0,5), объем фракции, наносимый на пластину, – 5–10 мкл.

Параллельно осуществляли контрольное хроматографирование извлечения из 25 г печени на колонке с вышеуказанными характеристиками. Фракции элюата, в которых теоретически возможно присутствие анализируемого вещества, объединяли, элюент испаряли, остаток растворяли в 25 мл этилового спирта и измеряли оптическую плотность полученного раствора при длине волны 280 нм.

Методом предварительной идентификации 2,6-ДТБГОБ служила нормальнофазовая ТСХ (сорбент – силикагель СТХ-1А на пластинах «Сорбфил» ПТСХ-АФ-А-УФ).

Дополнительная (подтверждающая) идентификация исследуемого вещества осуществлялась методами ИК- и УФ-спектрофотометрии, а также на основе хромогенной реакции получения ацинитропроизводного. Для оценки количественного содержания 2,6-ДТБГОБ в биоматериале использовалась УФ-спектрофотометрия.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При определении 2,6-ДТБГОБ в субстанции методом УФ-спектрофотометрии относительная ошибка среднего результата составила $\leq 0,61\%$ ($n=6$; $p=0,95$). Результаты сравнительного изучения изолирования 2,6-ДТБГОБ из биологического материала 16 изолирующими агентами (рис. 1) показали, что наибольшая степень извлечения анализируемого вещества достигается в результате настаивания модельных смесей с этилацетатом. Достаточно полное извлечение вещества из биоматериала (ткани печени) этилацетатом наблюдалось уже при двукратном настаивании биоматериала с изолирующим агентом, если количество изолирующей жидкости в каждом случае превышало количество биоматериала как минимум в 2 раза по массе (табл. 1). Продолжительность каждого настаивания при этом должна быть не менее 45 мин. При хроматографировании в колонке с сорбентом L 40/100 мкм анализируемое вещество обнаруживалось во фракциях № 3–5 (5–10 мл).

Согласно результатам экспериментов с тканью печени, в которой отсутствовал 2,6-ДТБГОБ, фоновое поглощение раствора $\frac{1}{4}$ сухого остатка фракций, в которых возможно присутствие данного вещества, в этиловом спирте незначительно и не превышает 0,09 при 275 нм.

УФ-спектр 2,6-ДТБГОБ в среде этилового спирта характеризовался наличием 2 выраженных полос поглощения с максимумами в области 223 и 275 нм. Поэтому этиловый спирт был выбран в качестве растворяющей среды для определения рассматриваемого соединения методом УФ-спектрофотометрии. Установлены оптимальные параметры нитрования 2,6-ДТБГОБ и последующего переведения образующегося нитропроизводного в окрашенную аци-нитросоль. Исследуемое вещество обрабатывали 10% раствором ни-

трата калия в концентрированной серной кислоте ($\rho \approx 1,830-1,832 \text{ г/см}^3$) при температуре 18–22°C в течение 5–7 мин. По истечении указанного времени реакцию смесь в 3 раза разбавляли водой и переводили образующийся продукт нитрования в аци-нитросоль, вначале нейтрализуя раствор избытком 10% водного раствора гидроксида натрия, а затем подщелачивая его до рН 10–11.

Для количественного определения 2,6-ДТБГОБ методом УФ-спектрофотометрии строили градуировочный график и рассчитывали его уравнение, которое имело вид: $A=0,007912 \cdot C-0,009748$, где A – оптическая плотность, C – содержание анализируемого вещества в фотометрируемом растворе, мкг/мл. Линейный участок графика соответствовал интервалу концентраций 4,0–100,0 мкг/мл. Коэффициент корреляции – 0,99. Минимальное открываемое количество 2,6-ДТБГОБ составляет $2,4 \cdot 10^{-6} \text{ г}$ в 1 мл фотометрируемого раствора.

Методика определения 2,6-ДТБГОБ в биологическом материале. Изолирование. 25 г биологического объекта, содержащего 2,6-ДТБГОБ, настаивали дважды по 45 мин порциями этилацетата массой 50 г (55,4 мл) каждая при перемешивании. Извлечения объединяли, фильтровали через стеклянный фильтр диаметром 4 см со слоем безводного сульфата натрия толщиной 1,5–2,0 см, слой сульфата натрия промывали 20 мл изолирующего агента. Фильтрат и промывную жидкость объединяли, растворитель из объединенного фильтрата испаряли в токе воздуха при температуре 18–22°C. Остаток растворяли в 2–2,5 мл смеси гексан–диоксан (97,5:2,5) и вводили полученный раствор в хроматографическую колонку размерами 490×10 мм, заполненную 10 г силикагеля типа L 40/100 мкм. Хроматографировали, используя систему гексан–диоксан (97,5:2,5). Элюат собирали фракциями по 2 мл. Фракции с 3 по 5 включительно объединяли, растворитель испаряли в токе воз-



Таблица 1
ЗАВИСИМОСТЬ СТЕПЕНИ ИЗВЛЕЧЕНИЯ 2,6-ДИ-ТРЕТ-БУТИЛГИДРОКСИБЕНЗОЛА ИЗ БИОМАТЕРИАЛА ЭТИЛАЦЕТАТОМ ОТ СООТНОШЕНИЯ БИОМАТЕРИАЛА И ИЗОЛИРУЮЩЕГО АГЕНТА И ОТ КРАТНОСТИ НАСТАИВАНИЯ (n=5; p=0,95)

Взято 2,6-ДТБГОБ, мг	Масса этилацетата, г	Кратность настаивания	Найдено 2,6-ДТБГОБ	
			мг	%
25	25	1	1,86	37,15
		2	1,04	20,82
		1+2	2,90	57,97
		3	0,68	13,60
		1+2+3	3,58	71,57
		4	0,42	8,34
25	50	1+2+3+4	4,00	79,91
		1	2,96	59,23
		2	1,26	25,43
		1+2	4,22	84,66
		3	0,41	8,17
		1+2+3	4,63	92,83
25	62,5	4	0,18	3,62
		1+2+3+4	4,81	96,45
		1	3,07	61,42
		2	1,21	24,21
		1+2	4,28	85,63
		3	0,39	7,98
25	75	1+2+3	4,67	93,61
		4	0,14	2,81
		1+2+3+4	4,81	96,42
		1	3,15	63,08
		2	1,13	22,64
		1+2	4,28	85,72
25	100	3	0,33	6,64
		1+2+3	4,61	92,36
		4	0,11	2,23
		1+2+3+4	4,72	94,59
		1	3,27	65,31
		2	1,08	21,75
25	100	1+2	4,35	87,06
		3	0,29	5,87
		1+2+3	4,64	92,93
		4	0,09	1,85
		1+2+3+4	4,73	94,78

Таблица 2

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ 2,4-ДИ-ТРЕТ-БУТИЛГИДРОКСИБЕНЗОЛА
МЕТОДОМ ИК-СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ**

Виды колебаний	Положения максимумов полос поглощения, см ⁻¹		
	стандартное вещество	вещество, извлеченное из печени	вещество, извлеченное из крови
Валентные ОН	3353	3353	3354
Валентные =С–Н	3082	3081	3082
Асимметричные валентные СН ₃	2970	2970	2970
Симметричные валентные СН ₃	2884	2884	2884
Обертоны и комбинационные тоны	1649	1650	1650
–С=C– связей ароматического ядра	1485 1473	1485 1474	1485 1473
Асимметричные деформационные СН ₃ ?	1431	1431	1431
Симметричные деформационные СН ₃ в третичнобутильной группе	1367	1367	1367
Колебания =С–ОН ?	1335	1334	1335
Плоскостные деформационные –С–Н– связей у 1,2,3-тризамещенных производных бензола	1160	1160	1160
Валентные –С–ОН	1076	1076	1076
Внеплоскостные деформационные =С–Н– связей у 1,2,3-тризамещенных производных бензола	790 711	790 712	790 711

2,5 ацетонового раствора и испаряли растворитель.

Идентификация методом ТСХ. Остаток в чашке №1 растворяли в незначительном объеме ацетона и количественно переносили на линию старта хроматографической пластины «Сорбфил» ПТСХ-АФ-А-УФ. Хроматографировали, используя подвижную фазу гексан–ацетон (9,5:0,5) в присутствии вещества-свидетеля. Хроматограммы проявляли в УФ-свете и идентифицировали исследуемое вещество по величине R_f, совпадающей с R_f вещества-свидетеля (0,74±0,03).

Идентификация методом ИК-спектроскопии. Остаток в чашке № 2 истирали с безводным бромидом калия, смесь запрессовывали в таблетки и исследовали пропускание образца в интервале частот 4000–400 см⁻¹, применяя ИК-спектрометр Agilent Resolutions Pro. Исследуемое вещество идентифицировали на основе

духа при температуре 18–22°С. Остаток растворяли в 10 мл ацетона. В 3 выпарительные чашки (№№ 1, 2, 3) вносили соответственно 0,1–2,5 мл, 4,0 мл и 0,1–

совпадения максимумов характеристических полос в его ИК-спектре с положением соответствующих полос в ИК-спектре стандарта 2,6-ДТБГОБ (табл.2).

Идентификация на основе реакции образования аци-нитропроизводного. Остаток в чашке № 3 обрабатывали 0,5 мл 10% раствора нитрата натрия в концентрированной серной кислоте в течение 5–10 мин при температуре 18–22°С. Затем смесь разбавляли 1 мл воды и прибавляли к полученному раствору 4,5 мл 20% раствора гидроксида натрия. В присутствии 2,6-ДТБГОБ наблюдали появление желтого окрашивания.

Идентификация по особенностям поглощения УФ-излучения. После проведения идентификации методом ТСХ участок пластины с пятном вещества вырезали из хроматограммы, вносили в пробирку, элюировали вещество из сорбента 95% этиловым спиртом в течение 15 мин и исследовали поглощение элюата в области кварцевого ультрафиолета (диапазон 200–360 нм). Анализируемое вещество идентифицировали по форме спектральной кривой и положению максимумов полос поглощения (223±2 и 275±2 нм) (рис 2).

Количественное определение. Количественное содержание исследуемого вещества определяли методом УФ-спектроскопии, исходя из оптической плотности этанольного элюата, измеренной в области 280 нм. При этом использовали уравнение градуировоч-

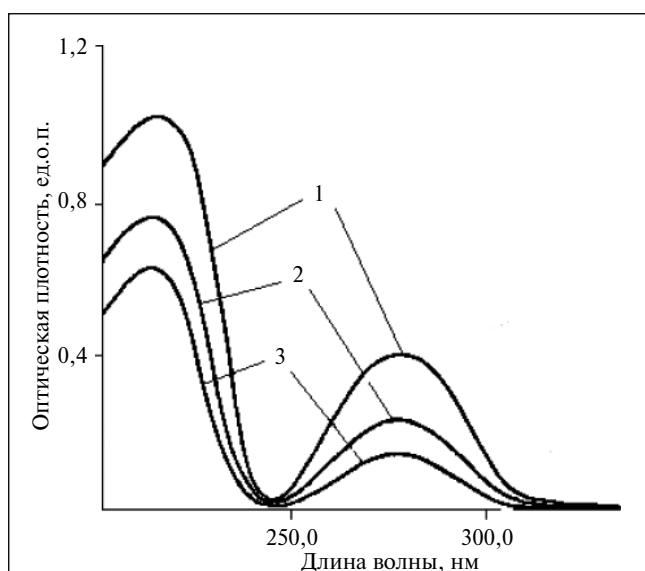


Рис. 2. УФ-спектры этанольных растворов 2,6-ди-трет-бутилгидроксибензола: 1 – извлеченного из крови; 2 – стандартного вещества (0,002% раствор); 3 – извлеченного из ткани печени

Таблица 3

**РЕЗУЛЬТАТЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
2,6-ДИ-ТРЕТ-БУТИЛГИДРОКСИБЕНЗОЛА В МОДЕЛЬНЫХ
СМЕСЯХ С БИОЛОГИЧЕСКИМИ ОБЪЕКТАМИ**

Биологический объект	Внесено 2,6-ДТБГОБ (мг в 25 г биологического объекта)	Найдено 2,6-ДТБГОБ, % (n=5; p=0,95)				
		\bar{x}	S	S_r	S_x	$\Delta\bar{x}$
Ткань печени	1,25	83,06	1,37	0,016	0,61	3,82
	2,5	83,67	1,18	0,014	0,53	3,29
	10,0	84,38	0,98	0,012	0,44	2,75
	25,0	84,81	0,85	0,010	0,38	2,37
	50,0	85,42	0,77	0,009	0,34	2,14
Кровь	1,25	85,27	1,20	0,014	0,54	3,34
	2,5	86,03	1,05	0,012	0,47	2,91
	10,0	86,79	0,87	0,010	0,39	2,42
	25,0	87,12	0,83	0,010	0,37	2,31
	50,0	87,36	0,75	0,009	0,34	2,08

ного графика и проводили пересчет на навеску 2,6-ДТБГОБ, внесенную в биоматериал.

Как следует из полученных данных (табл. 3), предлагаемая методика обеспечивает достаточно высокую степень извлечения 2,6-ДТБГОБ из ткани печени (83,06–85,42%) и крови (85,27–87,36%) при содержании рассматриваемого вещества в биологических матрицах 0,005–0,2%. Открываемый минимум 2,6-ДТБГОБ составляет в ткани печени и крови соответственно 0,42 и 0,32 мг в 100 г биологического объекта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучены особенности определения 2,6-ДТБГОБ в тканях органов и крови. Обоснована целесообразность использования этилацетата для изолирования 2,6-ди-трет-бутилгидроксибензола из биологического материала и определены оптимальные параметры изолирования. Предложена схема исследования тканей органов и крови с целью подтверждения присутствия в них 2,6-ди-трет-бутилгидроксибензола. Показана возможность применения методов ТСХ, ИК- и УФ-спектрофотометрии, а также реакции образования аци-нитропроизводного для идентификации и количественного определения 2,6-ди-трет-бутилгидроксибензола в извлечениях из биологического материала.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. 2,6-di-tert-butylphenol. CAS N: 128-39-2. (Electronic resource). Access mode: <http://www.inchem.org/documents/sids/sids/128392.pdf>.
2. Кудряшов Ю.Б., Беренфельд Б.С. Основы радиационной биофизики. М.: Издательство Московского университета; 1982. (Kudryashov U.B., Berenfeld B.S. Basics of Radiation Biophysics. Moscow: Izdatelstvo Moskovskogo universiteta; 1982 (in Russian)).
3. Fang Z.-W., Xu D.-Q., Zhang Y.-L., Xiao Y.-P., Zhao J.-F. The Degradation Characteristics of Degrading Bacterium of 2,6-Di-Tert-Butylphenol. Huan Jing Ke Xue, 2004; 25 (3): 98–101.
4. Ma H., Li G., Zhang Y., Zhang Z., Fang P. Characteristic and Metabolic pathways of 2,6-Di-tert-butylphenol degradation by Alcaligenes F-3-4. Paper presented at: 2011 Second International Conference on Mechanic Automation and Control Engineering; July 15-17, 2011; Inner Mongolia, China. doi: 10.1109/MACE.2011.5987366. Access mode: <http://ieeexplore.ieee.org/document/5987366>
5. Ogata M., Shin-Ya. K., Urano S., Endo T. Antioxidant Activity of Propofol and Related Monomeric and Dimeric. Compounds Chem. Pharm. Bull., 2005; 53(3): 344–6. doi: org/10.1248/cpb.53.344.
6. Бергельсон М.Б., Татур И.Р., Миннебаева Э.Р., Спиркин В.Г. Исследование физико-химических свойств экстрактов селективной очистки масляных дистиллятов и их смесей с индустриальными маслами. Труды РГУ нефти и газа им. И.М. Губкина, 2014; (4): 88–98. (Bergelson M.B., Tatur I.R., Minnebaeva E.R., Spirkin V.G. Investigation of the physicochemical properties of the extracts of selective purification of oil distillates and their mixtures with industrial oils. Proceedings of the I.M. Gubkin Russian State University of Petroleum and Gas, 2014; (4): 88–98 (in Russian)).

7. Milaeva E.R., Gerasimova O.A., Jingwei Z., Shpakovsky D.B et al. Synthesis and antioxidative activity of metalloporphyrins bearing 2,6-di-tert-butylphenol pendants. Journal of Inorganic Biochemistry, 2008; 102 (5–6): 1348–58.
8. Ziakas G.N., Reka E.A., Gavalas A.M., Eleftheriou P.T., Kourounakis P.N. New analogues of butylated hydroxytoluene as anti-inflammatory and antioxidant agents. Bioorg. Med. Chem., 2006; 14 (16): 5616–24.
9. Sentürk M., Gülçin I., Daştan A., Küfrevioğlu O.I., Supuran C.T. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of human erythrocyte isozymes I and II with a series of antioxidant phenols. Bioorg Med Chem., 2009; 17(8): 3207–11. doi: 10.1016/j.bmc.2009.01.067.
10. Ruiz J., Pérez C., Pouplana R. QSAR study of dual cyclooxygenase and 5-lipoxygenase inhibitors 2,6-di-tert-butylphenol derivatives. Bioorg Med Chem., 2003; 11(19): 4207–16.
11. Шорманов В.К., Цацуа Е.П., Асташкина А.П. Изучение сохранности 2,6-дитретбутилгидроксибензола в биологическом материале. III Международная научно-практическая конференция «Основные проблемы в современной медицине»; Октябрь 11, 2016. Волгоград. (Электронный ресурс). Режим доступа: <http://izron.ru/conference/med/> (Shormanov V.K., Tcatcua E.P., Astashkina A.P. Study of persistence of 2,6 ditretbutilgidroksibenzola in biological material. III mezdunarodnaya nauchno-prakticheskaya konferenciya «Osnovie problemi v sovremennoi medicine»; Октябрь 11, 2016; Volgograd. (Electronic resource). Access mode: <http://izron.ru/conference/med/> (in Russian)).
12. 128-39-2 (2,6-Di-Tert-butylphenol). (Electronic resource). Access mode: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2_6-di-tert-butylphenol.
13. Шорманов В.К., Останин М.А., Асташкина А.П., Гришечко О.И., Цацуа Е.П. Особенности распределения 4-метоксигидроксибензола в организме теплокровных животных (крысы) при летальных отравлениях. Судебно-медицинская экспертиза, 2016; 59 (4): 48–53. doi: 10.17116/sudmed201659448-53. (Shormanov V.K., Ostanin M.A., Astashkina A.P., Grishechko O.I., Tcatcua E.P. Features of distribution of 4-metoksigidroksibenzola in the body of warm-blooded animals (rats) in fatal poisonings. Sudebno-medicinskaya ekspertiza, 2016; 59 (4): 48–53. doi: 10.17116/sudmed201659448-53 (in Russian)).
14. James R., Glen J.B. Synthesis, Biological Evaluation, and Preliminary Structure-Activity Considerations of a Series of Alkylphenols as Intravenous Anesthetic Agents. Journal of Medicinal Chemistry, 1980; 23(12):1350–7.
15. Gandolli C., eds. The dictionary of substances and their effects. Vol. 3. D. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 1999.
16. Шорманов В.К., Цацуа Е.П., Коропова Т.Ф., Асташкина А.П., Янголенко Г.Г. Особенности определения 2-хлор-1,4-дигидроксибензола в биологическом материале. Судебно-медицинская экспертиза, 2016; 59 (5): 44–50. doi: 10.17116/sudmed201659544-50. (Shormanov V.K., Tcatcua E.P., Koropova T.F., Astashkina A.P., Yangolenko G.G. Features of the definition of 2-chloro-1,4-dihydroxybenzene in biological material. Sudebno-medicinskaya ekspertiza , 2016; 59 (5):44–50. doi: 10.17116/sudmed201659544-50 (in Russian)).

Поступила 22 марта 2017 г.

DETERMINATION OF 2,6-DI-*TERT*-BUTYLHYDROXYBENZENE IN A CHEMICAL-TOXICOLOGICAL INVESTIGATION OF BIOLOGICAL MATERIAL

E.P. Tsatsua¹; A.P. Astashkina², PhD; Professor V.K. Shormanov¹, PhD; M.V. Rymarova¹, PhD; A.O. Kvasova¹

¹Kursk State Medical University; 3, K. Marx St., Kursk 305041, Russian Federation

²Tomsk National Research Polytechnic University; 30, Lenin Pr., Tomsk 634050, Russian Federation

SUMMARY

Introduction. 2,6-Di-*tert*-butylhydroxybenzene (2,6-DTBHB) is a substance that has antioxidant and antiradiation activities and is used as an antioxidant and an intermediate for organic syntheses. The compound is toxic to warm-blooded animals; cases of human poisoning have been recorded.

Objective: to investigate the features of determination of 2,6-DTBHB in liver tissues and blood.

Material and methods. The investigation object was model mixtures of 2,6-DTBHB and liver tissue. Thin-layer chromatography (TLC), ultraviolet (UV) and infrared (IR) spectrophotometries, and a reaction to obtain an acy-nitro derivative were used for their identification and quantification.

Results. The investigation showed how the compound in question could be purified from the endogenous substances of biological matrices by adsorption chromatography in a column packed with silica gel L 40/100 μm , eluting with a mixture of hexane:dioxane (97,5:2,5). Procedures were developed to identify and quantify 2,6-DTBHB in the extracts from biological material, by applying TLC, IR and UV spectrophotometry. The optimal parameters of nitration of 2,6-DTBHB and subsequent transfer of the resultant nitro derivative to stained acy-nitro salt were established.

Conclusion. A scheme for examining organ tissues and blood was proposed to confirm that they contain 2,6-DTBHB.

Key words: 2,6-Di-*tert*-butylhydroxybenzene, isolation, chromatographic purification, identification, determination.