

Цаца Елена Паатовна

**ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ПРОИЗВОДНЫХ АЛКИЛ- И
АЛКЕНИЛФЕНОЛОВ**

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Москва – 2019

Диссертационная работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России)

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук,
профессор

Шорманов Владимир Камбулатович

Официальные оппоненты:

Калёкин Роман Анатольевич, доктор фармацевтических наук, главный научный сотрудник лаборатории судебно-химических и химико-токсикологических научных и экспертных методов исследования Российского центра судебно-медицинской экспертизы Министерства здравоохранения РФ

Мельникова Нина Борисовна, доктор химических наук, профессор, заведующая кафедрой фармацевтической химии и фармакогнозии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится « 30 » января 2020 г. в 14.00 часов на заседании диссертационного совета ПДС 0300.001 при ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» по адресу: 117198, ул. Миклухо-Маклая, д.6.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» по адресу: 117198, ул. Миклухо-Маклая, д.6 и на сайте <http://dissovet.rudn.ru>

Автореферат разослан « _____ » _____ 2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета ПДС 0300.001
доктор фармацевтических наук, доцент, доцент кафедры
фармацевтической и токсикологической химии
медицинского института РУДН

Успенская Е.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В последнее время большое внимание уделяется лекарственным формам, обладающим антиоксидантной активностью. К ним относятся современные новые лекарственные препараты производные алкил- и алкенилфенолов, широко применяемые в качестве антиоксидантного, антигипоксического, противовоспалительного, регенерирующего, противоопухолевого средства.

Алкильное производное фенола (дибунол) в форме 10 % линимента используется в медицине как средство для лечения рака и папилломатоза мочевого пузыря в предоперационный период, для лечения поверхностных ожогов различного генеза, обморожения I-II степени, язв различной этиологии. В.А. Быков с соавторами, описал применение дибунола в гинекологии.

Высокая фармакологическая активность производных алкил- и алкенилфенолов, таких как 2,4-ди-трет-бутилгидроксibenзола (в дальнейшем 2,4-ДТБГОБ), 2,6-ди-трет-бутилгидроксibenзола (в дальнейшем 2,6-ДТБГОБ) и 2-метокси-4-(1-пропенил)гидроксibenзола (в дальнейшем 2-МО-4-(1-П)ГОБ)) – структур природного и синтетического происхождения, обладающих биологической активностью и проявляющих свойства антиоксидантов, радиопротекторов, антисептиков делает актуальными исследования, направленные на разработку новых лекарственных форм исследуемых соединений, а также создает предпосылки для разработки современных методов анализа и изучения фармакологической активности, что позволит расширить область клинического применения данных антиоксидантов.

2,4-ДТБГОБ, 2,6-ДТБГОБ и 2-МО-4-(1-П)ГОБ также проявляют свойства ингибиторов ряда ферментов, применяются как полупродукты органических синтезов фармакологически активных веществ, пестицидов, ПАВ, синтетических смол, пластификаторов и стабилизаторов и других групп ценных веществ.

S. Belghit (2016) в своей научной работе приводит данные об активности 2,4-ДТБГОБ, продуцируемого штаммом бактерий *Streptomyces mutabilis*, выделенных из почвы пустыни Сахары в отношении *Candida albicans* и других патогенных грибов.

Китайский лимонник произрастающий в Китае на рисовых полях развил устойчивость к различным группам гербицидов. В поисках природных гербицидов были изучены фитотоксичные свойства растения *Pennisetum purpureum*. Из данного растения было выделено соединение 2,4-ДТБГОБ который оказал гербицидное действие, полностью подавляя рост китайского лимонника как сорняка.

T.S. Chuah (2015) показал, что 2,4-ДТБГОБ может применяться в качестве гербицида для подавления роста китайского лимонника и других сорняков, произрастающих на рисовых полях.

H.C. Wang (2011), B.K. Hyun (2011), L.K. Groebler (2012) описаны перспективные исследования по применению бис- производного 2,6-ДТБГОБ в качестве антиоксиданта в медицине. Так, обработка данным веществом нервных клеток снижала окислительный стресс за счет захвата активных форм кислорода/азота и подавленной экспрессии гена фактора, индуцируемого гипоксией у крыс. Повышение содержания данного производного в плазме и тканях крысы приводило к спаду окислительного повреждения в почках, в результате понижения воспалительного процесса, что свидетельствует о высоком эффекте низкомолекулярных антиоксидантов в защите сосудистой и почечной тканей от разрушающего воздействия.

Он также является полупродуктом химического и биотехнологического синтеза ванилина. B.S. Rayner (2006), T.T. Hong Duong (2008) описали применение производного 2,6-ДТБГОБ для защитного действия от запрограммированной гибели нервных клеток, а также для снижения окислительного стресса. В модели острого инсульта у животных фармакологическая доза антиоксиданта подавляла гибель нервных клеток после экспериментально вызванной дисфункции.

Патенты зарубежных ученых (S.I. Lerner, 1978; R.O. Stocker, 2010) подтверждают использование 2,6-ДТБГОБ и его производных в препаратах для лечения сердечно-сосудистых заболеваний.

S.N. Prasad (2013) приводит данные о возможности использования 2-МО-4-(1-П)ГОБ для лечения энцефалопатий различной этиологии. Самостоятельно и в виде комбинаций с другими 2-МО-4-(1-П)ГОБ применяется в качестве противомикробного средства для поддержания свежести пищевых продуктов, в парфюмерной и косметической промышленности.

Рассматриваемые соединения, как и многие другие алкил- и алкенилфенолы, помимо своих антиоксидантных свойств проявляют также и токсические свойства в отношении теплокровных. Значения LD₅₀ 2,4-ДТБГОБ, 2,6-ДТБГОБ и 2-МО-4-(1-П)ГОБ для крыс при пероральном способе введения составляют соответственно 2400 мг/кг, 1320 мг/кг и 1560 мг/кг.

Описаны отравления тяжелой степени людей веществами из группы алкил- и алкенилгидроксibenзолов и их смесями, в том числе с летальным исходом.

В связи с этим особый интерес представляют исследования по разработке способов изолирования рассматриваемых веществ из биообъектов, их качественное и количественное

определение, распределение и сохраняемость в биологическом материале, что позволяет не только усовершенствовать и модифицировать известные методы анализа, но и предложить новые подходы в решении обсуждаемых проблем. Эти исследования можно охарактеризовать как комплексное направление в их практическом использовании в химико-фармацевтическом анализе, в технологических процессах и судебно-медицинской экспертизе.

Уровень проведенного изучения разрабатываемой темы. На настоящий момент в отечественных и зарубежных литературных источниках весьма ограничено представлены данные по вопросам изолирования рассматриваемых алкил- и алкенилпроизводных гидроксibenзола из трупных органов и крови, их очистки от эндогенных примесей, идентификации и оценки количественного содержания в извлечениях. Остаются мало изученными особенности распределения 2,4-ДТБГОБ, 2,6-ДТБГОБ и 2-МО-4-(1-П)ГОБ в теплокровных организмах. Практически отсутствуют сведения по сохраняемости данной группы веществ в биологических матрицах.

Исходя из всего вышеописанного, проведение исследований в области химико-токсикологического анализа рассматриваемых алкил- и алкенилпроизводных гидроксibenзола представляется актуальным.

Цель исследования. Разработка схемы химико-токсикологического исследования 2,4-ДТБГОБ, 2,6-ДТБГОБ и 2-МО-4-(1-П)ГОБ.

Задачи исследования. Достижение поставленной цели становилось возможным благодаря решению следующих задач:

1. Установить характер хроматографической активности изучаемых алкил- и алкенилфенолов при использовании методов жидкостной хроматографии и метода газо-жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией. Изучить особенности поглощения электромагнитного излучения исследуемыми соединениями и продуктами их взаимодействия с цветообразующими реагентами в различных областях спектра.

2. Разработать методики идентификации и количественного определения 2,4-ДТБГОБ, 2,6-ДТБГОБ и 2-МО-4-(1-П)ГОБ на основе цветных реакций, методами спектрофотометрии, хроматографии и масс-спектрометрии.

3. Рассмотреть особенности изолирования исследуемых алкил- и алкенилфенолов из биологического материала животного происхождения в режиме настаивания с различными жидкостями полярной и неполярной природы, разработать схему очистки извлечений.

4. Разработать методики определения рассматриваемых соединений в различных видах плотных и жидких биологических матриц фотометрическими и хроматографическими методами с использованием предлагаемых способов изолирования и очистки.

5. Изучить специфику распределения 2,4-ДТБГОБ, 2,6-ДТБГОБ и 2-МО-4-(1-П)ГОБ в органах и биологических жидкостях теплокровных организмов при введении им летальных доз аналитов.

6. Исследовать сохраняемость соединений рассматриваемой группы в разлагающемся трупном материале при различных температурах.

Научная новизна. Впервые изучены закономерности хроматографического поведения 2,4-ДТБГОБ, 2,6-ДТБГОБ и 2-МО-4-(1-П)ГОБ, как потенциальных объектов дальнейшего применения в фармацевтической промышленности, в тонких слоях и колонках сорбентов с гидроксильной и привитой поверхностями при использовании элюирующих жидкостей различной полярности. Выявлены наилучшие условия и рассчитаны параметры хроматографирования исследуемых соединений с использованием методов ТСХ, ГХ-МС и ВЭЖХ. По результатам предварительных исследований были разработаны методики идентификации и количественного определения 2,4-ДТБГОБ, 2,6-ДТБГОБ и 2-МО-4-(1-П)ГОБ методами ТСХ, ГХ-МС и ВЭЖХ.

Определены особенности электронных и колебательных спектров поглощения для всех исследованных веществ. Для увеличения селективности качественной идентификации методом спектрофотометрии были рассчитаны основные оптические характеристики электронных спектров.

Были разработаны методики качественного определения исследуемых соединений, основанные на предложенных цветных реакциях по окрашенным продуктам.

Впервые для изолирования 2,4-ДТБГОБ, 2,6-ДТБГОБ и 2-МО-4-(1-П)ГОБ из биологического материала обосновано использование этилацетата в качестве изолирующего агента. Основываясь на применении в качестве изолирующего агента данного растворителя и очистки методами хроматографии в тонких слоях или колонках нормальнофазовых и обращеннофазовых сорбентов, впервые стало возможным разработать оригинальные методики определения изучаемых соединений в тканях трупных органов и биожидкостях, которые можно применить как для исследования свежего, так и гнилостного трупного материала. Проведена валидация методик определения рассматриваемых аналитов в биоматрицах с применением методов спектрофотометрии и ВЭЖХ.

Используя разработанные методики, в экспериментах на всеядных животных (крысы) были исследованы характеристики распределения 2,4-ДТБГОБ, 2,6-ДТБГОБ и 2-МО-4-(1-П)ГОБ в теплокровных организмах.

Определены сроки сохраняемости рассматриваемых веществ в гнилостно разлагающемся трупном материале в зависимости от температурных режимов сохранения.

Теоретическая значимость исследования. Проведённые в ходе выполнения диссертации исследования позволили получить новые данные о физико-химических и химико-токсикологических особенностях 2,4-ДТБГОБ, 2,6-ДТБГОБ и 2-МО-4-(1-П)ГОБ. Выявлены и обоснованы оптимальные условия изолирования рассматриваемых аналитов из биоматриц, их очистки, а также качественной и количественной оценки физико-химическими методами, валидированы методики определения исследуемых соединений с применением спектрофотометрии и ВЭЖХ в объектах биологического происхождения. Установлены особенности распределения рассматриваемых веществ в организме теплокровных и характер устойчивости аналитов в разлагающемся трупном материале в зависимости от температуры сохранения.

Практическое значение работы. В результате полученных результатов и сделанных обобщений была разработана оригинальная схема определения производных алкил- и алкенилфенолов при химико-токсикологическом исследовании биологического материала, характеризующаяся необходимыми аналитическими параметрами и позволяющая обеспечить объективность и надёжность доказательства отравлений рассматриваемой группой токсичных соединений. Стало возможным обоснование выбора органов и тканей – наиболее целесообразных биологических объектов исследования, а также определение сроков, в течение которых целесообразно проведение исследования трупного материала на присутствие рассматриваемых веществ.

Личный вклад автора. Лично автором выбрана научная тематика и сформулирована цель исследования. Он проанализировал широкий спектр публикаций по теме диссертации и обоснована актуальность выбранной тематики. Автор принимал непосредственное участие в планировании и выполнении экспериментов в рамках решения задач исследования. Им проведён детальный анализ полученных результатов и сделаны основные выводы и обобщения. При подготовке и написании научных трудов по теме диссертации участие автора является преобладающим.

Внедрение результатов работы:

- методика изолирования 2,4-ди-трет-бутилгидроксибензола и 2,6-ди-трет-бутилгидроксибензола из крови этилацетатом и определения методами ТСХ и УФ-спектрофотометрии (акт внедрен в работу Экспертно-криминалистического центра УМВД по Орловской области; акт внедрения от 27 мая 2016 года);

- методика изолирования 2,4-ди-трет-бутилгидроксибензола и 2,6-ди-трет-бутилгидроксибензола из плазмы крови этилацетатом и определения методами ТСХ и УФ-спектрофотометрии (акт внедрен в работу Экспертно-криминалистического центра УМВД по Орловской области; акт внедрения от 27 мая 2016 года);

- методика идентификации 2,4-ди-трет-бутилгидроксибензола и 2,6-ди-трет-бутилгидроксибензола в извлечениях из биологического материала и небιологических вещественных доказательств методом ИК-спектроскопии (акт внедрен в работу Экспертно-криминалистического центра УМВД по Орловской области; акт внедрения от 8 июня 2016 года);

- методика изолирования 2-метокси-4-(1-пропенил)гидроксибензола (2-МО-4-(1-П)ГОБ, изоэвгенола) из ткани печени этилацетатом и определения методами ТСХ и УФ-спектрофотометрии после очистки в колонке гидроксилированного сорбента (акт внедрен в учебную (практические занятия) и научную работу на кафедре фармацевтической, токсикологической и аналитической химии ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава РФ; акт внедрения от 15 апреля 2016 года);

- методика изолирования 2,4-ди-трет-бутилгидроксибензола и 2,6-ди-трет-бутилгидроксибензола из ткани печени этилацетатом и определения методами ТСХ и УФ-спектрофотометрии (акт внедрен в учебную (практические занятия) и научную работу на кафедре фармацевтической, токсикологической и аналитической химии ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава РФ; акт внедрения от 21 апреля 2016 года);

- методика очистки 2-метокси-4-(1-пропенил)гидроксибензола (изоэвгенола), извлекаемого из объектов растительного и животного происхождения, на основе применения хроматографии в колонке силикагеля (акт внедрения в научную работу на кафедре фармакогнозии и ботаники ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава РФ; акт внедрения от 20 мая 2016 года);

- методика изолирования 2-метокси-4-(1-пропенил)гидроксибензола (изоэвгенола) из крови этилацетатом и определения методами ТСХ и УФ-спектрофотометрии после очистки в колонке гидроксилированного сорбента (акт внедрен в учебную (практические занятия) и научную работу на кафедре фармацевтической химии и фармацевтической технологии ФГБОУ ВО ВГМУ Минздрава РФ; акт внедрения от 12 мая 2016 года);

- методика идентификации 2-метокси-4-(1-пропенил)гидроксибензола (изоэвгенола) и ряда близких по структуре и свойствам биологически активных соединений сочетанием методов хроматографии в тонком слое нормальнофазового сорбента и электронной спектрофотометрии (акт внедрения в учебную (практические занятия) и научную работу на кафедре фармацевтической химии и фармацевтической технологии ФГБОУ ВО ВГМУ Минздрава РФ; акт внедрения от 12 мая 2016 года);

- методика очистки 2,4-ди-трет-бутилгидроксибензола и 2,6-ди-трет-бутилгидроксибензола методом нормальнофазовой колоночной хроматографии (акт внедрения в учебную (практические занятия) и научную работу на кафедре

фармацевтической химии и фармакогнозии ФГАОУ ВО БГНИУ Минздрава РФ; акт внедрения от 14 июня 2016 года);

- методика очистки 2-МО-4-(1-П)ГОБ (изоэвгенола) методом нормальнофазовой колоночной хроматографии (акт внедрения в учебную (практические занятия) и научную работу на кафедре фармацевтической химии и фармакогнозии ФГАОУ ВО БГНИУ Минздрава РФ; акт внедрения от 14 июня 2016 года);

Методологические аспекты и способы исследования.

Методологической основой выполненного квалификационного исследования служили нормативные документы, имеющие обращение в сфере фармацевтического и химико-токсикологического анализа (фармакопейные статьи, информационные письма, методические рекомендации МЗ РФ), а также научные труды отечественных [В.К. Шорманов, 2004; Е.А. Сухомлинова, 2008; Е.М. Саломатин, 2012] и зарубежных [F. Beaudry, S. Annie, G.P. Vachon, 2006; J.R. Meinertz, T.M. Schreier, J.A. Bernardy, 2008] ученых. При выполнении диссертации применялся широкий спектр современных методов анализа (экстракция в режиме инфузии, электронная и колебательная спектрофотометрия, ТСХ, жидкостная колоночная хроматография обычного давления и ВЭЖХ, сочетание капиллярной газо-жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ГХ-МС).

В процессе выполнения диссертационной работы применялись методы спектрофотометрии, высокоэффективной жидкостной хроматографии, жидкостной колоночной хроматографии низкого давления и тонкослойной хроматографии.

Основные положения, выдвигаемые на защиту:

- данные результатов проведенных испытаний хроматографической активности рассматриваемых алкил- и алкенилгидроксibenзолов в тонких слоях и колонках сорбентов;
- характерные особенности поглощения электромагнитного излучения объектами исследования в ультрафиолетовой и инфракрасной спектральных зонах;
- условия и механизмы взаимодействия изучаемых соединений с цветообразующими реагентами;
- способы качественного и количественного определения анализируемых веществ на основе применения методов хроматографии, спектрофотометрии и хромато-масс-спектрометрии;
- результаты исследования особенностей препаративного хроматографирования и моделирование схем очистки аналитов в тонких слоях и колонках сорбентов;
- возможные пути и условия извлечения исследуемых объектов из биологического материала и очистки их от сопутствующих веществ биоматриц;
- методики определения 2,4-ДТБГОБ, 2,6-ДТБГОБ и 2-МО-4-(1-П)ГОБ в биологических объектах и их валидация;

- особенности распределения исследуемых алкил- и алкенилпроизводных гидроксibenзола в органах и биожидкостях теплокровных организмов при отравлениях летальными дозами аналитов;
- результаты изучения сохраняемости исследуемой группы соединений в разлагающемся трупном материале.

Достоверность научных положений и выводов. В процессе выполнения диссертации получен значительный объём экспериментальных исследований. Для достижения достаточного уровня достоверности итоговых результатов применялись современные и высокотехнологичные методы исследования. Большая часть исследования оформлена и представлена в таблицах, графиках и рисунках. Расчет валидационных и статистических характеристик разработанных методик проводили в соответствии с требованиями ГФ XI, методических рекомендаций по валидации аналитических методик, используемых в судебно-химическом и химико-токсикологическом анализе биологического материала, и осуществляли на основе компьютерной программы «Microsoft Excel 2012».

Апробация результатов исследования. Основные положения выполненного исследования апробированы в форме публикаций и докладов на:

- Международной научно-практической конференции «Проблемы современной медицины: актуальные вопросы» (Красноярск, 2014 г.);
- V Международной научно-практической конференция: «Научные перспективы XXI века. Достижения и перспективы нового столетия» Международный научный институт «Educatio» (Новосибирск, 2014 г.);
- VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Биомедицинская инженерия и биотехнология» (Курск, 2015 г.);
- 80-й Всероссийской научной конференции студентов и молодых учёных с международным участием «Молодёжная наука и современность» (Курск, 2015 г.);
- 81-й Всероссийской научной конференции студентов и молодых учёных с международным участием «Молодёжная наука и современность» (Курск, 2016 г.);
- Международной научно-практической конференции «Аналитическая химия в фармации» (Харьков, 2016 г.);
- 6-й Международной научно-практической телеконференции «Фармацевтический кластер как интеграция науки, образования и производства» (Белгород, 2016 г.);
- III Международной научно-практической конференции «Основные проблемы в современной медицине» (Волгоград, 2016 г.);
- III Международной научно-практической конференции «Перспективы развития современной медицины» (Воронеж, 2016 г.);

- Международной научно-практической конференции «Научные исследования в области медицины и фармакологии» (Саратов, 2017 г.).

Согласованность задач исследования с проблемами фармацевтических наук.

Диссертационное исследование реализовано в связи с планом научных и исследовательских работ кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии Курского государственного медицинского университета и в полной мере отвечает проблеме «Фармация» межведомственного научного совета N 36 РАМН и научной проблематике 35.04 «Научные проблемы судебно-медицинской токсикологии, токсикологической и судебной химии» по специальности «Судебная медицина» при РАМН. Номер государственной регистрации 01201157804.

Опубликованные работы. Основные результаты диссертации опубликованы в 12 работах, из которых 4 статьи в журнале, входящем в базы Scopus и WoS (BIOSIS), 1 – в журнале, представленном в международных реферативных базах Chemical Abstracts и WoS (BIOSIS).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Исследования диссертационной работы по изучению качественного и количественного определения анализируемых веществ на основе применения методов хроматографии, спектрофотометрии и хромато-масс-спектрометрии, особенностей препаративного хроматографирования и моделирование схем очистки аналитов в тонких слоях и колонках сорбентов, условий извлечения исследуемых объектов из биологического материала и очистки их от сопутствующих веществ биоматриц, методик определения 2,4-ДТБГОБ, 2,6-ДТБГОБ и 2-МО-4-(1-П)ГОБ в биологических объектах и проведению их валидации соответствуют формуле специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия»; полученные результаты соответствуют областям исследования специальности согласно пунктами 3 и 4 паспорта научной специальности.

Объём и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы (глава 1), экспериментальной части (главы 2, 3, 4, 5, 6), выводов, списка литературы, приложения. Материалы диссертации изложены на 209 страницах машинописного текста, содержат 56 рисунков, 62 таблицы. Библиографический список состоит из 281 источника, в том числе 172 – на иностранном языке.

Первая глава (обзор литературы) включает в себя известные и современные данные касательно 2,4-ДТБГОБ, 2,6-ДТБГОБ и 2-МО-4-(1-П)ГОБ как объектах химического и химико-токсикологического исследования.

Вторая глава посвящена вопросам идентификации объектов исследования спектральными, хроматографическими методами, а также на основе образования окрашенных продуктов.

В третьей главе приводятся экспериментальные данные по вопросам количественного определения анализируемых соединений.

Четвёртая глава включает в себя результаты изучения препаративного хроматографирования объектов исследования и моделирования схем очистки аналитов.

В пятой главе рассмотрены вопросы определения 2,4-ДТБГОБ, 2,6-ДТБГОБ и 2-МО-4-(1-П)ГОБ после изолирования этих веществ из биологического материала оптимальным изолирующим агентом.

В шестой главе приведены данные, полученные в результате изучения особенностей распределения рассматриваемых веществ в организме теплокровных и сохраняемости их в трупном материале.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Основными объектами диссертационного исследования явились: 2,4-ди-трет-бутилгидроксибензол (2,4-ДТБГОБ) (производство «Sigma-Aldrich chemistry» (США), содержание вещества не менее 99,0%); 2,6-ди-трет-бутилгидроксибензол (2,6-ДТБГОБ) (производство «Sigma-Aldrich chemistry» (США), содержание вещества не менее 99,0%); 2-метокси-4-(1-пропенил)гидроксибензол (2-МО-4-(1-П)ГОБ) (производство «Fluka» (Швеция), содержание вещества не менее 98 %).

Таблица 1 – Результаты хроматографирования объектов исследования методом нормальнофазовой ТСХ

Анализируемые вещества	Подвижные фазы и параметры хроматографирования											
	Гексан-ацетон (9,5:0,5)				Гексан-пропанол-1 (9,8:0,2)				Гексан-диоксан (9,5:0,5)			
	Rf	B	k'	N	Rf	B	k'	N	Rf	B	k'	N
2,4-ДТБГОБ	0,53	1,9	0,9	26 9	0,7 9	1,2 7	0,2 7	1764	0,6	1,6 7	0,6 7	1475
2,6-ДТБГОБ	0,78	1,2 8	0,2 8	73 7	0,9 4	1,0 7	0,0 7	1834	0,8 3	1,2 1	0,2 1	1089
2-МО-4-(1-П)ГОБ	0,31	3,2 5	2,2 5	14 4	0,6 5	1,5 4	0,5 4	534	0,4 1	2,4 2	1,4 2	121
2-МО-4-(2-П)ГОБ ¹	0,42	2,3 6	1,3 6	48 4	0,7 3	1,3 8	0,3 8	1495	0,5 1	1,9 5	0,9 5	420
ГОБ ²	0,49	2,0 5	1,0 5	47 2	0,5 0	2	1	521	0,3 5	2,8 6	1,8 6	348

1 – 2-метокси-4-(2-пропенил)гидроксибензол; 2 – гидроксибензол

Исследована хроматографическая подвижность аналитов в тонких слоях нормальнофазовых и обращённофазовых сорбентов соответственно на пластинах «Сорбфил» ПТСХ-АФ-А-УФ и пластинах «Сорбфил» ПТСХ-АФ-А-УФ, обработанных вазелиновым маслом (модель привитой фазы C₁₄-C₁₅). Для характеристики подвижности анализируемых

соединений рассчитаны значения R_f и R_s (относительно фенола), а также условное удерживание V , коэффициент емкости k' , число теоретических тарелок N . Результаты хроматографирования с использованием оптимальных подвижных фаз отражены в табл. 1 и 2.

Таблица 2 – Результаты хроматографирования объектов исследования методом обращённофазовой ТСХ

Анализируемые вещества	Подвижные фазы и параметры хроматографирования											
	Вода-ацетон (4:6)				Вода-ацетонитрил (6:4)				Буферный раствор с рН 9,91-ацетон (4:6)			
	R_f	V	k'	N	R_f	V	k'	N	R_f	V	k'	N
2,4-ДТБГОБ	0,28	3,64	2,64	484	0,14	7,09	6,09	77	0,29	3,44	2,44	324
2,6-ДТБГОБ	0,10	10,0	9,00	40	0,05	19,5	18,5	16	0,10	10,3	9,33	36
2-МО-4-(1-П)ГОБ	0,83	1,21	0,21	2788	0,83	1,21	0,21	2788	0,85	1,17	0,17	554
2-МО-4-(2-П)ГОБ	0,91	1,10	0,10	2368	0,91	1,10	0,10	2368	0,76	1,32	0,32	552
ГОБ	0,85	1,18	0,18	1509	0,50	2,00	1,00	973	0,55	1,82	0,82	739

1 – 2-метокси-4-(2-пропенил)гидроксибензол; 2 – гидроксибензол

Как свидетельствуют данные табл. 1 и 2, все приведённые подвижные фазы обеспечивают полное разделение исследуемых аналитов.

На основе полученных результатов в качестве подвижных фаз для определения рассматриваемых соединений методами нормальнофазовой и обращённофазовой ТСХ целесообразно использование систем растворителей соответственно гексан-ацетон (9,5:0,5) и буферный раствор с рН 9,91-ацетон (4:6).

Исследована хроматографическая подвижность данных алкил- и алкенил- фенолов в препаративных и аналитических колонках сорбентов, обладающих гидроксильной и привитой поверхностями.

По результатам хроматографирования рассматриваемых соединений методом нормальнофазовой макроколоночной хроматографии (сорбент L 40/100 мкм) с целью моделирования условий очистки аналитов в качестве элюентов использовали индивидуальные подвижные фазы диоксан-гексан (1,5:8,5) (для 2,4-ДТБГОБ, диоксан-гексан (0,25:9,75) для 2,6-ДТБГОБ, диоксан-гексан (3:7) для 2-МО-4-(1-П)ГОБ, а также наиболее универсальной подвижной фазой, позволяющей разделить все рассматриваемые вещества, явилась система растворителей диоксан-гексан (0,5:9,5).

Оптимальными элюентами для определения аналитов методом ВЭЖХ в колонке «Discovery® C18» 250×3,9 мм явились смеси ацетонитрила и ацетатного буфера с рН 5,5 (0,04М $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, CH_3COOH) в объёмных отношениях 70:30 (анализ 2,4- и 2,6-ДТБГОБ)

и 50:50 (анализ 2-МО-4-(1-П)ГОБ). Скорость элюента –1,0 мл/мин, температура колонки – 40°C, аналитическая длина волны – 280 нм.

Параметры, характеризующие данный вариант хроматографирования, представлены в табл. 3.

Таблица 3 – Значения параметров хроматографирования исследуемых соединений методом обращённофазовой ВЭЖХ

Исследуемое соединение	t_0	t_R	$V_{R, \text{мкл}}$	K'	N	$i_{\text{ВЭЖХ}}$
Подвижная фаза: ацетонитрил-ацетатный буферный раствор с pH 5,5 (70:30)						
ГОБ	3,10	4,700	4700	0,516	4398	13,750
2,4-ДТБГОБ	3,10	9,187	9187	1,964	9352	
2,6-ДТБГОБ	3,10	11,989	11989	2,867	11356	7,229
Подвижная фаза: ацетонитрил-ацетатный буферный раствор с pH 5,5 (50:50)						
Фенол	3,10	4,261	4261	0,375	1815	4,500
2-МО-4-(1-П)ГОБ	3,10	6,869	6869	1,216	1180	

На основе применения обращеннофазового варианта ВЭЖХ были разработаны методики количественного определения рассматриваемых соединений в субстанциях.

Графики линейны в диапазоне концентраций 0,01-4 мкг (2,4-ДТБГОБ и 2,6-ДТБГОБ) и 0,004-4 мкг (2-МО-4-(1-П)ГОБ) в хроматографируемой пробе. Коэффициенты корреляции составили более 0,99.

Изучены особенности поглощения электромагнитного излучения рассматриваемыми веществами в УФ- (при использовании растворяющих сред разной полярности) и ИК-областях спектра.

Рассчитаны некоторые оптические характеристики электронных спектров исследуемых соединений (табл. 4).

Как свидетельствуют полученные данные, все три объекта изучения в УФ-области спектра в интервале длин волн 190-360 нм характеризуются наличием двух выраженных полос: коротковолновой – с максимумами поглощения в области 204,1-249,6 нм и длинноволновой – в области 260,0-288,7 нм.

В ИК-спектрах исследуемых веществ присутствуют характеристические полосы поглощения, соответствующие колебаниям различных химических групп.

Разработаны методики количественного спектрофотометрического определения исследуемых соединений по поглощению ими УФ-излучения в среде 95% этанола.

В качестве идентификационного метода определения изучаемых соединений нами также использовалась газо-жидкостная хроматография в сочетании с масс-спектрометрией.

Таблица 4 – Отдельные оптические характеристики электронных спектров 2,4-ди-трет-бутилгидроксибензола (2,4-ДТБГОБ), 2,6-ди-трет-бутилгидроксибензола (2,6-ДТБГОБ) и 2-метокси-4-(1-пропенил)гидроксибензола (2-МО-4-(1-П)ГОБ)

Растворитель	2,4-ДТБГОБ			2,6-ДТБГОБ			2-МО-4-(1-П)ГОБ		
	λ_{\max} , нм	$\sum_{1\text{см}}^{1\%}$	ϵ	λ_{\max} , нм	$\sum_{1\text{см}}^{1\%}$	ϵ	λ_{\max} , нм	$\sum_{1\text{см}}^{1\%}$	ϵ
Хлороформ	280,1	178	2465	275,2	129	1785	265,9	1531	16988
Этанол	224,7	584	15258	224,3	501	13073	211,5	2233	46715
	280,0	124	3234	275,0	76	1979	260,0	1502	31427
Этилацетат	280,2	124	2831	275,3	81	1857	264,9	1334	24348
Ацетонитрил	209,2	631	16638	210,5	460	12130	265,1	1058	22366
	280,1	99	2598	275,0	59	1555	267,5	1050	17836
Диоксан	280,0	139	2757	274,5	104	2057	263,1	1355	21517
ДМФА	280,1	143	3110	274,6	73	1591	261,4	759	12457
Вода	206,4	-	-	206,8	-	-	204,1	1910	31370
	284,3	-	-	265,8	-	-	284,6	131	2152
0,1 н р-р NaOH	249,6	224	4585	222,7	-	-	204,9	834	13703
	288,7	77	1573	267,5	-	-	262,5	352	5776
0,1 н р-р HCL	207,8	-	-	207,3	-	-	211,5	2233	46715
	286,2	-	-	268,4	-	-	265,9	1531	16988

В результате использования предлагаемых условий хроматографирования и получения масс-спектров выходящих из колонки веществ, опытные вещества можно надёжно идентифицировать по значениям времени удерживания и особенностям масс-спектров.

На основе исследования хроматографической активности 2,4-ДТБГОБ, 2,6-ДТБГОБ и 2-МО-4-(1-П)ГОБ в колонках и тонких слоях сорбентов моделировались схемы очистки аналитов от соэкстрактивных веществ биоматериала методами макроколоночной жидкостной хроматографии низкого давления и ТСХ.

В процессе моделирования схем очистки установлено, что потери веществ в рассмотренных случаях незначительны.

В опытах с контрольными образцами биоматериала показана достаточная эффективность очистки извлечений методами ТСХ и колоночной хроматографии.

В процессе разработки вариантов пробоподготовки для определения 2,4-ДТБГОБ, 2,6-ДТБГОБ и 2-МО-4-(1-П)ГОБ в биологических матрицах животного происхождения в сравнительном аспекте изучено изолирование аналитов из биоматериала в режиме настаивания с жидкими изолирующими агентами, относящимися к органическим соединениям различных классов, а также с водой и водными растворами кислой и щелочной реакции.

Результаты сравнительного изолирования изучаемых соединений из биологического материала (модель – ткань печени) представлены на рис. 1.

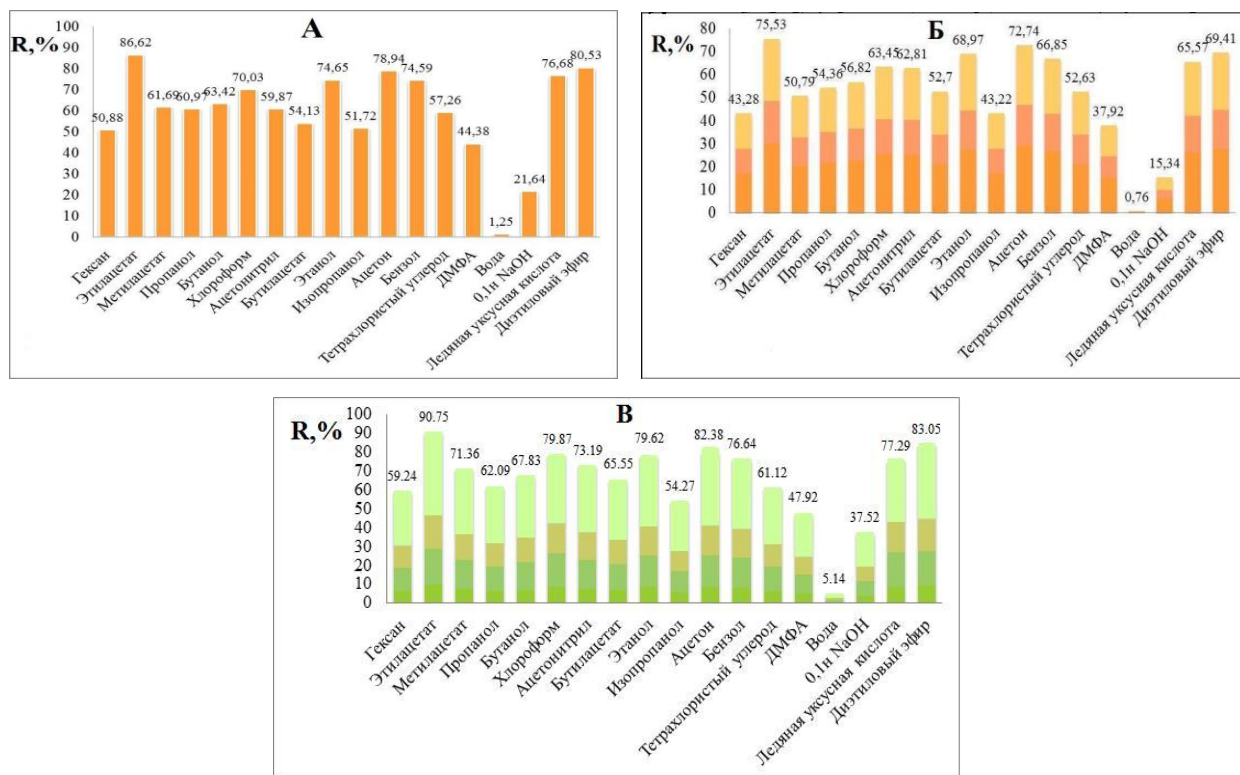


Рис. 1. Результаты сравнительного изолирования исследуемых алкил- и алкенилфенолов из биологического материала: **А** – 2,4-ДТБГОБ, **Б** – 2,6-ДТБГОБ, **В** – 2-МО-4-(1-П)ГОБ

Как свидетельствуют полученные данные, наиболее высокие значения степени извлечения 2,4-ДТБГОБ, 2,6-ДТБГОБ и 2-МО-4-(1-П)ГОБ из ткани печени достигаются этилацетатом.

Исследования характера зависимости степени извлечения рассматриваемых веществ оптимальным изолирующим агентом из биологического материала от различных факторов показали, что достичь достаточно полного извлечения аналитов из биоматериала возможно уже при двукратном настаивании, если при каждом настаивании количество изолирующего агента превышает количество биологического объекта как минимум в два раза, а продолжительность контакта изолирующего агента и биоматериала составляет не менее 45 минут.

Проведённые предварительные исследования позволили разработать методики определения 2,4-ДТБГОБ, 2,6-ДТБГОБ и 2-МО-4-(1-П)ГОБ в тканях органов, крови и плазме на основе изолирования этилацетатом с последующей хроматографической очисткой, идентификацией и количественной оценкой содержания аналитов. Количественная оценка определения исследуемых веществ в биологических матрицах (органах, крови и плазме) представлена в табл. 5.

Как свидетельствуют полученные данные, при внесении аналитов в модельные смеси в количестве 25 мг в 25 г биоматериала разработанные методики, основанные на изолировании этилацетатом, позволяют определить более 80% исследуемых соединений в ткани печени, крови и плазме.

Таблица 5 – Результаты количественного определения аналитов в биологическом материале методами спектрофотометрии и ВЭЖХ после изолирования этилацетатом и очистки в колонке силикагеля L 40/100 мкм (n=5; p=0,95)

Анализируемые вещества	Содержание, мг в 25 г биоматериала	Найдено, %							
		Спектрофотометрия				ВЭЖХ			
		\bar{x}	S	S _r	$\Delta\bar{x}$	\bar{x}	S	S _r	$\Delta\bar{x}$
Ткань печени									
2,4-ДТБГОБ	25,0	86,98	1,74	0,02 0	2,16	87,76	1,84	0,02 1	2,29
	2,5	85,52	2,39	0,02 8	2,97	85,28	2,47	0,02 9	3,07
2,6-ДТБГОБ	25,0	84,81	0,85	0,01 0	2,37	85,13	2,12	0,02 5	2,63
	2,5	83,67	1,18	0,01 4	3,29	83,45	2,69	0,03 2	3,34
2-МО-4-(1-П)ГОБ	25,0	80,57	2,25	0,02 8	2,85	80,89	2,08	0,02 6	2,59
	2,5	79,05	2,82	0,03 6	3,64	79,60	2,90	0,03 6	3,60
Кровь									
2,4-ДТБГОБ	25,0	89,81	1,68	0,01 9	2,08	89,79	1,46	0,01 6	1,81
	2,5	87,92	2,19	0,02 5	2,73	87,54	2,08	0,02 4	2,58
2,6-ДТБГОБ	25,0	87,12	0,83	0,01 0	2,31	87,11	1,78	0,02 0	2,21
	2,5	86,03	1,05	0,01 2	2,91	85,86	2,53	0,03 0	3,15
2-МО-4-(1-П)ГОБ	25,0	82,09	1,94	0,02 4	2,51	81,85	1,99	0,02 4	2,47
	2,5	81,11	2,65	0,03 3	3,28	80,76	2,37	0,02 9	2,95
Плазма крови									
2,4-ДТБГОБ	25,0	94,13	1,44	0,01 5	1,78	95,07	1,34	0,01 4	1,66
	2,5	92,45	1,99	0,02 2	2,41	92,23	2,00	0,02 2	2,49
2,6-ДТБГОБ	25,0	91,34	1,48	0,01 6	1,92	91,50	1,51	0,01 7	1,88
	2,5	89,94	2,04	0,02 3	2,56	89,63	2,04	0,02 3	2,53
2-МО-4-(1-П)ГОБ	25,0	86,78	1,66	0,01 9	2,03	87,06	1,70	0,02 0	2,11
	2,5	85,96	2,11	0,02 5	2,81	86,24	2,20	0,02 6	2,73

Для методик определения 2,4-ДТБГОБ, 2,6-ДТБГОБ и 2-МО-4-(1-П)ГОБ в различных видах биологических матриц на основе изолирования этилацетатом, очистки в колонке силикагеля L 40/100 мкм и последующей оценке содержания методом УФ-

спектрофотометрии или ВЭЖХ проведены валидационные мероприятия по ряду основных характеристик.

Разработанные методики соответствуют критериям селективности. Установлено отсутствие явления переноса аналита для методик на основе использования ВЭЖХ.

Зафиксирована стабильность рассматриваемых алкил- и алкенилпроизводных гидроксиаренов в образцах биоматериала с низким и высоким уровнями содержания аналитов в течение месяца при хранении в морозильной камере (температура 20-25°C) в условиях трёхкратного замораживания и размораживания.

По результатам оценки критериев правильности и прецизионности разработанные методики приемлемы для целей химико-токсикологического и судебно-химического анализа.

В рамках валидационных действий определены значения предела обнаружения (ПО) (мг/г) и предела количественного определения (ПКО) (мг/г) 2,4-ДТБГОБ, 2,6-ДТБГОБ и 2-МО-4-(1-П)ГОБ в биоматериале. Для ткани печени, крови и плазмы значения ПО составили соответственно: 0,0036-0,016; 0,032-0,014; 0,0026-0,012, значения ПКО – 0,004-0,02; 0,004-0,02 и 0,004-0,02.

На примере искусственных смесей с тканью трупной печени изучена устойчивость 2,4-ДТБГОБ, 2,6-ДТБГОБ и 2-МО-4-(1-П)ГОБ в трупном материале в зависимости от продолжительности и температурного режима сохранения модельных смесей. Рассмотрены 3 температурных режима: 0-2°C, 8-10°C и 18-22°C.

Результаты исследований отражены на рис. 2 .

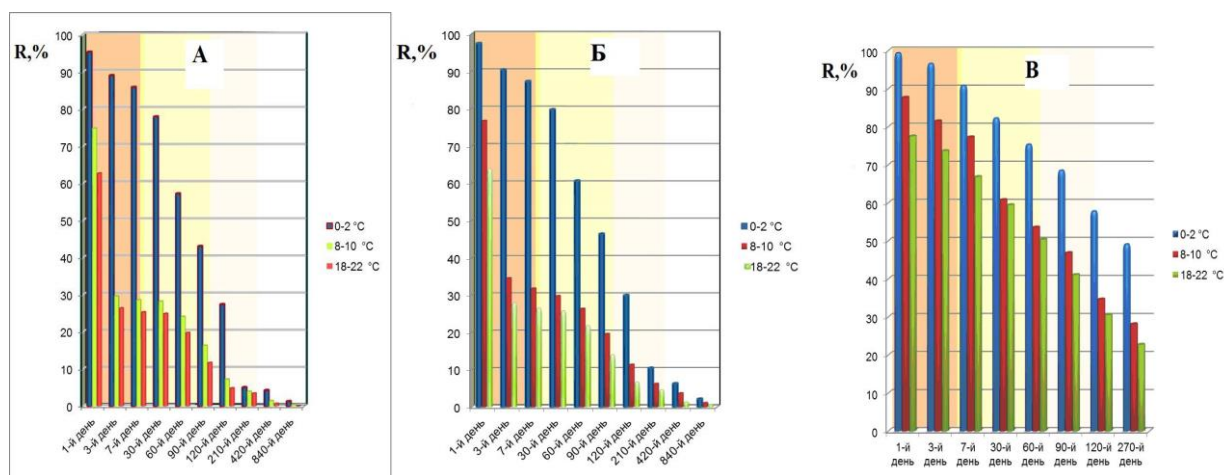


Рис. 2. Результаты изучения сохраняемости 2,4-ДТБГОБ (А), 2,6-ДТБГОБ (Б) и 2-МО-4-(1-П)ГОБ (В) в биологическом материале

Как видно из представленных данных, при сохранении модельных смесей в выбранных температурных режимах рассматриваемые вещества в неизменном виде могут быть определены в трупном материале в течение 24 месяцев (для 2,4- и 2,6-ДТБГОБ) и 9 месяцев (для 2-МО-4-(1-П)ГОБ) с момента начала эксперимента.

Характер распределения 2,4-ДТБГОБ, 2,6-ДТБГОБ и 2-МО-4-(1-П)ГОБ в организме теплокровных был изучен на крысах породы Wistar. При этом находящимся в эксперименте животным, разделённым на 6 групп по 5 особей в каждой, с массой от 150 до 200 г вводили внутрижелудочно тройную LD₅₀ исследуемого вещества в виде водной суспензии из расчёта соответственно 2400, 1320 и 1560 мг вещества на 1 кг массы животного. После гибели животных, трупы вскрывали и исследовали различные органы и кровь на наличие в них 2,4-ДТБГОБ, 2,6-ДТБГОБ и 2-МО-4-(1-П)ГОБ. Параллельно исследовали органы и биожидкости контрольных животных (группа из 5 особей). Результаты изучения распределения представлены на рис. 3.

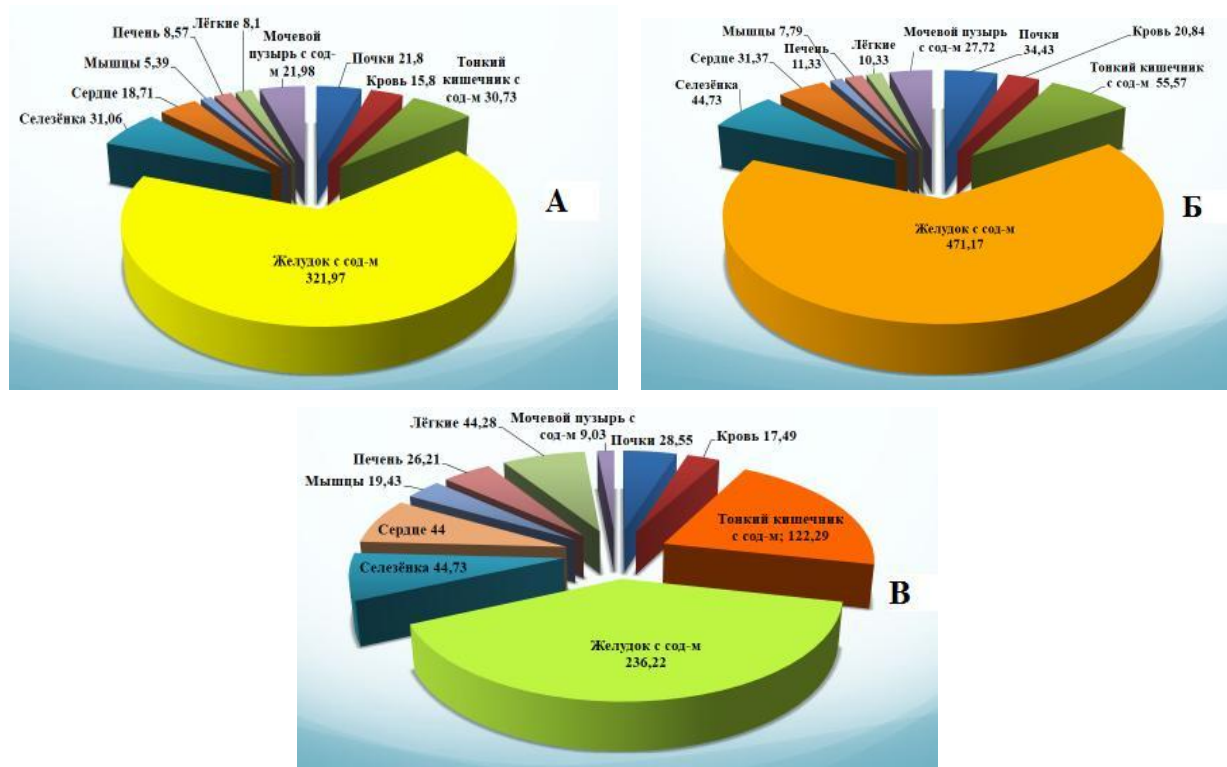


Рис. 3. Результаты определения (мг/100 г) исследуемых соединений в организме теплокровных (крысы): А – 2,4-ДТБГОБ, Б – 2,6-ДТБГОБ, В – 2-МО-4-(1-П)ГОБ

Данные рис. 3 свидетельствуют, что при пероральном введении отравляющего агента наибольшие количества 2,4-ДТБГОБ и 2,6-ДТБГОБ (мг в 100 г) обнаруживаются в желудке с содержимым (соответственно $321,97 \pm 38,05$ и $471,17 \pm 62,60$), селезенке (соответственно $31,06 \pm 1,97$ и $44,73 \pm 2,37$) и тонком кишечнике с содержимым (соответственно $30,73 \pm 3,05$ и $55,57 \pm 5,43$). Несколько меньшие количества рассматриваемых соединений содержатся в почках, сердце и мочевом пузыре с содержимым. А исследуемое соединение 2-МО-4-(1-П)ГОБ обнаруживается в большей степени в желудке с содержимым ($236,22 \pm 28,21$), тонком кишечнике с содержимым ($122,29 \pm 15,55$), лёгких ($44,28 \pm 4,10$) и селезёнке ($44,00 \pm 4,70$), в нескольких меньших количествах – в почках ($28,55 \pm 2,53$), сердце ($26,56 \pm 1,86$) и мышцах ($19,43 \pm 1,12$) отравленных животных.

На основании проведенных исследований предложен вариант общей схемы исследования биологического материала при отравлении рассматриваемыми веществами, основанный на изолировании этилацетатом с последующей очисткой методом адсорбционной колоночной хроматографии (рис. 4).

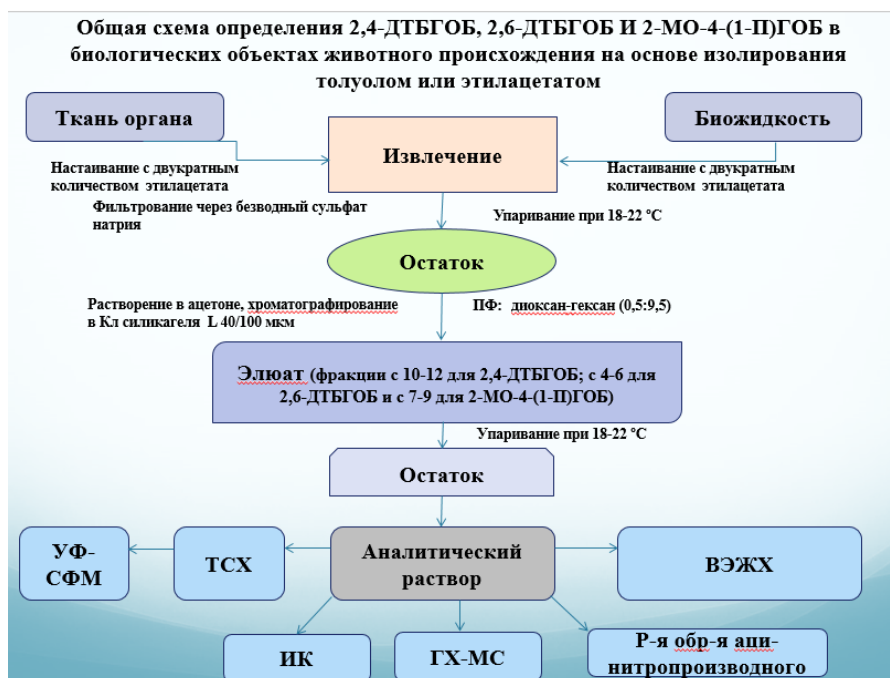


Рис. 4. Общая схема исследования биологического материала при отравлениях рассматриваемыми алкил- и алкенилгидроксибензолов

Предлагаемая схема, представленная на рис.4, позволяет провести пробоподготовку, идентификацию и количественное определение 2,4-ДТБГОБ, 2,6-ДТБГОБ и 2-МО-4-(1-П)ГОБ в различных видах биоматериала, обеспечивая необходимый уровень аналитических характеристик при исследовании различных биологических матриц.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Разработана универсальная и оригинальная схема химико-токсикологического исследования 2,4-ди-трет-бутилгидроксибензола, 2,6-ди-трет-бутилгидроксибензола и 2-метокси-4-(1-пропенил)гидроксибензола.

2. Проведено изучение хроматографической подвижности 2,4-ди-трет-бутилгидроксибензола, 2,6-ди-трет-бутилгидроксибензола и 2-метокси-4-(1-пропенил)гидроксибензола в тонких слоях, препаративных и аналитических колонках сорбентов, обладающих гидроксильной или привитой поверхностями. Для характеристики особенностей хроматографического поведения анализируемых соединений и некоторых близких структур рассчитан ряд параметров.

Исследована степень вероятности потерь анализируемых веществ в процессе их хроматографирования в тонких слоях нормальнофазовых и обращеннофазовых сорбентов и макроколонках с нормальнофазовым сорбентом в оптимальных условиях.

Изучены особенности поглощения электромагнитного излучения 2,4-ди-трет-бутилгидроксibenзола, 2,6-ди-трет-бутилгидроксibenзола и 2-метокси-4-(1-пропенил)гидроксibenзола в УФ – и ИК – частях спектра. Рассчитаны производные второго порядка их УФ-спектров в среде 95 % этанола.

3. Разработаны методики идентификации и количественного определения 2,4-ДТБГОБ, 2,6-ДТБГОБ и 2-МО-4-(1-П)ГОБ на основе цветных реакций, методами спектрофотометрии, хроматографии и масс-спектрометрии.

Выявлена целесообразность применения метода хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) для идентификационного обнаружения исследуемых соединений по значениям времени удерживания и специфическим наборам характеристических осколков.

Разработаны методики количественного спектрофотометрического определения 2,4-ди-трет-бутилгидроксibenзола, 2,6-ди-трет-бутилгидроксibenзола и 2-метокси-4-(1-пропенил)гидроксibenзола по поглощению в среде 95 % этанола.

Показана возможность и установлены оптимальные условия количественного определения рассматриваемых веществ методом обращеннофазовой ВЭЖХ (диапазон линейности 0,01-4,0 мкг для 2,4-ДТБГОБ, 2,6-ДТБГОБ и 0,004-4,0 мкг для 2-МО-4-(1-П)ГОБ в хроматографируемой пробе) полуширина доверительного интервала составляет 1,01 для 2,4-ДТБГОБ и 1,16 для 2,6-ДТБГОБ, 1,09 для 2-МО-4-(1-П)ГОБ, стандартное отклонение – 0,97; 1,11 и 1,04 соответственно, относительная ошибка среднего результата (n=6; P=0,95) – 1,02; 1,16 и 1,09% соответственно.

4. Проведено изучение особенностей изолирования 2,4-ди-трет-бутилгидроксibenзола, 2,6-ди-трет-бутилгидроксibenзола и 2-метокси-4-(1-пропенил)гидроксibenзола из биологического материала изолирующими агентами различной химической природы.

Наибольшие значения степени извлечения рассматриваемых веществ наблюдаются при использовании в качестве изолирующей жидкости этилацетата.

Установлено, что оптимальные условия изолирования аналитов этилацетатом могут быть достигнуты в условиях проведения по крайней мере двукратного настаивания с порциями изолирующего агента, каждая из которых как минимум в два раза численно превышает массу биологического объекта, при продолжительности каждого настаивания не менее 45 минут.

5. Разработаны методики определения 2,4-ди-трет-бутилгидроксibenзола, 2,6-ди-трет-бутилгидроксibenзола и 2-метокси-4-(1-пропенил)гидроксibenзола в биологических объектах методами УФ-спектрофотометрии и ВЭЖХ после изолирования этилацетатом и очистки методами тонкослойной и колоночной хроматографии.

При содержании рассматриваемых соединений в количествах 1,25-50,0 мг в 25 г биоматериала данные методики позволяют определить (2,4-ди-трет-бутилгидроксибензола в ткани печени 84,84-88,14%, в крови – 86,87-91,46%, в плазме – 91,72-95,72%, 2,6-ди-трет-бутилгидроксибензола в ткани печени 82,78-85,42%, в крови – 85,21-89,74%, в плазме – 88,92-92,38% и 2-метокси-4-(1-пропенил)гидроксибензола в ткани печени 78,26-81,32%, в крови – 80,51-82,34%, в плазме – 85,21-87,33%.

Валидированы методики определения аналитов в ткани печени, крови и плазме с использованием метода УФ-спектрофотометрии и ВЭЖХ после их изолирования этилацетатом и очистки колоночной адсорбционной хроматографией. Методики приемлемы по показателям линейности, правильности и прецизионности.

6. Изучено распределение 2,4-ди-трет-бутилгидроксибензола, 2,6-ди-трет-бутилгидроксибензола и 2-метокси-4-(1-пропенил)-гидроксибензола в организме теплокровных животных (крысы) при летальных отравлениях, вызванных однократным введением в желудок трёхкратной LD₅₀ в виде водной суспензии.

Отмечено присутствие наиболее значительных количеств 2-метокси-4-(1-пропенил)гидроксибензола (мг/100 г) в желудке с содержимым, тонком кишечнике с содержимым, лёгких и селезёнке; 2,4-ди-трет-бутилгидроксибензола и 2,6-ди-трет-бутилгидроксибензола (мг/100 г) присутствуют в желудке с содержимым, селезенке и тонком кишечнике с содержимым.

7. Исследована стойкость 2,4-ди-трет-бутилгидроксибензола, 2,6-ди-трет-бутилгидроксибензола и 2-метокси-4-(1-пропенил)-гидроксибензола в гнилобно-разлагающемся трупном материале в зависимости от продолжительности и температурного режима сохранения биоматериала.

Установлено, что при температурах от 0 до 22 °С исследуемые вещества являются достаточно стойкими соединениями и сохраняются в трупном материале более 9 месяцев (2-метокси-4-(1-пропенил)-гидроксибензол), а 2,4-ди-трет-бутилгидроксибензол и 2,6-ди-трет-бутилгидроксибензол сохраняются более 24 месяцев.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Шорманов, В.К. Особенности распределения 2,6-ди-трет-бутил-4-метилгидроксибензола в организме теплокровных животных / В.К. Шорманов, О.И. Пугачёва, А.П. Асташкина, Е.П. Цацуа // **Судебно-медицинская экспертиза**. – 2016 – Т. 59, № 1. – С. 29-34.

2. Особенности определения 2-хлор-1,4-дигидроксибензола в биологическом материале / В.К. Шорманов, **Е.П. Цацуа**, Т.Ф. Коропова, А.П. Асташкина, Г.Г. Янголенко // **Судебно-медицинская экспертиза**. – 2016. – Т. 59, № 5. – С. 44-50.

3. Особенности распределения 4-метоксигидроксибензола в организме теплокровных животных (крысы) при летальных отравлениях / В.К. Шорманов, М.А. Останин, А.П. Асташкина, О.И. Гришечко, **Е.П. Цацуа** // **Судебно-медицинская экспертиза**. – 2016 – Т. 59, № 4. – С. 48-53.
4. Шорманов, В.К. Определение 2,4-ди-трет-бутилгидроксибензола при химико-токсикологическом исследовании биологического материала / В.К. Шорманов, **Е.П. Цацуа**, А.П. Асташкина // **Судебно-медицинская экспертиза**. – 2017. – Т. 60, № 4. – С. 34-39.
5. Определение 2,6-ди-трет-бутилгидроксибензола при химико-токсикологическом исследовании биологического материала / **Е.П. Цацуа**, А.П. Асташкина, В.К. Шорманов, М.В. Рымарова, А.О. Квасова // **Фармация**. – 2017. – Т. 66, № 5. – С. 19-24.
6. Шорманов, В.К. Определение 2,4-дитретбутилфенола в биожидкостях методом производной спектрофотометрии / В.К. Шорманов, **Е.П. Цацуа**, А.П. Асташкина, М.А. Останин // Проблемы современной медицины: актуальные вопросы: Сборник научных трудов по итогам международной научно-практической конференции (Красноярск, 6 ноября 2014 г.). – Красноярск: ИЦРОН, 2014. – С. 196-199.
7. Шорманов, В.К. Определение 2,6-дитретбутилфенола в биологических жидкостях методом производной спектрофотометрии / В.К. Шорманов, **Е.П.Цацуа**, А.П.Асташкина, М.А. Останин // Научные перспективы XXI века. Достижения и перспективы нового столетия: V Междунар. науч.-практ. конф. (Новосибирск, 17-18 октября 2014 г.). Ч. 3. – Новосибирск: Международный научный институт «Education», 2014. – № 5. – С. 64-66.
8. **Цацуа, Е.П.** Изучение сохраняемости 2,4-дитретбутилгидроксибензола в биологическом материале / **Е.П. Цацуа**, В.К. Шорманов, А.П. Асташкина // Фармацевтический кластер как интеграция науки, образования и производства: Сборник материалов 6-й международной научно-практической телеконференции (Белгород, 5 октября 2016 г.). – Белгород: ИД «Белгород» НИУ «БелГУ», 2016. – С. 90-94.
- 9.Шорманов, В.К. Изучение сохраняемости 2,6-дитретбутилгидроксибензола в биологическом материале / В.К. Шорманов, **Е.П. Цацуа**, А.П. Асташкина // Основные проблемы в современной медицине: Сборник научных трудов по итогам III Международной научно-практической конференции (Волгоград, 11 октября 2016 г.). – Волгоград, 2016. – С. 224-229.
- 10.Изучение сохраняемости 2-метокси-4-аллилгидроксибензола в биологическом материале / А.П. Асташкина, В.К. Шорманов, М.К. Елизарова, Е.А. Сухомлинова, **Е.П. Цацуа** // Основные проблемы в современной медицине: Сборник научных трудов по итогам III Международной научно-практической конференции (Волгоград, 11 октября 2016 г.). – Волгоград, 2016. – С. 220-224.

11.Цаца Е.П., Шорманов В.К. Проведение сравнительного изолирования 2,4-дитретбутилгидроксибензола из трупного материала // Аналітична хімія у фармації: Матеріали II Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції (Харків, 17 березня 2016 р.). – Харків, 2016. – С. 73-74.

12. Чернова, А.П. Спектрофотометрическое определение 2,6-диметоксигидроксибензола в субстанции и биологическом материале / А.П. Чернова, А.П. Самочернова, В.К. Шорманов, **Е.П. Цаца** // Научные исследования в области медицины и фармакологии. Выпуск II. Сборник научных трудов по итогам международной научно-практической конференции (Саратов, 25 апреля 2017 г.). – Саратов: Федеральный центр науки и образования Эвенсис, 2017. – С. 58-61.