

## ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ 2,6-ДИ-ТРЕТ-БУТИЛ-4-МЕТИЛГИДРОКСИБЕНЗОЛА

А. П. Чернова<sup>1</sup>, В. К. Шорманов<sup>2</sup>, О. И. Пугачёва<sup>2</sup>, А. В. Кукурека<sup>2</sup>,  
В. Н. Воропаева<sup>2</sup>, И. А. Сафонова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет»

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России

Поступила в редакцию 10.01.2022 г.

**Аннотация.** 2,6-Ди-трет-бутил-4-метилгидроксибензол (2,6-ДТБ-4-МГОБ) – биологически активное вещество, проявляющее антиоксидантное и цитостатическое действие. 2,6-ДТБ-4-МГОБ активно применяется в медицине и ветеринарии как важный компонент различных препаратов, а также используется в технике и производстве пищевых продуктов. Известно о наличии токсичных свойств у 2,6-ДТБ-4-МГОБ. Описаны острые отравления 2,6-ДТБ-4-МГОБ и близкими химическими структурами людей, для части которых зафиксирован летальный исход.

Цель исследования – изучение особенностей химико-токсикологического определения 2,6-ДТБ-4-МГОБ.

Установлено, что наилучшие условия извлечения 2,6-ДТБ-4-МГОБ из биоматериала обеспечивает двукратная (по полчаса) инфузия со смесью этилацетат-ацетон (7:3) при условии двукратного превосходства на каждой стадии настаивания массы изолирующего агента над массой биоматериала. Показана эффективность очистки 2,6-ДТБ-4-МГОБ от эндогенных компонентов биоматериала в полупрепаративной (190×10 мм) колонке силикагеля L (дисперсность  $4.0 \cdot 10^{-5}$ - $1.0 \cdot 10^{-4}$  м) при вымывании малополярным элюентом гексан-ацетон (9.5:0.5). С целью идентификации и оценки количественного содержания аналита использованы методы тонкослойной хроматографии, спектрофотометрии и газо-жидкостной хроматографии (сорбент – (5%-фенил)-метилполисилоксан) с масс-селективным детектированием (ГХ-МС). В заданных условиях определения 2,6-ДТБ-4-МГОБ методом ГХ-МС время удерживания вещества (стандартные условия) равно  $10.52 \pm 0.12$  мин. Масс-спектр 2,6-ДТБ-4-МГОБ включает сигналы характерных заряженных ионов 57, 105, 145, 177, 205 и 220 m/z, основной из которых – 205 m/z, молекулярный – 220 m/z. Количественное содержание 2,6-ДТБ-4-МГОБ оценивали посредством электронной спектрофотометрии по оптической плотности этанольного раствора аналита при 282 нм. При увеличении содержания 2,6-ДТБ-4-МГОБ от 2.50 до 50.00 мг в 25 г биоматериала колебания среднего значения открываемости аналита не превосходят 1.54 %. Пределы определения аналита в 25 г биоматрицы составляют: 1.25 мг в печени, 1.75 мг – в печени, подвергшейся гнилостным изменениям.

**Ключевые слова:** 2,6-ди-трет-бутил-4-метилгидроксибензол, изолирование, биологические матрицы, очистка, идентификация и количественное определение.

2,6-Ди-трет-бутил-4-метилгидроксибензол (2,6-ди-трет-бутил-4-метилфенол, 2,6-ди-трет-бутил-п-крезол, бутилированный гидрокситолуол, дибунол, ионол) (в дальнейшем – 2,6-ДТБ-4-МГОБ) – вещество, обладающее биологической активностью, проявляющейся в форме антиоксидантного и цитостатического действия [1-5].

Известно, что 2,6-ДТБ-4-МГОБ активно используется в медицинской и ветеринарной прак-

тике как важное составляющее целого ряда препаратов, а также применяется в технике, косметическом и в пищевом производствах [6-9].

2,6-ДТБ-4-МГОБ обычно получают синтетическим путём, однако есть данные, что он является продуктом жизнедеятельности растения *Litchi chinensis* Sonn [10, 11].

2,6-ДТБ-4-МГОБ (масса моля – 220.35) представляет собой прозрачные кристаллы или белый кристаллический порошок, обладает незначительным своеобразным запахом, плавится при

© Чернова А. П., Шорманов В. К., Пугачёва О. И., Кукурека А. В., Воропаева В. Н., Сафонова И. А., 2022

температуре 70-71°C. Это слабая кислота ( $pK_a = 12.2$  (20°C)), имеющая достаточно выраженные липофильные свойства ( $\log P_{ow} = 5.1$ ).

В соответствии с липофильными свойствами структуры 2,6-ДТБ-4-МГОБ отличается плохой (0.6 мг/л при 25°C) растворимостью в воде и хорошей (55.9% при 29.5°C) – в н-гептане. Вещество также хорошо растворимо в этаноле – 34% при 28.7°C и в октаноле – 31.1% при 29.5°C, растворимо в диалкилкетонах и аренах [1, 9, 12].

Источники литературы приводят данные о наличии токсичных свойств у 2,6-ДТБ-4-МГОБ по отношению к теплокровным организмам [13-18].

В случае перорального введения крысам величина LD50 2,6-ДТБ-4-МГОБ находится на уровне 890 мг/кг, мышам – на уровне 650 мг/кг. При внутрибрюшинном введении данного соединения мышам LD50 составляет 138 мг/кг, при внутривенном – 180 мг/кг. Имеются сведения об острых отравлениях 2,6-ДТБ-4-МГОБ и близкими химическими структурами людей, для части которых зафиксирован летальный исход [8, 19-21].

Таким образом, 2,6-ДТБ-4-МГОБ представляет несомненный интерес в химико-токсикологическом отношении.

Целый ряд аспектов химико-токсикологического анализа 2,6-ДТБ-4-МГОБ остаётся мало разработанным.

Исходя из этого, целью выполненного исследования явилось изучение особенностей химико-токсикологического определения 2,6-ДТБ-4-МГОБ.

## МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Объект проведённого исследования – 2,6-дигрет-бутил-4-метилгидроксibenзол (2,6-ДТБ-4-МГОБ), выпущенный фирмой «Acros organics» (США) и содержащий 99.8% основного вещества.

В сравнительном аспекте исследовали особенности изолирования 2,6-ДТБ-4-МГОБ из биологического материала путём настаивания с жидкими органическими веществами, их смесями, а также с водой, растворами кислот и щелочей. Для этой цели готовили искусственные смеси 2,6-ДТБ-4-МГОБ (дисперсность 5-40 мкм) с частицами печени (дисперсность 2-4 мм), создавая концентрацию аналита в матрице 0.1%. Приготовленные подобным образом смеси оставляли при температуре 18-22°C на 90 мин. Схема изолирования включала двукратное (по полчаса) настаивание биоматрицы с изолирующей жидкостью (отношение масс изолирующего агента и биоматериала 2:1). По-

сле объединения обоих извлечений часть общего раствора использовали для хроматографирования в тонком слое силикагеля (пластины «Сорбфил» ПТСХ-АФ-В-УФ, подвижная фаза – хлороформ-бензол (9:1), способ детекции – облучение УФ-светом ( $\lambda = 254$  нм)). Проявляющийся на хроматограмме аналит ( $R_f = 0.75 \pm 0.04$ ) элюировали органической гидрофильной жидкостью (этанолом) и идентифицировали по характеру электронного спектра элюата. Оптическая плотность элюата в области 282 нм (прибор СФ-2000;  $l = 10$  мм), являлась исходным параметром количественной оценки содержания аналита на основе уравнения градуировочного графика.

Критерий выбора оптимального изолирующего агента – величина степени извлечения 2,6-ДТБ-4-МГОБ из биоматрицы. Применяя изложенную выше последовательность извлечения, очистки и определения 2,6-ДТБ-4-МГОБ, изучали влияние времени и кратности настаивания, а также соотношения масс изолирующего агента и биоматериала на степень извлечения аналита оптимальной изолирующей жидкостью.

Очистка изолируемого 2,6-ДТБ-4-МГОБ проводилась в полупрепаративной колонке нормальнофазового сорбента при элюировании малополярной подвижной фазой.

Методом, применённым на предварительном этапе идентификации аналита, явилась ТСХ (пластины «Сорбфил» ПТСХ-АФ-А-УФ).

На этапе подтверждающей идентификации использовался, в частности, метод спектрофотометрии (прибор СФ-2000, растворитель – этанол, область измерений – 200-360 нм,  $l = 1$  см). Одновременно с помощью этого метода оценивали количественное содержание 2,6-ДТБ-4-МГОБ, используя уравнение регрессии  $A = 0.009882 \cdot C - 0.004147$  ( $A$  и  $C$  – соответственно оптическая плотность и содержание аналита в фотометрируемом растворе, мкг/мл).

Ещё одним методом подтверждающей идентификации выбрана ГХ-МС (хроматограф «Agilent Technologies» модели 6850 Network (США) с масс-селективным детектором модели 5973 Network, молекулы аналита разрушали путём бомбардировки электронами с энергией 70 эВ, регистрацию сигнала проводили по полному ионному току в диапазоне 40-500  $m/z$ ).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Данные, полученные при проведении изолирования 2,6-ДТБ-4-МГОБ из модельных смесей

с биоматрицей заданным кругом растворителей, отображены на рис. 1. Содержание рис. 1 демонстрирует, что оптимальным по критерию степени извлечения изолирующим агентом следует считать сочетание этилацетата и ацетона (объёмное отношение 7:3).

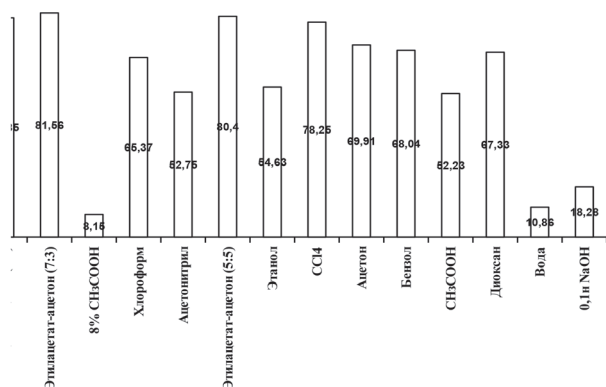


Рис. 1. Зависимость степени извлечения (R) 2,6-ди-трет-бутил-4-метилгидрокси-бензола из биоматериала от природы изолирующего агента

Наилучшие условия извлечения 2,6-ДТБ-4-МГОБ смесью этилацетат-ацетон (7:3) из биоматериала возможно достичь при двукратном настаивании биоматрицы с данной изолирующей жидкостью, в случае двукратного превосходства на каждой стадии настаивания массы изолирующего агента над массой биоматериала и получасовой продолжительности отдельного настаивания (рис. 2).

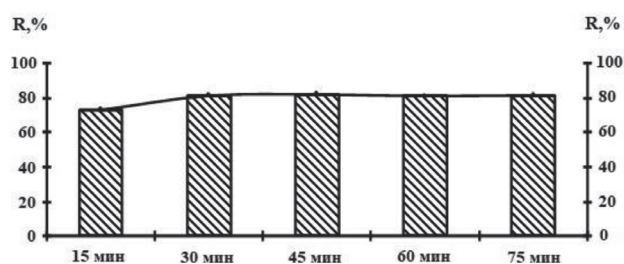


Рис. 2. Зависимость степени извлечения (R) 2,6-ди-трет-бутил-4-метил-гидроксибензола из биоматериала от времени контакта со смесью этилацетат-ацетон (7:3)

Эффективной для очистки 2,6-ДТБ-4-МГОБ от эндогенных компонентов биоматрицы явилась полупрепаративная хроматография в колонке (190×10 мм) силикагеля L (дисперсность  $4.0 \cdot 10^{-5}$ - $1.0 \cdot 10^{-4}$  м) при вымывании малополярным ( $P'=0.32$ ) элюентом гексан-ацетон (9.5:0.5).

Порядок очистки анализа состоял в том, что остаток, полученный после испарения изолирующей жидкости из извлечения, растворяли в 2-3 мл элюента гексан-ацетон (9.5:0.5), помещали в

колонку и вымывали 2,6-ДТБ-4-МГОБ из колонки этим же элюентом.

Элюат фракционировали по 2 мл, 2,6-ДТБ-4-МГОБ обнаруживали во фракциях с помощью ТСХ на пластинах «Сорбфил» (элюент – хлороформ-бензол (9:1), объём, отбираемый для исследования – 5-10 мкл, проявляющий агент – УФ-излучение (254 нм), критерий обнаружения анализа – тёмные пятна на хроматограмме с  $R_f 0.75 \pm 0.04$ ).

Фракции, где возможно присутствие 2,6-ДТБ-4-МГОБ (с 5 по 8 (9-16 мл)), сливали вместе и удаляли растворитель. Остаток растворяли в 5 мл этилацетата (раствор для исследования).

Определённые количества раствора для исследования (0.5-2.5 мл) испаряли в выпарительных чашках (А и Б), помещённых в ток воздуха с температурой 18-22°C.

На предварительном этапе идентификации анализа для воспроизведения ТСХ рекомендован элюент средней полярности ( $P' = 3.89$ ) хлороформ-бензол (9:1). При этом остаток А последовательно 3-4 раза подвергали обработке порциями (0.2-0.3 мл) этанола, осуществляя количественный перенос получаемых растворов на один и тот же участок стартовой линии пластины «Сорбфил». Рядом в одну точку наносили 5-10 мкл 0.1%-ого раствора 2,6-ДТБ-4-МГОБ. Проведя элюирование и проявля хроматограммы в потоке УФ-излучения ( $\lambda=254$  нм), обнаруживали лиловые пятна анализа. Критерий идентификации – соответствие значения  $R_f$  анализа этой же величине стандарта 2,6-ДТБ-4-МГОБ.

Следующим этапом явилось вымывание 2,6-ДТБ-4-МГОБ из сорбента полярным ( $P'=4.3$ ) элюентом (5 или 10 мл этанола) путём погружения фрагмента хроматограммы с пятном анализа в элюент на  $\frac{1}{4}$  часа с последующей идентификацией анализа и оценкой его количественного содержания по особенностям поглощения УФ-излучения элюатом.

Критерием идентификации являлось совпадение спектров изолированного из биоматриц и очищенного по предлагаемой схеме анализа и 2,6-ДТБ-4-МГОБ – стандарта в этаноле по форме и положению максимумов.

На основе результатов контрольных опытов доказано отсутствие 2,6-ДТБ-4-МГОБ в биоматрицах (печень и печень с признаками гнилостного разложения), куда заранее не вводили анализ. Выявлено, что фоновое поглощение раствора  $\frac{1}{4}$  сухого остатка части элюата, с которым может вы-

мываться аналит, в 5 мл этанола, измеренное при 282 нм, равно 0.13 (печень) и 0.18 (печень с признаками гнилостного разложения).

Подтверждающая идентификация 2,6-ДТБ-4-МГОБ с использованием ГХ-МС (колонка DB-5 MS EVIDEX (25 м×0.2 мм×0.33 мкм (5%-фенил)-метилполисилоксан)) проводилась в следующем режиме: колонку после 3 мин выдерживания при 70°C нагревали (скорость 20°C/мин) до 290°C и выдерживали последнюю температуру 2 мин; подвижная фаза (гелий) имела скорость 0.6 мл/мин; инжектор имел температуру 250°C, интерфейс детектора – 300°C; пробу вводили в объёме 4 мкл с делением потока 1:2.

В табл. 1 отражены особенности хроматограмм и масс-спектров стандарта 2,6-ДТБ-4-МГОБ и аналита, извлечённого из биоматриц (печень и печень, подвергшаяся гнилостным изменениям).

При рассмотрении содержания этой таблицы обнаруживается близость (диапазон 10.40-10.64 мин) значений времени удерживания извлечённого из биоматриц аналита и стандарта 2,6-ДТБ-4-МГОБ. Хроматограммы извлечённого из биоматриц аналита характеризуются отсутствием в диапазоне 10.0-11.0 мин в сравнении с хромато-

граммой стандарта 2,6-ДТБ-4-МГОБ дополнительных пиков и искажения контура базовой линии.

Масс-спектры изолированного из биоматериала аналита содержат сигналы свойственных для молекулы 2,6-ДТБ-4-МГОБ заряженных осколков, наиболее интенсивные из которых ( $m/z$ ) 57, 105, 145, 177, 205 и 220. Основным является ион 205  $m/z$ , молекулярным – 220  $m/z$ .

Для установления количественного содержания 2,6-ДТБ-4-МГОБ исходили из величины оптической плотности этанольного элюата при 282 нм.

Данные по оценке количественного содержания 2,6-ДТБ-4-МГОБ в биоматрицах содержатся в табл. 2.

Как видно из таблицы, при росте содержания 2,6-ДТБ-4-МГОБ от 2.5 до 50.0 мг в 25 г биоматрицы колебания среднего значения открываемости аналита не превосходят 1.54 %. Если внесённое в 25 г биоматрицы количество 2,6-ДТБ-4-МГОБ составляет 25 мг, предлагаемая методика обеспечивают определение 80.56-81.62 % аналита в печени и 81.17-82.08 % в печени, подвергшейся гнилостным изменениям. Пределы определения аналита в 25 г биоматрицы составляют: 1.25 мг в печени, 1.75 мг - в печени, подвергшейся гнилостным изменениям.

Таблица 1

Параметры идентификации 2,6-ди-трет-бутил-4-метилгидроксibenзола (2,6-ДТБ-4-МГОБ) методом ГХ-МС

Стандарт 2,6-ДТБ-4-МГОБ		2,6-ДТБ-4-МГОБ, выделенный из печени		2,6-ДТБ-4-МГОБ, выделенный из печени, подвергшейся гнилостным изменениям	
$t_R$ , мин	Заряженные частицы в масс-спектре, $m/z$	$t_R$ , мин	Заряженные частицы в масс-спектре, $m/z$	$t_R$ , мин	Заряженные частицы в масс-спектре, $m/z$
10.52±0.12	41, 57, 67, 91, 105, 115, 145, 177, 205, 220	10.53± 0.14	41, 57, 91, 105, 115, 126, 145, 177, 205, 220	10.55± 0.17	41, 57, 81, 91, 105, 115, 126, 145, 177, 205, 220

Таблица 2

Оценка количественного содержания 2,6-ди-трет-бутил-4-метилгидроксibenзола (2,6-ДТБ-4-МГОБ) в биоматрицах

Добавлено 2,6-ДТБ-4-МГОБ (мг к 25 г биоматрицы)	Найдено 2,6-ДТБ-4-МГОБ, % (n=5; P=0.95)					
	$\bar{x}$	S	$S_p$ , %	$S^{\bar{x}}$	$\Delta\bar{x}$	$\varepsilon$
печень						
50.00	81.45	1.79	2.20	0.80	2.22	2.72
25.00	80.84	1.97	2.44	0.88	2.45	3.03
12.50	81.62	2.33	2.86	1.04	2.89	3.54
5.00	81.08	2.56	3.16	1.15	3.19	3.93
2.50	80.56	2.71	3.36	1.21	3.36	4.17
печень, подвергшаяся гнилостным изменениям						
50.00	82.08	1.97	2.40	0.88	2.45	2.98
25.00	81.89	2.12	2.59	0.95	2.64	3.22
12.50	81.42	2.43	2.98	1.09	3.02	3.71
5.00	81.56	2.81	3.44	1.26	3.49	4.28
2.50	81.17	2.93	3.61	1.31	3.65	4.49

Приводимые данные свидетельствуют о возможности использования разработанной методики в химико-токсикологическом анализе при исследовании биоматриц на присутствие в них 2,6-ДТБ-4-МГОБ.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В эксперименте доказано преимущество применения смеси этилацетат-ацетон (7:3) как изолирующего агента для выделения 2,6-ДТБ-4-МГОБ из биоматериала. Наилучшими условиями для извлечения 2,6-ДТБ-4-МГОБ из биоматриц явились: двукратная (по полчаса) инфузия со смесью этилацетат-ацетон (7:3) при отношении масс изолирующей жидкости и биоматрицы 2:1.

Достаточный уровень очистки аналита обеспечивается хроматографированием извлечения в колонке силикагеля L (дисперсность  $4.0 \cdot 10^{-5}$ - $1.0 \cdot 10^{-4}$  м) в условиях элюирования смесью гексан-ацетон (9.5:0.5).

Предложена схема определения 2,6-ДТБ-4-МГОБ в биоматрицах (печени и печени, подвергшейся гнилостным изменениям) на основе изолирования смесью этилацетат-ацетон (7:3) и очистки колоночной хроматографией.

С целью идентификации и количественного определения рассматриваемого аналита в матрицах биологической природы использованы методы ТСХ, спектрофотометрии и ГХ-МС. Пределы определения 2,6-ДТБ-4-МГОБ в 25 г биоматрицы в соответствии с разработанной методикой составляют: 1.25 мг в печени, 1.75 мг – в печени, подвергшейся гнилостным изменениям.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Butylated hydroxytoluene. PubChem. Open chemistry database. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Butylated-hydroxytoluene> (accessed January 7, 2022).
2. Zhou Z., Wu J., Liu K., Tao W., Liu Y., Yang M. // *CSJ Journals*. 2017. Vol. 46. No 3, pp. 323-326. <https://doi.org/10.1246/cl.161003>
3. Hanada H. // *Hereditas*. 2012. Vol. 149. No 5, pp. 173-177. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.2012.02260.x>
4. Podolina E.A., Rudakov O.B., Khorokhordina E.A., Grigor'ev A.M. // *Journal of Analytical Chemistry*. 2008. Vol. 63. No 6, pp. 548-550. <https://doi.org/10.1134/s1061934808060063>
5. da Silva Santos V., Bisen-Hersh E., Yu Y., Cabral I.S.R., Nardini V., Culbreth M. // *Journal of toxicology and environmental health. Part A*. 2014.

Vol. 77, pp. 390-404. <https://doi.org/10.1080/15287394.2014.880392>

6. Колесников А.В. // *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова*. 2012. № 3. С. 160-167.

7. Sun L., Wu C., Xu J., Zhang S., Dai J., Zhang D. // *Cryobiology*. 2020. Vol. 97, pp. 71-75. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.10.006>

8. Merino O., Aguaguña W.E., Esponda P., Risopatrón J., Isachenko E., Isachenko V., Sánchez R. // *Andrologia*. 2015. Vol. 47, pp. 186-193. <https://doi.org/10.1111/and.12246>

9. Шорманов В.К., Пугачёва О.И., Асташкина А.П., Цацуа Е.П. // *Судебно-медицинская экспертиза*. 2016. Т. 59. № 1. С. 29-34. <https://doi.org/10.17116/sudmed201659129-34>

10. Проценко Л.Д., Булкина З.П. *Химия и фармакология синтетических противоопухолевых препаратов*. Киев, Наукова думка, 1985, 268 с.

11. Jiang G., Lin S., Wen L., Jiang Y., Zhao M., Chen F., Prasad K.N., X. Duan, Yang B. // *Food Chemistry*. 2013. Vol. 136. No 2, pp. 563-568.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.089>

12. Opinion Butylated Hydroxytoluene (BHT). Scientific Committee on Consumer Safety. European Union, 2021. Available at: [https://ec.europa.eu/health/sites/default/files/scientific\\_committees/consumer\\_safety/docs/scs\\_o\\_257.pdf](https://ec.europa.eu/health/sites/default/files/scientific_committees/consumer_safety/docs/scs_o_257.pdf) (accessed January 7, 2022).

13. Lanigan R.S., Yamarik T.A. // *Review Int J Toxicol*. 2002. Vol. 21. No 2, pp. 19-94. <https://doi.org/10.1080/10915810290096513>

14. Negritto M.C., Valdez C., Sharma J., Rosenberg C., Selassie C.R. // *Acs Omega*. 2017. Vol. 2, pp. 8568-8579. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01200>

15. Pop A., Drugan T., Gutleb A.C., Lupu D., Cherfan J., Loghin F., Kiss B. // *Toxicol in vitro*. 2016. Vol. 32, pp. 169-277. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.01.012>

16. Pop A., Drugan T., Gutleb A.C., Lupu D., Cherfan J., Loghin F., Kiss B. // *J Appl Toxicol*. 2018. Vol. 38, pp. 944-957. <https://doi.org/10.1002/jat.3601>

17. Wada H., Tarumi H., Imazato S., Narimatsu M., Ebisu S. // *J Dent Res*. 2004. Vol. 83. No 3, pp. 222-226. <https://doi.org/10.1177/154405910408300307>

18. Yang X., Song W., Liu N., Sun Z., Liu R., Liu Q.S., Zhou Q., Jiang G. // *Environ Sci Technol*. 2018. Vol. 52, pp. 850-858. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b05057>

19. 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol. SIGMA-ALDRICH. Available at: <https://terpconnect.umd>

edu/~choi/MSDS/Sigma-Aldrich/2,6-DI-TERT-BUTYL-4-METHYLPHENOL.pdf (accessed January 7, 2022).

20. Шорманов В.К., Асташкина А.П., Останин М.А., Гришечко О.И., Цацуа Е.П. // Судебно-медицинская экспертиза. 2016. Т. 59. № 4. С. 48-53. <https://doi.org/10.17116/sudmed201659448-53>

ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет»

Чернова А. П., кандидат химических наук, доцент отделения химической инженерии Инженерной школы природных ресурсов

E-mail: [apa2004@mail.ru](mailto:apa2004@mail.ru)

ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет»

\*Шорманов В. К., доктор фармацевтических наук, профессор кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии

E-mail: [r-wladimir@yandex.ru](mailto:r-wladimir@yandex.ru)

Пугачёва О. И., заочный аспирант кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии

E-mail: [lnpugacheva@yandex.ru](mailto:lnpugacheva@yandex.ru)

Кукурека А. В., кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии

E-mail: [kukurekaav@kursksmu.net](mailto:kukurekaav@kursksmu.net)

Воропаева В. Н., кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии

E-mail: [kibets\\_valentina@mail.ru](mailto:kibets_valentina@mail.ru)

Сафонова И. А., кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры общей и биоорганической химии

E-mail: [safonova@pharm.vsu.ru](mailto:safonova@pharm.vsu.ru)

21. Сухомлинова Е.А., Шорманов В.К., Квачахия Л.Л., Елизарова М.К. // Судебно-медицинская экспертиза. 2009. Т. 52. № 2. С. 35-37.

FGAOU VO «National Research Tomsk Polytechnic University»

Chernova A. P., PhD., Associate Professor of the Department of Chemical Engineering of the Faculty of Engineering of Natural Resources

E-mail: [apa2004@mail.ru](mailto:apa2004@mail.ru)

FSEI HE «Kursk State Medical University»

\*Shormanov V. K., PhD., DSci., Doctor of Pharmacy, professor of the department of pharmaceutical, toxicological and analytical chemistry

E-mail: [R-WLADIMIR@yandex.ru](mailto:R-WLADIMIR@yandex.ru)

Pugacheva O. I. correspondence post-graduate student of the Department of Pharmaceutical, Toxicological and Analytical Chemistry

E-mail: [lnpugacheva@yandex.ru](mailto:lnpugacheva@yandex.ru)

Kukureka A. V., PhD., Associate Professor of the Department of Pharmaceutical, Toxicological and Analytical Chemistry

E-mail: [kukurekaav@kursksmu.net](mailto:kukurekaav@kursksmu.net)

Voropaeva V. N., PhD., Associate Professor of the Department of Pharmaceutical, Toxicological and Analytical Chemistry

E-mail: [kibets\\_valentina@mail.ru](mailto:kibets_valentina@mail.ru)

Safonova I. A., PhD., Associate Professor of the Department of General and Bioorganic Chemistry

E-mail: [safonova@pharm.vsu.ru](mailto:safonova@pharm.vsu.ru)

## CHEMICAL-TOXICOLOGICAL DETERMINATION 2,6-DI-TERT-BUTYL-4-METHYLHYDROXYBENZENE

A.P. Chernova<sup>1</sup>, V.K. Shormanov<sup>2</sup>, O.I. Pugacheva<sup>2</sup>, A.V. Kukureka<sup>2</sup>, V.N. Voropaeva<sup>2</sup>, I.A. Safonova<sup>2</sup>

<sup>1</sup> FGAOU VO "National Research Tomsk Polytechnic University"

<sup>2</sup> FSBEI HE "Kursk State Medical University" of the Ministry of Health of Russia

Received by the editorial office

**Abstract.** 2,6-Di-tert-butyl-4-methylhydroxybenzene (2,6-DTB-4-MGOB) is a biologically active substance that exhibits antioxidant and cytostatic effects. 2,6-DTB-4-MGOB is actively used in medicine and

veterinary medicine as an important component of various drugs, and is also used in technology and food production. 2,6-DTB-4-MGOB is known to have toxic properties. Acute poisoning of 2,6-DTB-4-MGOB and similar chemical structures of people, for some of whom a fatal outcome was recorded, is described.

The aim of the study was to study the features of the chemical-toxicological determination of 2,6-DTB-4-MGOB.

It has been established that the best conditions for the extraction of 2,6-DTB-4-MGOB from biomaterial are provided by a two-fold (half an hour) infusion with a mixture of ethyl acetate-acetone (7:3), provided that the mass of the isolating agent is twice superior to the mass of the biomaterial at each stage of infusion. The efficiency of purification of 2,6-DTB-4-MGOB from endogenous components of biomaterial in a semi-preparative (190×10 mm) silica gel column L (dispersion  $4.0 \cdot 10^{-5}$ - $1.0 \cdot 10^{-4}$  m) was shown when washed out with a low-polar eluent hexane-acetone (9.5:0.5). To identify and assess the quantitative content of the analyte, methods of thin layer chromatography, spectrophotometry, and gas-liquid chromatography (sorbent – (5%-phenyl)-methylpolysiloxane) with mass selective detection (GC-MS) were used. Under the specified conditions for the determination of 2,6-DTB-4-MGOB by GC-MS, the retention time of the substance (standard conditions) is  $10.52 \pm 0.12$  min. The mass spectrum of 2,6-DTB-4-MGOB includes signals of characteristic charged ions 57, 105, 145, 177, 205, and 220 m/z, the main of which is 205 m/z, and the molecular one is 220 m/z. The quantitative content of 2,6-DTB-4-MGOB was estimated by electronic spectrophotometry by the optical density of an ethanol solution of the analyte at 282 nm. With an increase in the content of 2,6-DTB-4-MGOB from 2.50 to 50.00 mg in 25 g of biomaterial, the fluctuations in the average value of the analyte opening do not exceed 1.54 %. The limits of determination of the analyte in 25 g of the biomatrix are: 1.25 mg in the liver, 1.75 mg - in the liver, which has undergone putrefactive changes.

**Keywords:** 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylhydroxybenzene, isolation, biological matrices, purification, identification and quantification.

## REFERENCES

1. Butylated hydroxytoluene. PubChem. Open chemistry database. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Butylated-hydroxytoluene> (accessed January 7, 2022).
2. Zhou Z., Wu J., Liu K., Tao W., Liu Y., Yang M., CSJ Journals, 2017, Vol. 46, No 3, pp. 323-326. <https://doi.org/10.1246/cl.161003>
3. Hanada H., Hereditas, 2012, Vol. 149, No 5, pp. 173-177. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.2012.02260.x>
4. Podolina E.A., Rudakov O.B., Khorokhordina E.A., Grigor'ev A.M., Journal of Analytical Chemistry, 2008, Vol. 63, No 6, pp. 548-550. <https://doi.org/10.1134/s1061934808060063>
5. da Silva Santos V., Bisen-Hersh E., Yu Y., Cabral I.S.R., Nardini V., Culbreth M., Journal of toxicology and environmental health. Part A, 2014, Vol. 77, pp. 390-404. <https://doi.org/10.1080/15287394.2014.880392>
6. Kolesnikov A.V., Rossiiskii mediko-biologicheskii vestnik imeni akademika I.P. Pavlova, 2012, No 3, pp. 160-167.
7. Sun L., Wu C., Xu J., Zhang S., Dai J., Zhang D., Cryobiology, 2020, Vol. 97, pp. 71-75. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.10.006>
8. Merino O., Aguagüña W.E., Esponda P., Risopatrón J., Isachenko E., Isachenko V., Sánchez R., Andrologia, 2015, Vol. 47, pp. 186-193. <https://doi.org/10.1111/and.12246>
9. Shormanov V.K., Pugacheva O.I., Astashkina A.P., Tsatsua E.P., Sudebno-meditsinskaya ekspertiza, 2016, Vol. 59, No 1, pp. 29-34. <https://doi.org/10.17116/sudmed201659129-34>
10. Protsenko L.D., Bulkina Z.P. Himiya i farmakologiya sinteticheskikh protivopuholevykh preparatov. Kiyev, Naukova dumka, 1985, 268 p.
11. Jiang G., Lin S., Wen L., Jiang Y., Zhao M., Chen F., Prasad K.N., X. Duan, Yang B., Food Chemistry, 2013, Vol. 136, No 2, pp. 563-568. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.089>
12. Opinion Butylated Hydroxytoluene (BHT). Scientific Committee on Consumer Safety. European Union, 2021. Available at: [https://ec.europa.eu/health/sites/default/files/scientific\\_committees/consumer\\_safety/docs/scs\\_o\\_257.pdf](https://ec.europa.eu/health/sites/default/files/scientific_committees/consumer_safety/docs/scs_o_257.pdf) (accessed January 7, 2022).
13. Lanigan R.S., Yamarik T.A., Review Int J Toxicol, 2002, Vol. 21, No 2, pp. 19-94. <https://doi.org/10.1080/10915810290096513>
14. Negritto M.C., Valdez C., Sharma J., Rosenberg C., Selassie C.R., Acs Omega, 2017, Vol. 2, pp. 8568-8579. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01200>
15. Pop A., Drugan T., Gutleb A.C., Lupu D., Cherfan J., Loghin F., Kiss B., Toxicol in vitro, 2016, Vol. 32, pp. 169-277. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.01.012>
16. Pop A., Drugan T., Gutleb A.C., Lupu D., Cherfan J., Loghin F., Kiss B., J Appl Toxicol, 2018, Vol. 38, pp. 944-957. <https://doi.org/10.1002/jat.3601>

17. Wada H., Tarumi H., Imazato S., Narimatsu M., Ebisu S., J Dent Res, 2004, Vol. 83, No 3, pp. 222-226. <https://doi.org/10.1177/154405910408300307>
18. Yang X., Song W., Liu N., Sun Z., Liu R., Liu Q.S., Zhou Q., Jiang G., Environ Sci Technol, 2018, Vol. 52, pp. 850-858. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b05057>
19. 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol. SIGMA-ALDRICH. Available at: <https://terpconnect.umd.edu/~choi/MSDS/Sigma-Aldrich/2,6-DI-TERT-BUTYL-4-METHYLPHENOL.pdf> (accessed January 7, 2022).
20. Shormanov V.K., Astashkina A.P., Ostanin M.A., Grischechko O.I., Tsatsua E.P., Sudebno-meditsinskaya ekspertiza, 2016, Vol. 59, No 4, pp. 48-53. <https://doi.org/10.17116/sudmed201659448-53>
21. Sukhomlinova E.A., Shormanov V.K., Kvachakhiya L.L., Elizarova M.K., Sudebno-meditsinskaya ekspertiza, 2009, Vol. 52, No 2, pp. 35-37.