



## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 615.07:547.56:543.544

doi: 10.17308/sorpchrom.2023.23/11146

### Применение методов обращённо-фазовой хроматографии для определения ди-трет-бутилфенолов в биологических жидкостях

Анна Павловна Чернова<sup>1</sup>,

Владимир Камбулатович Шорманов<sup>2</sup>✉, Елена Паатовна Цацуа<sup>2</sup>,

Оксана Игоревна Пугачёва<sup>2</sup>, Ольга Валерьевна Тарасова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Национальный исследовательский Томский политехнический университет, Томск, Россия

<sup>2</sup>Курский государственный медицинский университет», Курск, Россия, R-WLADIMIR@yandex.ru✉

**Аннотация.** Объектами исследования явились биологически активные полиалкилфенолы с ди-трет-бутильными радикалами в положениях «2» и «4» (2,4-ди-трет-бутилфенол (2,4-ДТБФ), 2,6-ди-трет-бутилфенол (2,6-ДТБФ) и 2,6-ди-трет-бутил-4-метилфенол (2,6-ДТБ-4-МФ)), обладающие токсическими свойствами для человека. В качестве методов анализа применялись ТСХ (тонкий слой силикагеля СТХ-1А, модифицированного углеводородами с длиной цепи C14-C15), жидкостная колоночная хроматография обычного давления (колонка сорбента «Силасорб С-18 150×10 мм) и ВЭЖХ (колонка 250×4.6 мм Discovery® C18 с предколонкой 20×4.0 мм).

Исследовались особенности хроматографической активности выбранного класса полиалкилфенолов в тонком слое и колонках обращённых фаз при использовании полярных элюентов, включающих различные (5-100 об.%) доли органического составляющего, которым мог являться ацетон или ацетонитрил. Как критерии идентификации ди-трет-бутилфенолов рассмотренной группой методов были рассчитаны основные параметры хроматографической подвижности аналитов. Было показано, что наиболее приемлемые условия разделения соединений рассматриваемой группы обеспечиваются в результате применения подвижных фаз вода – ацетонитрил (40:60) и буферный раствор (рН 5.5) – ацетонитрил (30:70) (ТСХ), вода – ацетонитрил (20:80) (колоночная хроматография обычного давления), ацетатный буферный раствор (рН 5.5) – ацетонитрил (30:70) (ВЭЖХ). Хроматографическая подвижность анализируемых соединений в предлагаемых условиях зависит от числа и взаимного расположения алкильных радикалов в их молекулах и увеличивается в соответствии с ростом их гидрофильности в ряду 2,4-ДТБ-4-МФ < 2,6-ДТБФ < 2,4-ДТБФ.

На основе комплекса выполненных экспериментов разработаны методики определения веществ-объектов исследования в жидких биоматрицах (крови и плазме). Эти методики по основным валидационным критериям соответствуют требованиям, существующим в практике биологического и химико-токсикологического анализа. Предельные минимальные количества ди-трет-бутилфенолов, обнаруживаемые разработанными методиками в 1 г крови, составляют  $(1.8-8.0) \cdot 10^{-6}$  г (для ТСХ) и  $(1.0-5.0) \cdot 10^{-6}$  г (для ВЭЖХ), в 1 г плазмы –  $(1.6-5.0) \cdot 10^{-6}$  г (для ТСХ) и  $(1.0-3.0) \cdot 10^{-6}$  г (для ВЭЖХ).

Возможно использование разработанных по результатам исследований и прошедших валидационную оценку методик в практике химико-токсикологического анализа ди-трет-бутилпроизводных фенола для объективного доказательства фактов отравления этими биологически активными веществами.

**Ключевые слова:** биологически активные ди-трет-бутилфенолы, ТСХ, колоночная хроматография, ВЭЖХ, кровь и плазма.

**Для цитирования:** Чернова А.П., Шорманов В.К., Цацуа Е.П., Пугачёва О.И., Тарасова О.В. Применение методов обращённо-фазовой хроматографии для определения ди-трет-бутилфенолов в биологических жидкостях // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2023. Т. 23, № 2. С. 225-235 <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11146>



Original article

## The use of reversed-phase chromatography methods for the determination of di-tert-butylphenols in biological fluids

Anna P. Chernova<sup>1</sup>, Vladimir K. Shormanov<sup>2✉</sup>, Elena P. Tsatsua<sup>2</sup>,  
Oksana I. Pugacheva<sup>2</sup>, Olga V. Tarasova<sup>2</sup>

<sup>1</sup>National Research Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation

<sup>2</sup>Kursk State Medical University, Kursk, Russian Federation, R-WLADIMIR@yandex.ru✉

**Abstract.** The objects of the study were biologically active polyalkylphenols with di-tert-butyl radicals in positions "2" and "4" (2,4-di-tert-butylphenol (2,4-DTBP), 2,6-di-tert-butylphenol (2,6-DTBP) and 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol (2,6-DTB-4-MP) toxic to humans. TLC (a thin layer of CTX-1A silica gel modified with hydrocarbons with a chain length of C14-C15), conventional pressure liquid column chromatography (Silasorb C-18 sorbent column 150×10 mm) and HPLC (250×4.6 mm Discovery® C18 column with precolumn 20×4.0 mm) were used as analysis methods.

The features of the chromatographic activity of a selected class of polyalkylphenols in a thin layer and columns of reversed phases were studied using polar eluents, including various (5-100 vol. %) of the organic component, which could be acetone or acetonitrile. The main parameters of the chromatographic mobility of analytes were calculated as criteria for identifying di-tert-butylphenols using the group of considered methods. It was shown that the most acceptable conditions for the separation of considered compounds are provided as a result of the use of mobile phases water-acetonitrile (40:60) and buffer solution (pH 5.5) – acetonitrile (30:70) (TLC), water - acetonitrile (20:80) (column chromatography of ordinary pressure), acetate buffer solution (pH 5.5) - acetonitrile (30:70) (HPLC). The chromatographic mobility of the analysed compounds under the proposed conditions depends on the number and mutual arrangement of alkyl radicals in their molecules and increases with the increase of their hydrophilicity in the series 2,4-DTB-4-MP < 2,6-DTBP < 2,4-DTBP.

Based on the complex of performed experiments, methods for determination of the investigated substances in liquid biomatrices (blood and plasma) have been developed. According to the main validation criteria, these methods correspond to the requirements existing in the practice of biological and chemical-toxicological analysis. Limiting minimum quantities of di-tert-butylphenols detected by the developed methods in 1 g of blood are (1.8-8.0) 10<sup>-6</sup> g (for TLC) and (1.0-5.0) 10<sup>-6</sup> g (for HPLC), in 1 g of plasma – (1.6-5.0) 10<sup>-6</sup> g (for TLC) and (1.0-3.0) 10<sup>-6</sup> g (for HPLC).

The methods developed based on the results of studies after the validation assessment can be used for chemical and toxicological analysis of di-tert-butyl derivatives of phenol for evidence of the facts of poisoning by these biologically active substances.

**Keywords:** biologically active di-tert-butylphenols, TLC, column chromatography, HPLC, blood and plasma.

**For citation:** Chernova A.P., Shormanov V.K., Tsatsua E.P., Pugacheva O.I., Tarasova O.V. The use of reversed-phase chromatography methods for the determination of di-tert-butylphenols in biological fluids. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2023. 23(2): 225-235 (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11146>

### Введение

Ди-*трет*-бутилфенолы – вещества, наиболее известные как антиоксиданты [1-4]. Данные соединения используются при получении пластификаторов, стабилизаторов, реактивного топлива, смол на синтетической основе, пестицидов [5-7], проявляют свойства ингибиторов роста сорных растений и фунгицидную активность [1, 8]. Ди-*трет*-бутилфенолы могут быть охарактеризованы как достаточно токсичные для человека и животных соединения [2, 9]. В литературных

источниках приводятся сообщения с описанием случаев острых отравлений людей ди-*трет*-бутилфенолами и структурно близкими веществами, часть из которых имела фатальные исходы [10-11].

Наличие у 2,6-ди-*трет*-бутилфенолов токсических свойств, активное применение этих соединений, случаи отравления 2,6-ди-*трет*-бутилфенолами людей позволяют считать их важными объектами для токсикологической химии.

Некоторые направления химико-токсикологического анализа ди-*трет*-бутил-



фенолов относительно мало проработаны. Например, не так детально исследованы особенности применения хроматографии для целей очистки данной группы полиалкилфенолов от примесей биологической природы, обнаружения и количественной оценки их присутствия в извлечениях из биожидкостей.

Цель данной работы – изучение вопросов определения ди-*трет*-бутилфенолов методами обращенно-фазовой хроматографии в жидких биологических матрицах.

### Экспериментальная часть

Исследованию подверглись 2,4-ди-*трет*-бутилфенол (2,4-ДТБФ) («Sigma-Aldrich chemistry», содержание 99.0%); 2,6-ди-*трет*-бутилгидроксибензол (2,6-ДТБФ) («Sigma-Aldrich chemistry»), содержание  $\geq 99.0\%$ ; 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенол (2,6-ДТБ-4-МФ) («Acros organics», содержание  $\geq 99.8\%$ ). Внутренний стандарт – фенол (Ф) (ч.д.а., «Вектон», содержание 99.5%).

В работе применена группа методов хроматографического анализа: ТСХ, жидкостная колоночная хроматография обычного давления (ЖКХОД) и ВЭЖХ. Во всех случаях применялся обращенно-фазовый вариант проведения процесса.

В методе ТСХ неподвижной фазой являлся силикагель (степень дисперсности – 5 мкм), модифицированный углеводородами с числом атомов углерода 14-15. На стартовую линию пластины исследуемые ди-*трет*-бутилфенолы наносили в форме 0.02%-ых растворов (наносимый объем – 5-10 мкм). Хроматографировали, применяя восходящий режим элюирования. Подвижные фазы – вода и буферные растворы, а также их бинарные композиции с органическими модификаторами.

Пятна аналитов детектировали на полученных хроматограммах, воздействуя на них УФ-излучением с длиной волны 254 нм. Вычисляли основные параметры, характеризующие подвижность аналитов

( $R_f$ ,  $R_s$ ,  $B$  – условное удерживание) и возможность их разделения ( $N$  – число теоретических тарелок,  $k'$  – коэффициент емкости,  $H$  – высота, эквивалентная 1 теоретической тарелке,  $R$  – критерий разделения). Рассматривали влияние на скорость перемещения аналитов в тонком слое от уровня содержания модификатора в бинарных элюентах.

В методе ЖКХОД сорбентом являлся Silasorb  $C_{18}$  30 мкм, сформированный в виде колонки 150×10 мм. Аналиты вносили в колонку в форме 0.25%-ых растворов в элюентах (вносимый объем 2 см<sup>3</sup>). Объем каждой фракции собираемых элюатов – 2 см<sup>3</sup>. Наличие ди-*трет*-бутилфенолов в отдельных фракциях устанавливали методом спектрофотометрии после удаления растворителя и растворения остатка в этаноле. Для аналитов вычисляли время удерживания ( $t_R$ ) и ряд других, приводимых выше параметров.

Воспроизводя ВЭЖХ, использовали прибор «LC-20 Prominace» (Shimadzu) с матричным фотодиодным детектором, колонкой Discovery®  $C_{18}$  250×4.6 мм (Supelco), термостатируемой при 40°C, и предколонкой Discovery®  $C_{18}$  20×4.0 мм (Supelco). Элюировали со скоростью 1 см<sup>3</sup>/мин. Сигнал регистрировали при 280 нм. Параметры хроматографирования вычисляли по известным формулам. Для оценки количественного содержания ди-*трет*-бутилфенолов рассчитывали уравнения градуировочных графиков (линейной зависимости площади пика от содержания аналита в элюируемом объеме).

### Обсуждение результатов

Результаты изучения подвижности ди-*трет*-бутилфенолов в тонком слое сорбента отражены в табл. 1.

Эти результаты показывают, что при применении монокомпонентных элюентов (вода и буферные растворы) хроматографическая подвижность аналитов низка, что не обеспечивает необходимой селективности определения.

Таблица 1. Подвижность ди-*tert*-бутилфенолов в тонком слое сорбента СТХ-1А, модифицированного углеводородами с длиной цепи C<sub>14</sub>-C<sub>15</sub>

Table 1. Mobility of di-*tert*-butylphenols in a thin layer of STX-1A sorbent modified with hydrocarbons with a chain length of C<sub>14</sub>-C<sub>15</sub>

Элюент	Доля модификатора, об. %	Характеристики подвижности						Ф
		2,4-ДТБФ		2,6-ДТБФ		2,6-ДТБ-4-МФ		
		Абсолютная (Rf)	Относительная (Rs)	Абсолютная (Rf)	Относительная (Rs)	Абсолютная (Rf)	Относительная (Rs)	
Раствор (рН 5.5)	-	0.00	0.00	0.00	0.11	0.00	0.00	0.10
Вода	-	0.06	0.42	0.03	0.15	0.02	0.13	0.15
Раствор (рН 9.91)	-	0.00	0.00	0.00	0.09	0.00	0.00	0.09
Вода – ацетон	80	0.56	0.64	0.45	0.88	0.31	0.35	0.88
Вода – ацетон Раствор (рН 5.5) – ацетон	70	0.40	0.49	0.33	0.82	0.25	0.31	0.82
	60	0.32	0.41	0.28	0.78	0.18	0.23	0.78
	50	0.23	0.36	0.18	0.64	0.12	0.19	0.64
	40	0.15	0.30	0.13	0.50	0.07	0.14	0.50
	30	0.10	0.22	0.08	0.45	0.05	0.11	0.45
	20	0.07	0.21	0.05	0.34	0.03	0.09	0.34
	80	0.59	0.69	0.47	0.86	0.35	0.41	0.86
Раствор (рН 5.5) – ацетон Раствор (рН 9.91) – ацетон	70	0.46	0.58	0.40	0.80	0.27	0.34	0.80
	60	0.36	0.52	0.32	0.69	0.22	0.32	0.69
	50	0.25	0.46	0.21	0.55	0.17	0.31	0.55
	40	0.17	0.33	0.13	0.52	0.10	0.19	0.52
	30	0.12	0.26	0.09	0.47	0.08	0.17	0.47
	20	0.09	0.25	0.06	0.36	0.05	0.14	0.36
	80	0.57	0.67	0.49	0.85	0.39	0.46	0.85
Раствор (рН 9.91) – ацетон Вода – ацетонитрил	70	0.52	0.65	0.44	0.80	0.32	0.40	0.80
	60	0.44	0.61	0.35	0.72	0.25	0.35	0.72
	50	0.32	0.54	0.25	0.59	0.14	0.24	0.59
	40	0.23	0.44	0.17	0.52	0.09	0.17	0.52
	30	0.16	0.36	0.10	0.44	0.07	0.16	0.44
	20	0.11	0.33	0.07	0.33	0.04	0.12	0.33
	80	0.78	0.84	0.58	0.93	0.45	0.48	0.93
Вода – ацетонитрил Раствор (рН 5.5) – ацетонитрил	70	0.69	0.80	0.48	0.86	0.36	0.42	0.86
	60	0.61	0.77	0.38	0.79	0.24	0.31	0.79
	50	0.44	0.65	0.31	0.68	0.20	0.29	0.68
	40	0.33	0.60	0.24	0.55	0.15	0.27	0.55
	30	0.21	0.45	0.15	0.47	0.11	0.23	0.47
	20	0.16	0.41	0.10	0.39	0.05	0.13	0.39
	80	0.70	0.75	0.56	0.94	0.42	0.45	0.94
Раствор (рН 5.5) – ацетонитрил Раствор (рН 9.91) – ацетонитрил	70	0.58	0.65	0.42	0.89	0.27	0.30	0.89
	60	0.43	0.51	0.32	0.85	0.19	0.22	0.85
	50	0.36	0.46	0.23	0.79	0.15	0.19	0.79
	40	0.23	0.37	0.17	0.62	0.11	0.18	0.62
	30	0.16	0.33	0.11	0.49	0.08	0.16	0.49
	20	0.12	0.29	0.08	0.41	0.05	0.12	0.41
	80	0.67	0.73	0.45	0.49	0.38	0.41	0.92
Раствор (рН 9.91) – ацетонитрил	70	0.61	0.68	0.39	0.43	0.31	0.34	0.90
	60	0.54	0.66	0.33	0.40	0.24	0.29	0.82
	50	0.46	0.63	0.28	0.38	0.20	0.27	0.73
	40	0.35	0.60	0.21	0.36	0.15	0.26	0.58
	30	0.21	0.47	0.13	0.29	0.11	0.24	0.45
	20	0.13	0.31	0.06	0.15	0.05	0.13	0.39

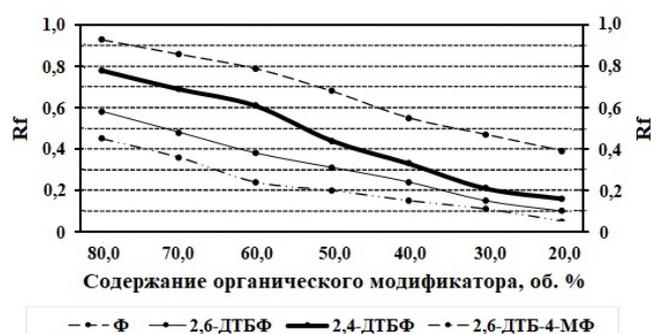


Рис. 1. Диаграммы хроматографирования ди-*трет*-бутилфенолов с использованием подвижных фаз вода – ацетонитрил

Fig. 1. Diagrams of chromatography of di-*tert*-butylphenols using mobile phases water – acetonitrile

Таблица 2. Параметры хроматографирования ди-*трет*-бутилфенолов в тонком слое сорбента с применением оптимальных подвижных фаз

Table 2. Chromatography parameters for di-*tert*-butylphenols in a thin layer of sorbent using optimal mobile phases

Аналит	Найденные параметры				
	В	k'	N	H, мм	R <sub>s</sub>
Вода – ацетонитрил (40:60)					
Фенол	1.27	0.27	1136	0.070	1.83 3.81 3.20
2,4-ДТБФ	1.59	0.59	1343	0.060	
2,6-ДТБФ	2.63	1.63	924	0.087	
2,6-ДТБ-4-МФ	4.17	3.17	655	0.122	
Буферный раствор (pH 5.5) – ацетонитрил (30:70)					
Фенол	1.12	0.12	1267	0.063	3.76 2.91 3.64
2,4-ДТБФ	1.72	1.72	1264	0.064	
2,6-ДТБФ	2.38	1.38	1393	0.057	
2,6-ДТБ-4-МФ	3.70	2.70	829	0.097	

Переходя к бинарным подвижным фазам, удаётся увеличить хроматографическую подвижность ди-*трет*-бутилфенолов, оптимизируя тем самым процесс определения и обеспечивая лучшее разделение аналитов.

Как видно из табл. 1, для каждой группы бинарных элюентов отмечается рост хроматографической подвижности анализируемых ди-*трет*-бутилфенолов с увеличением содержания органического модификатора в элюенте.

Наилучшие условия разделения аналитов методом ТСХ обусловлены применением групп подвижных фаз вода – ацетонитрил и раствор (pH 5.5) – ацетонитрил. Диаграммы, отражающие зависимость хроматографической подвижности аналитов от концентрации органического

модификатора в группе элюентов вода – ацетонитрил изображена на рис. 1. Как видно из рисунка, оптимальным элюентом в данной группе является смесь вода-ацетонитрил (40:60). Из группы подвижных фаз раствор (pH 5.5) – ацетонитрил оптимальной является смесь с соотношением разбавителя и модификатора (30:70). Хроматографические характеристики исследуемых ди-*трет*-бутилфенолов в случае применения этих подвижных фаз отражены в табл. 2.

Спектрофотометрическое доказательство присутствия ди-*трет*-бутилфенолов в отдельных фракциях элюата при использовании метода ЖКХОД проводилось по форме спектра в этаноле и положению максимумов поглощения: 211 и 271 нм (для Ф), 225 нм и 280 нм (для 2,4-

Таблица 3. Параметры, описывающие поведение ди-*tert*-бутилфенолов в колонке неподвижной фазы Silasorb C<sub>18</sub> 30 мкм при элюировании смесями вода-ацетонитрил  
 Table 3. Parameters describing the behaviour of di-*tert*-butylphenols in stationary phase column Silasorb C<sub>18</sub> phases 30 μm during elution with water-acetonitrile mixtures

Аналит	Отношение компонентов в элюенте вода-ацетонитрил	V <sub>R</sub> , см <sup>3</sup>	t <sub>R</sub> , мин	k'	N	H, мм
Фенол	40:60	15.8	19.75	1.43	269	0.558
	30:70	15.6	16.60	1.40	159	0.943
	20:80	13.6	12.83	1.09	89	1.685
	10:90	13.2	8.63	1.03	52	2.885
	5:95	13.0	7.78	1.00	41	3.659
	0:100	12.8	7.19	0.97	32	4.688
2,4-ди- <i>tert</i> -бутилфенол	30:70	39.1	41.60	5.02	682	0.220
	20:80	23.6	22.26	2.63	175	0.857
	10:90	17.5	11.44	1.69	47	3.192
	5:95	15.4	9.22	1.37	32	4.688
	0:100	13.4	7.52	1.06	24	6.250
2,6-ди- <i>tert</i> -бутилфенол	30:70	50.3	53.51	6.74	1049	0.143
	20:80	28.4	26.79	3.37	285	0.526
	10:90	19.2	12.55	1.95	60	2.500
	5:95	16.0	9.58	1.46	41	3.658
	0:100	13.7	7.71	1.11	25	6.000
2,6-ди- <i>tert</i> -бутил-4-метилфенол	20:80	37.5	35.38	4.77	869	0.173
	15:85	25.5	19.32	2.92	332	0.452
	10:90	21.5	14.05	2.31	153	0.980
	5:95	19.5	11.68	2.00	112	1.339
	0:100	14.0	7.88	1.15	47	3.192

ДТБФ), 224 и 275 нм (для 2,6-ДТБФ, 212 и 279 нм (для 2,6-ДТБ-4-МФ).

Параметры хроматографирования аналитов методом ЖКХОД в случае использования в качестве элюентов воды, ацетонитрила и композиций данных растворителей в тех или иных соотношениях (по объёму) отражены в табл. 3.

Как показывают данные табл. 3, универсальный элюент, обеспечивающий хорошие условия хроматографирования всех аналитов, – система вода – ацетонитрил (20:80). Она позволяет селективно определять ди-*tert*-бутилфенолы при их совместном присутствии и в присутствии гидрофильных эндогенных соединений биоматериала, выходящих из колонки в первых фракциях элюата (4-8 см<sup>3</sup>).

Хроматограмма смеси ди-*tert*-бутилфенолов (метод ЖКХОД), получен-

ная на основе определения значений оптической плотности этанольных растворов остатков фракций элюата в области длинноволновых максимумов аналитов после элюирования системой вода – ацетонитрил (20:80) представлена на рис. 2.

Рис. 2 демонстрирует возможность разделения аналитов в предлагаемой колонке при их совместном присутствии.

В отличие от стандартных патронов (картриджей), рассчитанных на очистку извлечений из небольших навесок биоматриц, колонка (150×10 мм) сорбента «Силасорб» C<sub>18</sub> позволяет очищать извлечения из значительных количеств биожидкостей и тканей. Это важно в практике судебно-химического анализа, где по нормативам на исследование берут 25-100 г биоматериала. С другой стороны, предлагаемая колонка позволяет не только очищать аналиты, но и разделять

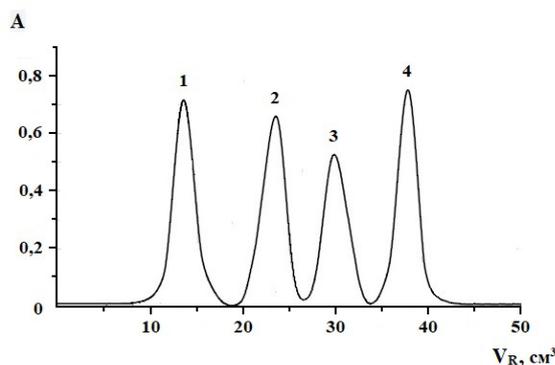


Рис. 2. Хроматограмма (ЖКХОД) смеси анализируемых соединений  
 1 – Ф, 2 – 2,4-ДТБФ, 3 – 2,6-ДТБФ, 4 – 2,6-ДТБ-4-МФ (колонка Силасорб C<sub>18</sub> 150×10 мм,  
 элюент – вода – ацетонитрил (20:80))

Fig. 2. Chromatogram (LCC) of a mixture of analysed compounds  
 1 – F, 2 – 2,4-DTBP, 3 – 2,6-DTBP, 4 – 2,6-DTB-4-MP (column Silasorb C<sub>18</sub> 150×10 mm,  
 eluent – water – acetonitrile (20:80))

Таблица 4. Основные параметры хроматографирования ди-*tert*-бутилфенолов методом ВЭЖХ (колонка Discovery® C<sub>18</sub> 250×4.6 мм; подвижная фаза ацетатный буферный раствор (pH 5.5) – ацетонитрил (30:70))

Table 4. Basic chromatography parameters of di-*tert*-butylphenols by HPLC (column Discovery® C<sub>18</sub> 250×4.6 mm; mobile phase acetate buffer solution (pH 5.5) – acetonitrile (30:70))

Хроматографируемые вещества	t <sub>R</sub> , мин	V <sub>R</sub> , мл	k'	ω, мин	N	H, мм	R <sub>s</sub>
Фенол	4.700	4700	0.516	0.28	4398	0.057	13.750
2,4-ДТБФ	9.187	9187	1.964	0.38	9352	0.027	7.229
2,6-ДТБФ	11.989	11989	2.867	0.45	11356	0.022	5.501
2,6-ДТБ-4-МФ	14.602	14602	3.710	0.50	13646	0.018	

их смеси с возможным дальнейшим определением каждого из них.

При определении ди-*tert*-бутилфенолов методом ВЭЖХ в качестве элюента использовали смесь раствор (pH 5.5) – ацетонитрил (30:70).

Основные хроматографические параметры рассматриваемых аналитов с использованием метода ВЭЖХ отражены в табл. 4.

Как видно из полученных данных, предлагаемая хроматографическая система позволяет достичь относительно высокой эффективности колонки в отношении рассматриваемых ди-*tert*-бутилфенолов и обеспечить их полное разделение при одновременном содержании в элюируемом объеме.

Предел обнаружения аналитов методом ВЭЖХ – 5.0·10<sup>-9</sup>-1.0·10<sup>-8</sup> г в элюируемой пробе. Величина относительной

ошибки среднего результата при количественном определении ди-*tert*-бутилфенолов – не более 1.15% (n=6; P=0.95). Как показывают результаты определения различными методами, хроматографическая подвижность анализируемых соединений в предлагаемых условиях зависит от числа и взаимного расположения алкильных радикалов в их молекулах и увеличивается в соответствии с ростом гидрофильности в ряду 2,4-ДТБ-4-МФ < 2,6-ДТБФ < 2,4-ДТБФ.

На основе предварительных исследований предложены пути очистки и определения аналитов в биожидкостях выбранной группой методов.

Методики определения аналитов в биожидкостях. Модельные смеси (по 25 г) на основе крови или плазмы, содержащие 0.0002-0.04% аналитов, которые сохраняли ¾ часа при 18-22°C, после чего

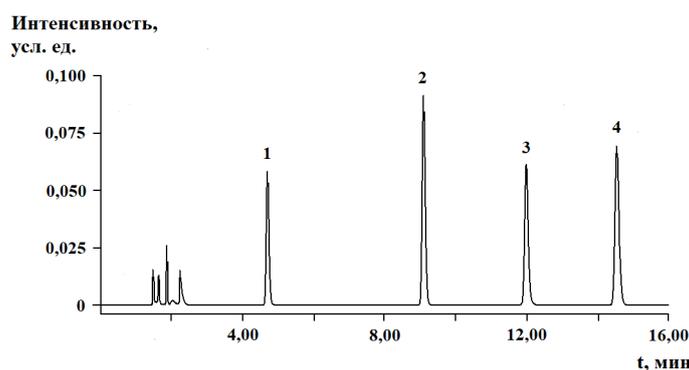


Рис. 3. Хроматограмма (ВЭЖХ) анализируемых соединений, выделенных из крови:  
1 – Ф, 2 – 2,4-ДТБФ, 3 – 2,6-ДТБФ, 4 – 2,6-ДТБ-4-МФ (колонка Discovery® C<sub>18</sub>  
250×4.6 мм, элюент – буферный раствор (pH 5.5) – ацетонитрил (30:70))

Fig. 3. Chromatogram (HPLC) of analysed compounds isolated from blood:  
1 – P, 2 – 2,4-DTBP, 3 – 2,6-DTBP, 4 – 2,6-DTB-4-MP (column Discovery® C<sub>18</sub>  
250×4.6 mm, eluent – buffer solution (pH 5.5) – acetonitrile (30:70))

дважды по 30 мин обрабатывали порциями (50 см<sup>3</sup> каждая) бинарного экстрагента ацетон-этилацетат (1:1) (по объёму).

Экстракты пропускали сквозь слой (высота 1.5 см, диаметр ≈ 4 см) Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, после чего сквозь него же пропускали 20 см<sup>3</sup> бинарного экстрагента ацетон-этилацетат (1:1). Объединив фильтраты и поместив в поток воздуха, их упаривали до 0.7-1.0 см<sup>3</sup>, после чего, поместив в поток азота, добивались полного удаления растворителей,

Остаток обрабатывали 2 см<sup>3</sup> системы вода – ацетонитрил (20:80), вводили раствор в колонку (150×10 мм) сорбента «Силасорб C<sub>18</sub>», элюировали смесью растворителей вода – ацетонитрил (20:80). Элюат собирали по 2 см<sup>3</sup> в отдельные пробирки. Порции аналита, содержащие тот или иной ди-*трет*-бутилфенол, сливали в фарфоровую чашку, обрабатывали 0.4 см<sup>3</sup> 1%-ого раствора NaOH, помещали в поток воздуха комнатной температуры и удаляли растворители. Остаток растворяли в 1.8 см<sup>3</sup> бинарной системы диэтиловый эфир – HCl конц. (92:8), вводили туда 0.5 г Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и, используя поток азота, удаляли жидкую часть раствора. Растворив остаток в 5 см<sup>3</sup> ацетонитрила, получали раствор для анализа.

**ТСХ.** 0.4 см<sup>3</sup> раствора для анализа помещали на поверхность сорбента (модель привитой фазы C<sub>14</sub>-C<sub>15</sub>). Определение проводили, элюируя смесью вода-ацетонитрил (40:60). Аналиты идентифицировали по величине R<sub>f</sub> после обнаружения их пятен в УФ-свете.

**ВЭЖХ.** 2.5 см<sup>3</sup> раствора для анализа смешивали с 5.5 см<sup>3</sup> ацетонитрила в мерной колбе на 10 см<sup>3</sup> и доводили до метки ацетатным буфером (pH 5.5). 2 мкл образующегося раствора подвергали хроматографированию, элюируя системой ацетатный буферный раствор (pH 5.5) – ацетонитрил (30:70) со скоростью 1 см<sup>3</sup>/мин, регистрируя оптическую плотность при 280 нм. Хроматограмма смеси ди-*трет*-бутилфенолов, выделенных из крови, изображена на рис. 3. С этой хроматограммой практически совпадает хроматограмма смеси аналитов, выделенных из плазмы с той лишь разницей, что интенсивность сигнала в области 2.0±0.5 мин, обусловленного остатками эндогенных веществ биоматрицы, заметно ниже.

Идентификация аналитов проводилась по времени (объёму) удерживания. Предел обнаружения в 1 г биоматриц составляет 3.0·10<sup>-6</sup> г (кровь) и 2.0·10<sup>-6</sup> г (плазма) для 2,4-ДТБФ, 5.0·10<sup>-6</sup> г (кровь) и 3.0·10<sup>-6</sup> г (плазма) для 2,6-ДТБФ, 1.0·10<sup>-6</sup> г

Таблица 5. Валидация методик по показателям правильности и прецизионности  
 Table 5. Validation of methods by accuracy and precision

Биоматрица	Аналит	Добавлено аналита в биоматрицу, г/г	Определено							
			в первый день				в последующий день			
			$\bar{x}$ (n=5), г/г	S	S <sub>r</sub> , %	ε, %	$\bar{x}$ (n=5), г/г	S	S <sub>r</sub> , %	ε, %
Кровь	2,4-ДТБФ	2.4·10 <sup>-5</sup>	2.549·10 <sup>-5</sup>	8.010·10 <sup>-7</sup>	3.15	6.21	2.536·10 <sup>-5</sup>	7.704·10 <sup>-7</sup>	3.02	5.66
		2.0·10 <sup>-4</sup>	2.167·10 <sup>-4</sup>	4.749·10 <sup>-6</sup>	2.19	8.34	2.192·10 <sup>-4</sup>	4.362·10 <sup>-6</sup>	2.27	-4.05
		3.6·10 <sup>-4</sup>	3.724·10 <sup>-4</sup>	7.141·10 <sup>-6</sup>	1.92	3.44	3.350·10 <sup>-4</sup>	6.808·10 <sup>-6</sup>	2.03	-6.95
	2,6-ДТБФ	3.6·10 <sup>-5</sup>	3.405·10 <sup>-5</sup>	9.602·10 <sup>-7</sup>	2.83	-5.43	4.052·10 <sup>-5</sup>	1.211·10 <sup>-6</sup>	2.98	12.56
		2.4·10 <sup>-4</sup>	2.562·10 <sup>-4</sup>	6.230·10 <sup>-6</sup>	2.43	6.75	2.596·10 <sup>-4</sup>	6.619·10 <sup>-6</sup>	2.55	8.18
		4.8·10 <sup>-4</sup>	4.454·10 <sup>-4</sup>	9.862·10 <sup>-6</sup>	2.21	-7.21	4.845·10 <sup>-4</sup>	1.032·10 <sup>-5</sup>	2.13	0.95
	2,6-ДТБ-4-МФ	6.0·10 <sup>-6</sup>	6.769·10 <sup>-6</sup>	2.406·10 <sup>-7</sup>	3.55	12.81	6.522·10 <sup>-6</sup>	2.217·10 <sup>-7</sup>	3.40	8.70
		1.6·10 <sup>-3</sup>	1.727·10 <sup>-3</sup>	4.193·10 <sup>-5</sup>	2.43	7.95	1.763·10 <sup>-3</sup>	4.152·10 <sup>-5</sup>	2.36	10.16
		3.2·10 <sup>-3</sup>	3.420·10 <sup>-3</sup>	7.240·10 <sup>-5</sup>	2.12	6.87	2.879·10 <sup>-3</sup>	6.280·10 <sup>-5</sup>	2.18	-10.02
Плазма	2,4-ДТБФ	1.2·10 <sup>-5</sup>	1.296·10 <sup>-5</sup>	4.001·10 <sup>-7</sup>	2.84	8.02	1.141·10 <sup>-5</sup>	3.303·10 <sup>-7</sup>	2.91	-4.95
		1.6·10 <sup>-4</sup>	1.674·10 <sup>-4</sup>	3.068·10 <sup>-6</sup>	1.83	4.63	1.715·10 <sup>-4</sup>	3.376·10 <sup>-6</sup>	1.97	7.20
		3.0·10 <sup>-4</sup>	3.189·10 <sup>-4</sup>	5.590·10 <sup>-6</sup>	1.75	6.31	2.953·10 <sup>-4</sup>	4.890·10 <sup>-6</sup>	1.66	-1.57
	2,6-ДТБФ	3.6·10 <sup>-5</sup>	3.765·10 <sup>-5</sup>	9.603·10 <sup>-7</sup>	2.56	4.57	3.896·10 <sup>-5</sup>	1.051·10 <sup>-6</sup>	2.71	8.22
		2.4·10 <sup>-4</sup>	2.568·10 <sup>-4</sup>	5.857·10 <sup>-6</sup>	2.28	6.98	2.511·10 <sup>-4</sup>	5.553·10 <sup>-6</sup>	2.21	4.63
		4.8·10 <sup>-4</sup>	4.908·10 <sup>-4</sup>	9.532·10 <sup>-6</sup>	1.94	2.25	4.499·10 <sup>-4</sup>	1.076·10 <sup>-5</sup>	2.39	-6.26
	2,6-ДТБ-4-МФ	6.0·10 <sup>-6</sup>	6.578·10 <sup>-6</sup>	2.170·10 <sup>-7</sup>	3.30	9.64	6.639·10 <sup>-6</sup>	2.129·10 <sup>-7</sup>	3.21	10.65
		1.6·10 <sup>-3</sup>	1.708·10 <sup>-3</sup>	3.683·10 <sup>-5</sup>	2.16	6.73	1.728·10 <sup>-3</sup>	4.082·10 <sup>-5</sup>	2.36	8.02
		3.2·10 <sup>-3</sup>	3.513·10 <sup>-3</sup>	6.974·10 <sup>-5</sup>	1.99	9.78	2.992·10 <sup>-3</sup>	6.395·10 <sup>-5</sup>	2.14	-6.49

(кровь) и 1.0·10<sup>-6</sup> г (плазма) для 2,6-ДТБ-4-МФ.

Количество аналитов, присутствующих в биожидкостях, рассчитывали, исходя из площади пика, по уравнениям соответствующих градуировочных графиков.

Разработанные методики валидировали по критериям линейности, селективности, стабильности.

Результаты валидации по критериям правильности и прецизионности отражены в табл. 5.

### Заключение

Изучено хроматографическое поведение ряда ди-*трет*-бутилфенолов в тонком слое и колонках обращённо-фазовых сорбентов.

Выявлена связь хроматографической активности выбранной группы ди-*трет*-бутилпроизводных фенола с особенностями химической структуры аналитов, компонентным составом подвижных фаз и долей органического составляющего в них.

Рассмотренные методы хроматографии применимы для очистки аналитов, их идентификации и оценки количественного содержания. Выполненные эксперименты явились основой для разработки методик определения исследуемых веществ в биожидкостях. Методики соответствуют валидационным требованиям,

принятым в области биологического анализа. Пределы обнаружения ди-*трет*-бутилфенолов разработанными методиками в 1 г крови составляют  $(1.8-8.0) \cdot 10^{-6}$  г (для ТСХ) и  $(1.0-5.0) \cdot 10^{-6}$  г (для ВЭЖХ), в 1 г плазмы –  $(1.6-5.0) \cdot 10^{-6}$  г (для ТСХ) и  $(1.0-3.0) \cdot 10^{-6}$  г (для ВЭЖХ).

Разработанные методики могут применяться в химико-токсикологическом анализе ди-*трет*-бутилфенолов для доказательства фактов отравления данными соединениями.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет известных финансовых конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.

### Список литературы/References

1. Chuah T.S., Norhafizah M.Z., Ismail B.S. Evaluation of the biochemical and physiological activity of the natural compound, 2,4-ditert-butylphenol on weeds. *Crop and Pasture Science*. 2015; 66(2): 214-223. <https://doi.org/10.1071/CP13386>

2. Butylated hydroxytoluene. PubChem. Open chemistry database. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Butylated-hydroxytoluene> (accessed 30 January 2022).

3. Yehye W.A., Rahman N.A., Ariffin A., Abd Hamid S.B., Alhadi A.A., Kadir F.A., Yaeghoobi M. Understanding the chemistry behind the antioxidant activities of butylated hydroxytoluene (BHT): A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2015; 101: 295-312. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.06.026>

4. Zhou Z., Wu J., Liu K., Tao W., Liu Y., Yang M. Electrochemical Behavior of the Antioxidant 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol in an Electrolyte Containing Transformer Oils. *CSJ Journals*. 2017; 46(3): 323-326. <https://doi.org/10.1246/cl.161003>

5. Farajzadeh M.A., Goushjuui L., Ranji A., Feyz E. Spectrophotometric determination of Irgafos 168 in polymers after different sample preparation procedures. *Microchim Acta*. 2007; 159(3): 263-268. <https://doi.org/10.1007/s00604-006-0721-8>

6. Camacho W., Karlsson S. Quantification of antioxidants in polyethylene by near infrared (NIR) analysis and partial least squares (PLS) regression. *Inter. J. Polym. Anal. Character*. 2002; 7(1-2): 41-51. <https://doi.org/10.1080/10236660214597>

7. Krushevska A.P., Klimash J., Smith J.F., Williams E.A., McCloskey P.J., Ravikumara V. Determination of phosphorus in polymeric systems using an ashing procedure and inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *J. Anal. At Spectrom*. 2004; 19(9): 1186-1191. <https://doi.org/10.1039/B402000F>

8. Belghit S., Driche E.H., Bijani C., Zitouni A., Sabaou N., Badji B., Mathieu F. Activity of 2,4-Di-tert-butylphenol produced by a strain of *Streptomyces mutabilis* isolated from a Saharan soil against *Candida albicans* and other pathogenic fungi. *J. Mycol. Med*. 2016; 26(2): 160-169. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2016.03.001>



9. Hirata-Koizumi M., Hamamura M., Furukawa H., Fukuda N., Ito Y., Wako Y., Yamashita K., Takahashi M., Kamata E., Ema M., Hasegawa R. Elevated susceptibility of newborn as compared with young rats to 2-tert-butylphenol and 2,4-di-tert-butylphenol toxicity. *Congenit Anom.* 2005; 45(4): 146-153. <https://doi.org/10.1111/j.1741-4520.2005.00084.x>

10. Shormanov V.K., Astashkina A.P., Ostanin M.A., Grishechko O.I., Tsatsua E.P. The specific features of the distribution of 4-metoxyhydroxybenzene in the organism of

the warm-blooded animals suffering lethal intoxication. *Sudebno-Meditsinskaya Ekspertisa.* 2016; 59(4): 48-53. <https://doi.org/10.17116/sudmed201659448-53> (In Russ.).

11. Shormanov V.K., Pugacheva O.I., Astashkina A.P., Tsatsua E.P. The specific features of the distribution of 2,6-di-tert-butyl-4-methylhydroxybenzole in the organism of the warm-blooded animals. *Sudebno-Meditsinskaya Ekspertisa.* 2016; 59(1): 29-34. <https://doi.org/10.17116/sudmed201659129-34> (In Russ.).

### Информация об авторах / Information about the authors

**А.П. Чернова** – к.х.н., доцент отделения химической инженерии Инженерной школы природных ресурсов Национального исследовательского Томского политехнического университета, Томск, Россия

**В.К. Шорманов** – д.ф.н., профессор кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии Курского государственного медицинского университета, Курск, Россия

**Е.П. Цацуа** – аспирант кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии Курского государственного медицинского университета, Курск, Россия

**О.И. Пугачёва** – заочный аспирант кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии Курского государственного медицинского университета, Курск, Россия

**О.В. Тарасова** – к.ф.н., доцент кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии Курского государственного медицинского университета, Курск, Россия

**A.P. Chernova** – Candidate of Chemical Sciences, Associate Professor of the Department of Chemical Engineering of the Faculty of Engineering of Natural Resources National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russian Federation, E-mail: [apa2004@mail.ru](mailto:apa2004@mail.ru)

**V.K. Shormanov** – Doctor of Pharmacy, professor of the department of pharmaceutical, toxicological and analytical chemistry, Kursk State Medical University, Kursk, Russian Federation, E-mail: [R-WLADIMIR@yandex.ru](mailto:R-WLADIMIR@yandex.ru)

**E.P. Tsatsua** – postgraduate student of the Department of Pharmaceutical, Toxicological and Analytical Chemistry, Kursk State Medical University, Kursk, Russian Federation, e-mail: [tsatsua-elena@yandex.ru](mailto:tsatsua-elena@yandex.ru)

**O.I. Pugacheva** – correspondence post-graduate student of the Department of Pharmaceutical, Toxicological and Analytical Chemistry, Kursk State Medical University, Kursk, Russian Federation, E-mail: [lnpugacheva@yandex.ru](mailto:lnpugacheva@yandex.ru)

**O.V. Tarasova** – Candidate of Pharmaceutical Sciences, Associate Professor of the Department of Pharmaceutical, Toxicological and Analytical Chemistry, Kursk State Medical University, Kursk, Russian Federation, E-mail: [tarasova\\_olga\\_kursk@mail.ru](mailto:tarasova_olga_kursk@mail.ru)

Статья поступила в редакцию 27.12.2022; одобрена после рецензирования 21.03.2023; принята к публикации 22.03.2023.

The article was submitted 27.12.2022; approved after reviewing 21.03.2023; accepted for publication 22.03.2023.