

Оригинальная статья

УДК 615.07+662.235

<https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.1.53-65>**Применение метода газовой хроматографии для определения 2-амино-4,6-динитрофенола и оценка его устойчивости в биологическом материале****В.К. Шорманов¹✉, Н.Г. Погосян¹, С.Ю. Гармонов², В.А. Омельченко³**¹ *Курский государственный медицинский университет, г. Курск, Россия*² *Казанский национальный исследовательский технологический университет, г. Казань, Россия*³ *Экспертно-криминалистический центр ГУ МВД России по Краснодарскому краю, г. Краснодар, Россия*✉ r-wladimir@yandex.ru**Аннотация**

2-Амино-4,6-динитрофенол (пикраминовая кислота) (2-А-4,6-ДНФ) широко применяется в качестве полупродукта в органическом синтезе, красителя в красках для волос, фунгицида в сельском хозяйстве, а также как взрывчатое вещество. 2-А-4,6-ДНФ, как и некоторые родственные соединения (2,4,6-тринитрофенол (2,4,6-ТНФ) и N-метил-N,2,4,6-тетранитроанилин), метаболитом которых он является, обладает токсичным действием на человека и животных. Однако некоторые аспекты определения 2-А-4,6-ДНФ в рамках химико-токсикологического анализа остаются малоизученными. В ходе проведенных исследований установлено, что смесь равных количеств ацетона и ацетонитрила является наилучшим экстрагентом для выделения 2-А-4,6-ДНФ. Изучена и обоснована возможность применения газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС) для определения 2-А-4,6-ДНФ в извлечениях из биоматериала. В условиях разработанной методики определение проводится опосредованно через получение О-ацетильного деривата. Методика применена для оценки стабильности 2-А-4,6-ДНФ в биоматериале. Минимальный срок, в течение которого соединение обнаруживается в биологической среде, составляет 25 сут от момента контаминации (температура хранения 18–22 °С), а максимальный – 45 сут при температуре хранения 1–3 °С.

Ключевые слова: 2-амино-4,6-динитрофенол, выделение, дериватизация, 2-амино-4,6-динитрофенилацетат, идентификация, определение, газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием.

Заключение Комитета по этике. Исследование проведено в соответствии со статьей 68 Федерального закона от 21.11.2011 № 323-ФЗ (ред. от 28.12.2024) «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» и порядком проведения судебно-медицинской экспертизы, утвержденного приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 25.09.2023 г. № 491н.

Для цитирования: Шорманов В.К., Погосян Н.Г., Гармонов С.Ю., Омельченко В.А. Применение метода газовой хроматографии для определения 2-амино-4,6-динитрофенола и оценка его устойчивости в биологическом материале // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2025. Т. 167, кн. 1. С. 53–65. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.1.53-65>.

Original article

<https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.1.53-65>

Application of gas chromatography for determination of 2-amino-4,6-dinitrophenol and evaluation of its stability in biological material

V.K. Shormanov¹✉, N.G. Pogosyan¹, S.Yu. Garmonov², V.A. Omelchenko³

¹ Kursk State Medical University, Kursk, Russia

² Kazan National Research Technological University, Kazan, Russia

³ Forensic Investigation Center, Main Directorate of the Ministry of Internal Affairs of Russia for the Krasnodar Region, Krasnodar, Russia

✉ r-wladimir@yandex.ru

Abstract

2-Amino-4,6-dinitrophenol (2-A-4,6-DNP), or picramic acid, is widely used as an intermediate in organic synthesis, a dye in hair coloring products, an agricultural fungicide, and an explosive. Similar to other related compounds (2,4,6-trinitrophenol (2,4,6-TNF) and N-methyl-N,2,4,6-tetranitroaniline), of which it is a metabolite, 2-A-4,6-DNP is toxic to humans and animals. However, certain aspects of its detection in toxicological screening remain poorly understood. In this study, a mixture of acetone and acetonitrile in equal amounts was identified as the most effective extractant for 2-A-4,6-DNP. The application of gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) for detecting 2-A-4,6-DNP in the biological material extracts was analyzed and justified. The proposed method, based on the indirect determination of 2-A-4,6-DNP through O-acetyl derivative quantification, was employed to assess its stability in the biological material. 2-A-4,6-DNP was found to be detectable in the biological medium within 25 (storage temperature 18–22 °C) to 45 (storage temperature 1–3 °C) days after the contamination.

Keywords: 2-amino-4,6-dinitrophenol, isolation, derivatization, 2-amino-4,6-dinitrophenyl acetate, identification, determination, gas chromatography–mass spectrometry

Institutional Review Board Statement. This study was performed under Article 68 of Federal Law No. 323-FZ “On fundamental healthcare principles in the Russian Federation” dated November 21, 2011 (rev. on December 28, 2024) and the standards for forensic investigations established in Order No. 491n issued by the Ministry of Health of the Russian Federation on September 25, 2023.

For citation: Shormanov V.K., Pogosyan N.G., Garmonov S.Yu., Omelchenko V.A. Application of gas chromatography for determination of 2-amino-4,6-dinitrophenol and evaluation of its stability in biological material. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2025, vol. 167, no. 1, pp. 53–65. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.1.53-65> (In Russian)

Введение

2-Амино-4,6-динитрофенол (пикраминовая кислота, 1-амино-2-гидрокси-3,5-динитробензол, 2,4-динитро-6-аминофенол, 6-амино-2,4-динитрофенол) (2-А-4,6-ДНФ) в кислотной и солевой формах является полупродуктом синтеза азокрасителей и высокоэнергетических

соединений [1–3]. Наряду с этим, он используется в производстве красок для волос и красящих шампуней [4]. 2-А-4,6-ДНФ образуется в процессе биотрансформации таких взрывчатых веществ, как N-метил-N,2,4,6-тетранитроанилин (тетрил) и 2,4,6-тринитрофенол (пикриновая кислота) (2,4,6-ТНФ), и относится к взрывчатым веществам. Описана биологическая активность рассматриваемого соединения, в частности, фунгицидное действие [5, 6]. Осуществляются поиски способов применения 2-А-4,6-ДНФ в агрономических целях [7].

К физическим характеристикам исследуемой субстанции относятся игольчатая или призматическая форма кристаллов, их красная окраска и отсутствие выраженного запаха [8]. Кристаллы 2-А-4,6-ДНФ плавятся при 169 °С [6], относительно мало растворяются в воде (0.065 %), растворяются в гидрофобных (диэтиловый эфир, бензол) и гидрофильных (ледяная уксусная кислота) органических растворителях, хорошо растворяются в этаноле (около 6 г/100 мл) и диметилсульфоксиде (> 10 г/100 мл) [9].

2-А-4,6-ДНФ обладает высокой токсичностью [10]. Полулетальная доза (лабораторные крысы, путь поступления *per os*) составляет 0.11 г/кг [11]. N-метил-N,2,4,6-тетранитроанилин и 2,4,6-ТНФ, метаболитом которых является 2-А-4,6-ДНФ, также высокотоксичны [12]. Имеются данные об острых и хронических формах отравления 2-А-4,6-ДНФ [11]. Использование недоброкачественных косметических продуктов, в частности, коммерческих порошков хны, приводит к развитию дерматозов [13].

Таким образом, 2-А-4,6-ДНФ можно рассматривать как важный объект химико-токсикологического анализа. Вместе с тем, вопросы, связанные с извлечением 2-А-4,6-ДНФ из биоматриц, очисткой и определением, а также устойчивость в биологическом материале практически не рассматриваются. В связи с этим, цель исследования заключается в оценке особенностей определения и стабильности 2-А-4,6-ДНФ в биологическом материале.

1. Экспериментальная часть

1.1. Материалы и методы исследования. В работе использовали 2-А-4,6-ДНФ ($\geq 98\%$) от Avantor, Inc., США, а также образцы паренхимы печени человека, полученные из большей доли трупного органа.

Для проведения исследования готовили 0.1 % модельные смеси аналита с печеночной тканью, фрагментированной до частиц размером 2–4 мм. Выбор в качестве модели биоматрицы печеночной ткани объясняется тем, что печень – основной барьерный орган для токсикантов, где происходит их обезвреживание, а в случаях смерти от отравления, как правило, отмечается наиболее высокий уровень содержания ядов и их метаболитов. По этой причине рассматривали экстракционные свойства ряда растворителей и их смесей по отношению к печеночной ткани, а затем выбирали наиболее эффективный экстрагент. Модельные смеси перед экспериментом выдерживали 15 мин при 20 ± 2 °С [14, 15].

Настаивание биоматериала с экстрагентом проводили дважды по 45 мин, а объем экстрагента превышал массу биоматериала в два раза. Параллельно проводили исследование для 19 растворителей и двухкомпонентных смесей. Каждую пару извлечений объединяли и отфильтровывали от механических частиц. По 0.3 мл каждого объединенного извлечения наносили на линии стартов хроматографических пластин типа «Sorbfil» (сорбент с УФ-индикатором, размер пластин 10×10 см) в виде полосы размером 60×0.5 мм. В качестве элюента использовали смесь бензол–ацетон (3 : 7 об.). Критерием идентификации 2-А-4,6-ДНФ служила его абсолютная хроматографическая подвижность (R_f), равная 0.40 ± 0.03 . Вещество, обнаруживаемое на хроматограммах при проявлении УФ-облучением ($\lambda = 254$ нм),

элюировали из сорбента 5 мл диметилформаида (ДМФА) и исследовали поглощение элюата на спектрофотометре СФ-2000 (ООО «ОКБ СПЕКТР», Россия) в диапазоне длин волн 190–550 нм. По интенсивности поглощения элюата относительно ДМФА при 490 ± 2 нм рассчитывали содержание 2-А-4,6-ДНФ по методу градуировочного графика [14].

Наряду с этим, учитывали результаты выделения 2-А-4,6-ДНФ традиционными для химико-токсикологического анализа способами, описанными в работах [16, 17]. В качестве критерия для выбора наилучшего экстрагента рассматривали степень извлечения. Рабочие условия выделения аналита выбранным экстрагентом устанавливали исходя из продолжительности и кратности инфузии, а также массового отношения «экстрагент–биоматрица».

Для очистки выделяемого 2-А-4,6-ДНФ от эндогенных веществ биоматрицы применяли последовательно экстракцию и полупрепаративную хроматографию на колонке (19×1 см) с силикагелем LiChroprep® Si 60 с размером пор 60 Å и размером частиц 40–63 мкм (Merck, Германия) с элюированием смесью ацетон–диэтиловый эфир (6 : 4 об.). Собирали фракции элюата (1 фракция = 2 мл), которые исследовали на присутствие аналита с помощью электронной спектроскопии.

Для предварительной идентификации 2-А-4,6-ДНФ и его дериватов применяли тонкослойную хроматографию (ТСХ) на пластинках ПТСХ-АФ-А УФ. Детектирование соединений проводили в присутствии веществ-свидетелей под воздействием УФ-излучения с $\lambda = 254$ нм. Осуществляли поиск наилучшей подвижной фазы для этого метода исследования. Для рассмотренных соединений определяли величины абсолютных (R_f) и относительных (R_s) хроматографических подвижностей.

Подтверждающими методами идентификации выступали электронная спектроскопия (растворитель ДМФА, $\lambda = 190$ –550 нм) и газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС). Для этого использовали газовый хроматограф Agilent 6850 от “Agilent Technologies” (США) с капиллярной колонкой с жидкой неполярной фазой и квадрупольным масс-спектрометром 5973 Network. Фрагментацию проводили с помощью электронного удара с энергией 70 эВ, а детектирование – в режиме Scan. Жидкой неполярной фазой являлся 5%-фенил-95%-диметилполисилоксан, нанесенный пленкой толщиной 0.25 мкм в колонке HP-5MS ($30 \text{ м} \times 0.25 \text{ мм}$). Подвижная фаза – гелий, подаваемый со скоростью 1.0 мл/мин. Образец вводили в колонку при 70 °С, а через 2 мин температуру повышали до 200 °С (40 °С/мин), затем до 290 °С (12.5 °С/мин) и выдерживали 2 мин для удаления остатков высококипящих соединений. Температура инжектора составляла 250 °С, квадруполь – 150 °С, детектора – 290 °С. Количественную оценку присутствия аналита проводили методом ГХ-МС (по площади пика О-ацетильного деривата 2-А-4,6-ДНФ).

1.2. Получение дериватов. Определение 2-А-4,6-ДНФ методом газовой хроматографии в нативной форме затруднено, так как соединение обладает низкой термостабильностью. Таким образом, необходимо получение деривата, обладающего устойчивостью при испарении. Поэтому рассмотрены ацетилированные производные. Для их получения 100 мг 2-А-4,6-ДНФ растворяли в 10 мл уксусного ангидрида (УА) и выдерживали в различных температурных режимах (20, 60, 100 и 139 °С).

Выдерживание полученного раствора при 20 °С в течение 15 мин приводило к образованию кристаллов игольчатой формы кремового цвета. Полученный осадок отфильтровывали. Фильтр с веществом сушили в токе воздуха комнатной температуры. В остальных случаях раствор нагревали до соответствующей температуры (60, 100 и 139 °С) и выдерживали в

течение 15 мин. Затем остаток УА отгоняли в токе воздуха комнатной температуры [18–20]. Высушенные продукты и сухие остатки индивидуально растворяли в 20 мл этилацетата и нагревали до 75 °С. Затем растворы медленно охлаждали. В процессе охлаждения наблюдали выпадение кристаллов, которые отфильтровывали и сушили. Полученные очищенные соединения использовали для дальнейших исследований.

1.3. Оценка стабильности 2-А-4,6-ДНФ в биологическом материале. С помощью разработанной методики исследована стабильность 2-А-4,6-ДНФ в биоматериале. Для этого оценивали динамику снижения количества аналита в модельных смесях относительно контрольных образцов при параллельном хранении в различных температурных условиях: 2 ± 1 °С, 9 ± 1 °С и 20 ± 2 °С. Масса взятой в каждом опыте (определении) модельной композиции, как и контрольного образца биоматериала, составляла 5 г.

Подготовку модельных смесей для исследования стабильности 2-А-4,6-ДНФ в биоматериале проводили следующим образом: 50 г ткани печени измельчали до частиц размером не более 5 мм (в среднем 2–4 мм) и смешивали с 50 мг 2-А-4,6-ДНФ. Готовили три такие смеси для хранения в разных температурных режимах. Далее периодически через определенные промежутки времени (в 1, 4, 7, 15, 21, 25, 35, 45 и 56 дни) от каждой смеси отбирали по 5 г и определяли 2-А-4,6-ДНФ. Параллельно в контрольных опытах изучали устойчивость 2-А-4,6-ДНФ вне биоматериала в заданных температурных режимах.

1.4. Статистическая обработка результатов. Для каждого определения проводили пять параллельных измерений. Статистическую обработку данных проводили с помощью программного пакета Excel (Microsoft Corp., США). Результаты представляли как среднее значение величины и доверительный интервал. Значение доверительной вероятности составляло 0.95.

2. Результаты и их обсуждение

2.1. Выбор экстрагента. Рассмотренные классические методы извлечения 2-А-4,6-ДНФ оказались низкоэффективными и позволили выделить не более 55 % от номинального содержания вещества. Использование в качестве экстрагента системы ацетон–ацетонитрил (1 : 1 об.) дает возможность обнаружить около 80 % 2-А-4,6-ДНФ при содержании вещества 5 мг в 5 г биоматрицы (ткани печени) и определении методом УФ-спектроскопии. Такие результаты получены в условиях двухэтапного (по 30 мин) настаивания и двойного преобладания массы экстрагирующей смеси над массой биологического объекта. В данном случае 30 мин – это наименьшее время, в течение которого на каждом этапе наблюдалось практически исчерпывающее извлечение 2-А-4,6-ДНФ из биоматрицы.

2.2. Физико-химические свойства синтезированных продуктов ацетилирования. Проведен поиск летучих и в достаточной степени термически устойчивых дериватов, полученных путем введения в молекулу 2-А-4,6-ДНФ ацетильных радикалов по месту первичной аминогруппы и фенольного гидроксила в среде УА при различных температурах. Сравнительные характеристики синтезированных дериватов представлены в табл. 1. Как следует из величин температуры плавления, ацетилирование при температурах 20, 60 и 100 °С приводит, очевидно, к образованию одного и того же соединения (продукт № 1), отличающегося по структуре от деривата, получаемого при температуре 139 °С (продукт № 2).

Табл. 1. Сравнительные характеристики 2-А-4,6-ДНФ и его ацетильных дериватов**Table 1.** Comparative characteristics of 2-A-4,6-DNP and its acetyl derivatives

2-А-4,6-ДНФ	Продукт ацетилирования при температурах 20, 60 и 100 °С (продукт № 1)	Продукт ацетилирования при температуре 139 °С (продукт № 2)
Температура плавления, °С		
168±1	198±2	192±2
Максимумы поглощения в электронном спектре (среда – ДМФА), нм (±2)		
330; 422; 490	269; 394; 443	268; 311
Отдельные характеристические частоты в ИК-области, см ⁻¹		
3473 (ν _{ас} NH ₂)	3391 (ν _s NH)	3099 (ν _{ас} NH ₂)
3378 (ν _s NH ₂)	3212 (ν OH)	3039 (ν _s NH ₂)
3252 (ν OH)	1709 (ν C=O)	1696, 1700 (ν C=O)

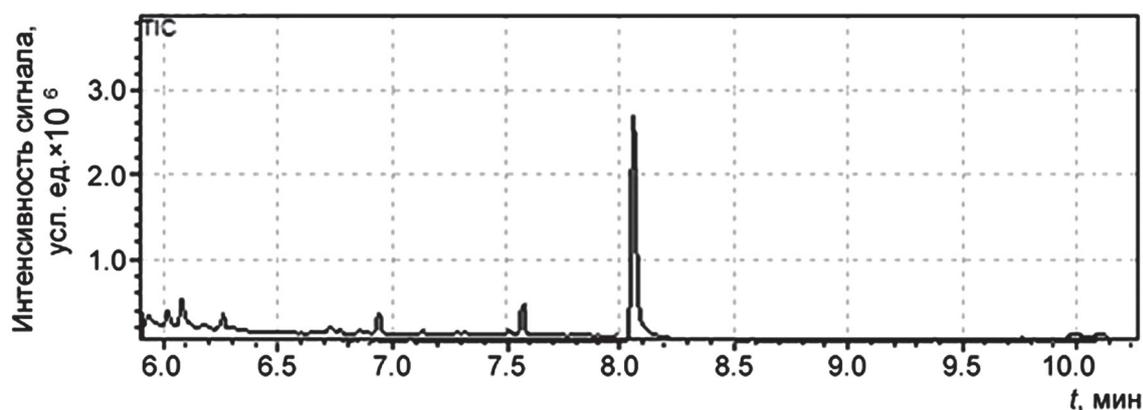
В электронном спектре продукта № 1 полосы поглощения расположены намного ближе к длинноволновой области, что является проявлением поглощения динитрофенола и, следовательно, наличия сопряжения между свободным гидроксилем и нитрогруппой в положении 4.

В ИК-спектре продукта № 1 отсутствуют полосы колебаний первичной аминогруппы, но имеется полоса колебаний гидроксильной группы, а в ИК-спектре продукта № 2 отсутствует полоса колебаний гидроксильной группы и имеются полосы колебаний первичной аминогруппы.

Исследование продуктов ацетилирования 2-А-4,6-ДНФ методом ¹Н ЯМР-спектроскопии подтверждает присутствие ацетильного радикала в молекуле продукта № 1 у атома азота (положение 2), а у продукта № 2 – у атома кислорода (положение 1).

В условиях предлагаемой методики определения методом ГХ-МС на хроматограммах продукта № 1 (N-ацетильный дериват) отсутствуют сигналы вследствие недостаточной летучести и, возможно, термической нестойкости. Продукт № 2 (O-ацетильный дериват, то есть 2-амино-4,6-динитрофенилацетат) проявлял себя как летучее, в достаточной мере термически устойчивое соединение. Поэтому он был выбран в качестве предпочтительной аналитической формы 2-А-4,6-ДНФ для определения методом ГХ-МС.

На рис. 1 и 2 представлены хроматограммы O-ацетильного деривата, полученного после извлечения 2-А-4,6-ДНФ из биоматериала и из стандартного образца 2-А-4,6-ДНФ соответственно.

**Рис. 1.** Хроматограмма 2-амино-4,6-динитрофенилацетата, полученного после извлечения 2-А-4,6-ДНФ из биоматериала**Fig. 1.** Chromatogram of 2-amino-4,6-dinitrophenyl acetate obtained after the extraction of 2-A-4,6-DNP from the biological material

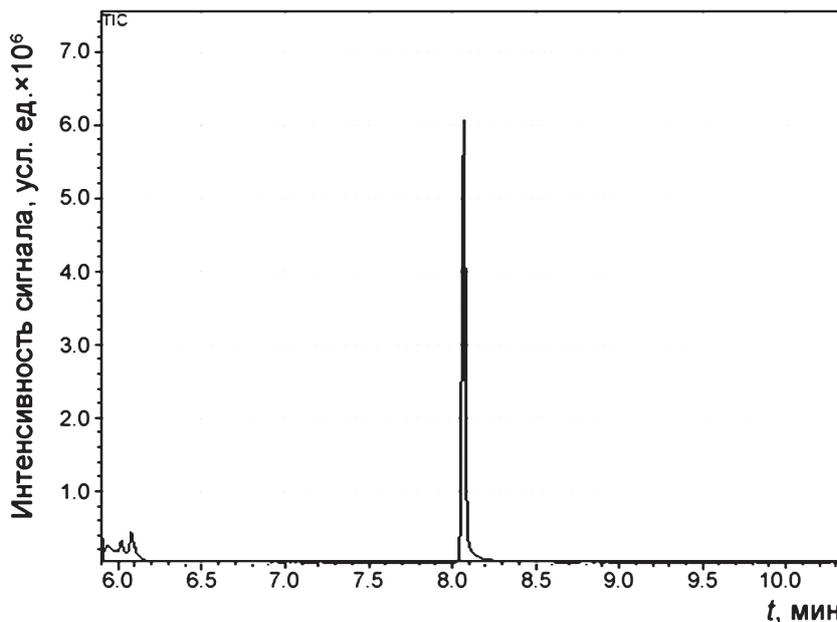


Рис. 2. Хроматограмма 2-амино-4,6-динитрофенилацетата, полученного из стандарта 2-А-4,6-ДНФ (концентрация 80 мкг/мл)

Fig. 2. Chromatogram of 2-amino-4,6-dinitrophenyl acetate obtained from the standard sample of 2-A-4,6-DNP (injected sample concentration 80 µg/mL)

Проведено сравнение характеристик масс-спектров О-ацетильных дериватов, полученных из стандарта 2-А-4,6-ДНФ и после выделения из биоматериала (табл. 2). Массы частиц, присутствующих в обоих масс-спектрах, практически полностью совпадают.

Табл. 2. Характеристики масс-спектров 2-амино-4,6-динитрофенилового эфира уксусной кислоты

Table 2. Characteristics of the mass spectra for 2-amino-4,6-dinitrophenyl acetate

Характеристика масс-спектра О-ацетильного деривата стандарта 2-А-4,6-ДНФ		Характеристика масс-спектра О-ацетильного деривата 2-А-4,6-ДНФ, выделенного из биоматериала	
Обнаруженный ион (m/z)	Относительная интенсивность сигнала в спектре, %	Обнаруженный ион (m/z)	Относительная интенсивность сигнала в спектре, %
223	100	223	100
62	52	62	56
90	50	90	48
131	33	131	37
50	21	76	27
193	17	193	22
177	16	177	15
119	11	119	14

2.3. Оптимизация состава подвижной фазы для ТСХ. Результаты выбора оптимальной подвижной фазы для предварительной идентификации и очистки извлечений из биоматериала представлены в табл. 3. Изучены особенности хроматографической подвижности 2-А-4,6-ДНФ и его ацетильных дериватов в тонком слое силикагеля СТХ-1А (внутренний стандарт – 2,4,6-ТНФ). Этот сорбент обладает достаточной избирательностью адсорбцион-

ного действия в отношении ароматических полинитропроизводных и позволяет обеспечить их воспроизводимое определение при незначительном размывании пятен вдоль движения фронта растворителя.

Табл. 3. Хроматографические параметры 2-А-4,6-ДНФ, его ацетилированных производных и 2,4,6-ТНФ (внутренний стандарт) при определении методом ТСХ (погрешность для R_f составляет ± 0.03)

Table 3. Chromatographic parameters of 2-A-4,6-DNP, its acetyl derivatives, and 2,4,6-TNF (internal standard) in TLC determination (the error for R_f is ± 0.03).

Подвижная фаза (объемное соотношение компонентов)		2-А-4,6-ДНФ		2,4,6-ТНФ		N-ацетильное производное		О-ацетильное производное	
		R_f	R_s	R_f	R_s	R_f	R_s	R_f	R_s
Ацетон	1	0.80	0.89	0.90	1.0	0.86	0.96	0.96	1.1
Диэтиловый эфир	1	0.02	0.50	0.04	1.0	0.01	0.25	0.95	24
Этилацетат	1	0.13	0.19	0.68	1.0	0.05	0.07	0.86	1.3
Дихлорметан	1	0.03	3.0	0.01	1.0	0.01	1.0	0.44	44
Гексан	1	0.00	–	0.00	1.0	0.01	–	0.00	–
Бензол	1	0.02	–	0.00	1.0	0.01	–	0.14	–
Толуол	1	0.01	1.0	0.01	1.0	0.01	1.0	0.12	12
Тетрахлорметан	1	0.00	–	0.00	1.0	0.01	–	0.01	–
Диоксан	1	0.86	1.2	0.73	1.0	0.54	0.74	0.85	1.2
Гексан– тетрахлорметан– диоксан	1 : 2 : 2	0.56	14	0.04	1.0	0.12	3.0	0.77	19
	4 : 2 : 2	0.33	17	0.02	1.0	0.02	1.0	0.62	31
	4 : 4 : 2	0.21	21	0.01	1.0	0.01	1.0	0.57	57
	1 : 1 : 1	0.51	26	0.02	1.0	0.06	3.0	0.75	38
Гексан–диоксан– изопропанол	5 : 4 : 4	0.43	22	0.02	1.0	0.04	2.0	0.67	34
	5 : 5 : 1	0.76	1.8	0.43	1.0	0.15	0.35	0.87	2.0
	7.5 : 5 : 1	0.66	5.1	0.13	1.0	0.10	0.77	0.80	6.2
	10 : 5 : 1	0.46	9.2	0.05	1.0	0.06	1.2	0.65	13
	15 : 5 : 1	0.35	18	0.02	1.0	0.04	2.0	0.54	27
Бензол–ацетон	20 : 5 : 1	0.18	9.0	0.02	1.0	0.01	0.50	0.42	21
	2 : 8	0.55	0.65	0.85	1.0	0.62	0.73	0.90	1.1
	3 : 7	0.40	0.51	0.79	1.0	0.46	0.58	0.86	1.1
	5 : 5	0.14	0.27	0.52	1.0	0.12	0.23	0.86	1.7
	7 : 3	0.05	0.45	0.11	1.0	0.01	0.09	0.84	7.6

Изучение хроматографического поведения рассмотренных соединений позволило установить предпочтительные системы подвижных фаз для целей ТСХ (разделение соединений и их очистка от соэкстрактивных веществ). Системами, удовлетворяющими требованиям по разделению и очистке, являются гексан–диоксан–изопропанол (5 : 5 : 1 и 7.5 : 5 : 1) и бензол–ацетон (2 : 8 и 3 : 7). Среди них оптимальной является смесь бензола и ацетона в соотношении 3 : 7 (об.). При использовании этой подвижной фазы значения R_f (от 0.40 до 0.86) исследуемых соединений наиболее близки к оптимальным (от 0.2 до 0.8) [21].

2.4. Определение 2-А-4,6-ДНФ в ткани печени. Изучена возможность определения различных количеств 2-А-4,6-ДНФ в ткани печени после выдерживания свежеприготовлен-

ной модельной смеси в течение 15 мин (табл. 4). Установлено, что с использованием предлагаемой методики степень открытия 2-А-4,6-ДНФ в модельной биоматрице составляет $(86–88) \pm (3–4) \%$ для диапазона концентраций аналита 1.25–50.0 мг/25 г.

Табл. 4. Оценка содержания 2-А-4,6-ДНФ в ткани печени ($n = 5$; $P = 0.95$)

Table 4. Evaluation of 2-A-4,6-DNP content in liver tissue ($n = 5$; $P = 0.95$)

Введено 2-А-4,6-ДНФ (мг в 25 г ткани печени)	Найдено 2-А-4,6-ДНФ, % от внесенного количества				
	\bar{x}	s	s_r	$s_{\bar{x}}$	$\Delta\bar{x}$
1.25	86	3.4	0.040	1.5	4
2.50	87	3.2	0.037	1.4	4
10.0	88	2.8	0.032	1.2	3
25.0	88	2.6	0.030	1.2	3
50.0	88	2.5	0.028	1.1	3

3.4. Применение разработанной методики для оценки стабильности 2-А-4,6-ДНФ в биоматериале. Предложенный хроматографический подход использован для оценки стабильности 2-А-4,6-ДНФ в разлагающемся трупном материале (рис. 3). Установлено, что стабильность вещества варьируется в широких пределах в зависимости от температуры хранения биоматериала. Так, при $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ 2-А-4,6-ДНФ разлагается в течение 25 сут, при $9 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ – 35 сут, а при $2 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ – 45 сут, что свидетельствует о низкой стабильности соединения в условиях воздействия активных компонентов биоматериала (например, ферментов). При этом в контрольных опытах вне биоматрицы показана высокая стабильность 2-А-4-ДНФ. В течение 56 сут его содержание в субстанции практически не меняется и составляет 99.7–100 % с относительной ошибкой среднего результата $\pm 0.9–1 \%$.

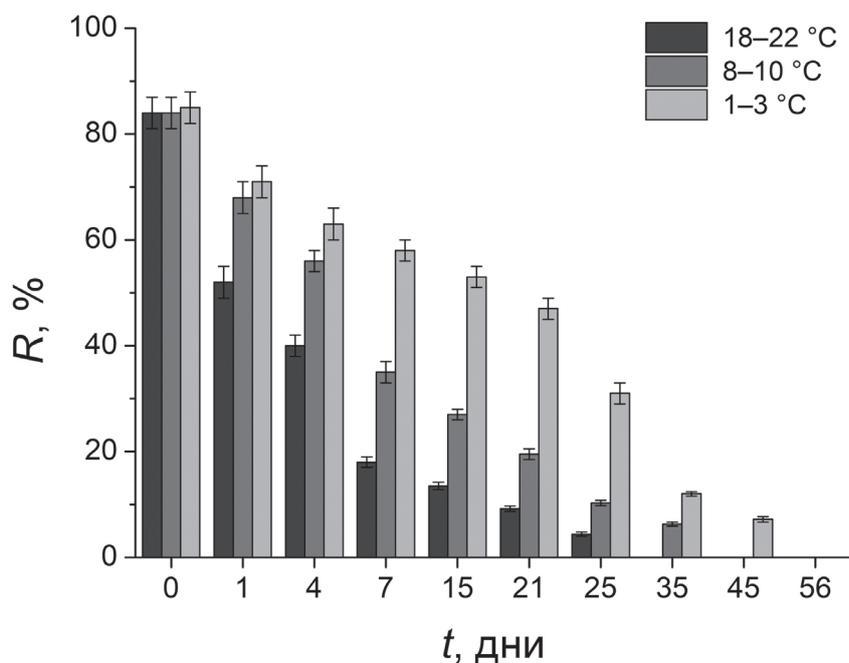


Рис. 3. Динамика деструкции 2-А-4,6-ДНФ в модельной смеси с тканью печени в различных температурных режимах

Fig. 3. Dynamics of 2-A-4,6-DNP destruction in a model mixture with liver tissue at different temperatures

Заключение

Разработан способ определения 2-А-4,6-ДНФ в ткани печени методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Валидация методики показывает ее соответствие параметрам линейности, селективности, прецизионности и правильности. Методика позволяет определять 2-А-4,6-ДНФ на уровне $(86-88) \pm (3-4) \%$ от номинального содержания в биоматрице. С применением разработанной методики оценена стабильность 2-А-4,6-ДНФ в разлагающейся ткани печени и показано, что температурные условия экспозиции биологических образцов оказывают значимое влияние на степень деструкции аналита (изменение температуры хранения от 1–3 °С до 8–10 и 18–22 °С приводит к уменьшению стабильности 2-А-4,6-ДНФ с 45 до 35 и 25 сут соответственно). Полученные результаты имеют перспективы практического применения для решения задач токсикологической и криминалистической экспертизы, а также контроля качества косметической продукции.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflicts of Interest. The authors declare no conflicts of interest.

Литература

1. Керемов А.Ф. Азометины на основе пикраминовой кислоты и замещенных бензальдегидов // Вестник Дагестанского государственного университета. Серия 1: Естественные науки. 2017. Т. 32, № 4. С. 84–90. <https://doi.org/10.21779/2542-0321-2017-32-4-84-90>.
2. Klapötke T.M., Lechner J.T., Stierstorfer J. Synthesis, characterization and derivatives of iso-picramic acid // Propellants, Explos., Pyrotech. 2022. V. 47, No 3. Art. e202100205. <https://doi.org/10.1002/prep.202100205>.
3. Wurzenberger M.H.H., Lechner J.T., Lommel M., Klapötke T.M., Stierstorfer J. Salts of picramic acid – nearly forgotten temperature-resistant energetic materials // Propellants, Explos., Pyrotech. 2020. V. 45, No 6. P. 898–907. <https://doi.org/10.1002/prep.201900402>.
4. Sukakul T., Limphoka P., Boonchai W. Hair dye allergy and hair dyes in Thai market: A literature review and recommendations // Thai J. Dermatol. 2018. V. 34, No 4. P. 245–265.
5. Мухторов Л.Г., Песцов Г.В., Никишина М.Б., Иванова Е.В., Амрощенко Ю.М., Кобраков К.И. Фунгицидная активность 2-амино-4,6-динитрофенола и его производных // Бутлеровские сообщения. 2018. Т. 55, № 7. С. 155–160. <https://doi.org/10.37952/ROI-jbc-01/18-55-7-155>.
6. Saleem A., Rafi N., Qasim S., Virk N.H., Ashraf U. Synthesis of picric acid at domestic scales // Int. J. Innovations Sci. Technol. 2019. V. 1, No 2. P. 62–78. <https://doi.org/10.33411/IJIST/20190102022>.
7. Мухторов Л.Г., Пешкова А.М., Кириллова Л.Л., Никишина М.Б., Иванова Е.В., Амрощенко Ю.М., Кобраков К.И. Изучение биологической активности 2-аминофенола и его нитропроизводных // Бутлеровские сообщения. 2018. Т. 56, № 10. С. 156–160. <https://doi.org/10.37952/ROI-jbc-01/18-56-10-156>.
8. 2-Amino-4,6-dinitrophenol. Database of Hazardous Materials. Ver. 13.06.2024. URL: <https://cameochemicals.noaa.gov/chemical/19770>.
9. O'Neil M.J. (Ed.) The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. Cambridge: R. Soc. Chem. Publ., 2013. 2708 p.
10. Goodfellow W.L., Jr., Burton D.T., Graves W.C., Hall L.W., Jr., Cooper K.R. Acute toxicity of picric acid and picramic acid to rainbow trout, *Salmo gairdneri*, and American oyster, *Crassostrea virginica* // J. Am. Water Resour. Assoc. 1983. V. 19, No 4. P. 641–648. <https://doi.org/10.1111/j.1752-1688.1983.tb02782.x>.
11. Becker L.C., Bergfeld W.F., Belsito D.V., Klaassen C.D., Marks J.G., Jr., Shank R.C., Slaga T.J., Snyder P.W., Andersen F.A. Amended safety assessment of sodium picramate and picramic acid // Int. J. Toxicol. 2009. V. 28, No 6 (Suppl 2). P. 205S–216S. <https://doi.org/10.1177/1091581809354650>.

12. Adams V.H. Chapter 10 – Wildlife toxicity assessment for *N*-methyl-*N*-2,4,6-tetranitroaniline (tetryl) // Williams M.A., Reddy G., Quinn M.J., Jr., Johnson M.S. (Eds.) *Wildlife Toxicity Assessments for Chemicals of Military Concern*. Elsevier, 2015. P. 205–216. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800020-5.00010-7>.
13. Nicoletti M., Frezza C., Tomassini L., Serafini M., Bianco A. Detection of picramic acid and picramate in henné products by NMR Spectroscopy // *Nat. Prod. Res.* 2019. V. 33, No 14. P. 2073–2078. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1485676>.
14. Шорманов В.К., Погосян Н.Г., Омельченко В.А. Изучение особенностей определения и характера локализации 2-амино-4,6-динитрофенола в организме теплокровных при летальных отравлениях // *Судебно-медицинская экспертиза*. 2024. Т. 67, № 3. С. 39–44. <https://doi.org/10.17116/sudmed20246703139>.
15. Илларионова Е.А., Чмелевская Н.В., Гончигова Ю.А. Химико-токсикологическое определение ламивудина в биологических объектах // *Судебно-медицинская экспертиза*. 2020. Т. 63. № 1. С. 42–46. <https://doi.org/10.17116/sudmed20206301142>.
16. Останин М.А., Чернова А.П., Шорманов В.К., Елизарова М.К. Применение классических методов для изолирования 2-метоксигидроксибензола (гваякола) из биологического материала // *Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье»*. 2019. № 2. С. 102–110. <https://doi.org/10.21626/vestnik/2019-2/12>.
17. Ремезова И.П., Лазарян Д.С., Воронков А.В., Авраменко Н.С., Максименко Т.И., Санжиева Д.Ю. Химико-токсикологический анализ сертиндола // *Судебно-медицинская экспертиза*. 2016. Т. 59, № 1. С. 35–39. <https://doi.org/10.17116/sudmed201659135-39>.
18. Расулов Ч.К., Гейдарли Г.З., Гасанова Г.Дж., Гурбанова С.Ш. Ацилирование фенолов уксусной кислотой и ее ангидридом (мини-обзор) // *Известия ТулГУ. Естественные науки*. 2023. № 4. С. 18–27. <https://doi.org/10.24412/2071-6176-2023-4-18-27>.
19. Кочергин П.М., Александрова Е.В., Корсунский В.С. Химические превращения 6-(1-метил-4-нитроимидазол-5)тиопурина (азатиоприна) // *Химия гетероциклических соединений*. 2000. № 3. С. 372–379.
20. Герасимов Д.А., Шорманов В.К., Северин А.П., Омельченко В.А. Синтез из нимесулида основных продуктов его метаболизма // *Вестник технологического университета*. 2018. Т. 21, № 4. С. 7–12.
21. Сумина Е.Г., Штыков С.Н., Уланова В.З., Кулакова Н.В. Тонкослойная хроматография. Теоретические основы и практическое применение. Саратов: Издательство Саратовского государственного университета, 2012. 128 с.

References

1. Keremov A.F. Azomethines based on picramic acid and substituted benzaldehydes. *Vestn. Dagest. Gos. Univ. Ser. 1: Estestv. Nauki*, 2017, vol. 32, no. 4, pp. 84–90. <https://doi.org/10.21779/2542-0321-2017-32-4-84-90>. (In Russian)
2. Klapötke T.M., Lechner J.T., Stierstorfer J. Synthesis characterization and derivatives of iso-picramic acid. *Propellants, Explos., Pyrotech.*, 2022, vol. 47, no. 3, art. e202100205. <https://doi.org/10.1002/prop.202100205>.
3. Wurzenberger M.H.H., Lechner J.T., Lommel M., Klapötke T.M., Stierstorfer J. Salts of picramic acid – nearly forgotten temperature-resistant energetic materials. *Propellants, Explos., Pyrotech.*, 2020, vol. 45, no. 6, pp. 898–907. <https://doi.org/10.1002/prop.201900402>.
4. Sukakul T., Limphoka P., Boonchai W. Hair dye allergy and hair dyes in Thai market: A literature review and recommendations. *Thai J. Dermatol.*, 2018, vol. 34, no. 4, pp. 245–265.
5. Mukhtorov L.G., Pestsov G.V., Nikishina M.B., Ivanova E.V., Atroshchenko Yu.M., Kobrakov K.I. Fungicidal activity of 2-amino-4,6-dinitrophenol and its derivatives. *Butlerovskie Soobshch.*, 2018, vol. 55, no. 7, pp. 155–160. <https://doi.org/10.37952/ROI-jbc-01/18-55-7-155>. (In Russian)

6. Saleem A., Rafi N., Qasim S., Virk N.H., Ashraf U. Synthesis of picric acid at domestic scales. *Int. J. Innovations Sci. Technol.*, 2019, vol. 1, no. 2, pp. 62–78. <https://doi.org/10.33411/IJIST/20190102022>.
7. Mukhtorov L.G., Peshkova A.M., Kirillova L.L, Nikishina M.B., Ivanova E.V., Atroshchenko Yu.M., Kobrakov K.I. Biological activity of 2-aminophenol and its nitro derivatives. *Butlerovskie Soobshch.*, 2018, vol. 56, no. 10, pp. 156–160. <https://doi.org/10.37952/ROI-jbc-01/18-56-10-156>. (In Russian)
8. 2-Amino-4,6-dinitrophenol. Database of Hazardous Materials. Ver. 13.06.2024. URL: <https://cameochemicals.noaa.gov/chemical/19770>.
9. O’Neil M.J. (Ed.) *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*. Cambridge, R. Soc. Chem. Publ., 2013. 2708 p.
10. Goodfellow W.L., Jr, Burton D.T., Graves W.C., Hall L.W., Jr, Cooper K.R. Acute toxicity of picric acid and picramic acid to rainbow trout, *Salmo gairdneri*, and American oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Am. Water Resour. Assoc.*, 1983, vol. 19, no. 4, pp. 641–648. <https://doi.org/10.1111/j.1752-1688.1983.tb02782.x>.
11. Becker L.C., Bergfeld W.F., Belsito D.V., Klaassen C.D., Marks J.G., Jr, Shank R.C., Slaga T.J., Snyder P.W., Andersen F.A. Amended safety assessment of sodium picramate and picramic acid. *Int. J. Toxicol.*, 2009, vol. 28, no. 6 (suppl. 2), pp. 205S–216S. <https://doi.org/10.1177/1091581809354650>.
12. Adams V.H. Chapter 10 – Wildlife toxicity assessment for *N*-methyl-*N*-2,4,6-tetranitroaniline (tetryl). In: Williams M.A., Reddy G., Quinn M.J., Jr, Johnson M.S. (Eds.) *Wildlife Toxicity Assessments for Chemicals of Military Concern*. Elsevier, 2015. pp. 205–216. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800020-5.00010-7>.
13. Nicoletti M., Frezza C., Tomassini L., Serafini M., Bianco A. Detection of picramic acid and picramate in henné products by NMR Spectroscopy. *Nat. Prod. Res.*, 2019, vol. 33, no. 14, pp. 2073–2078. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1485676>.
14. Shormanov V.K., Pogosyan N.G., Omelchenko V.A. The study of the features of the determination and nature of the localization of 2-amino-4,6-dinitrophenol in the body of warm-blooded animals in case of lethal poisoning. *Sud.-Med. Ekspert.*, 2024, vol. 67, no. 3, pp. 39–44. <https://doi.org/10.17116/sudmed20246703139>. (In Russian)
15. Illarionova E.A., Chmelevskaya N.V., Gonchikova Yu.A. Chemical and toxicological analysis of lamivudine in biological samples. *Sud.-Med. Ekspert.*, 2020, vol. 63, no. 1, pp. 42–46. <https://doi.org/10.17116/sudmed20206301142>. (In Russian)
16. Ostanin M.A., Chernova A.P., Shormanov V.K., Elizarova M.K. Application of classical methods for isolating 2-methoxyhydroxybenzene (guaicol) from biological materials. *Kursk. Nauchno-Prakt. Vestn. “Chel. Ego Zdorov’e”*, 2019, no. 2, pp. 102–110. <https://doi.org/10.21626/vestnik/2019-2/12>. (In Russian)
17. Remezova I.P., Lazaryan D.S., Voronkov A.V., Avramenko N.S., Maksimenko T.I., Sanzhieva D.Yu. Chemical and toxicological analysis of sertindole. *Sud.-Med. Ekspert.*, 2016, vol. 59, no. 1, pp. 35–39. <https://doi.org/10.17116/sudmed201659135-39>. (In Russian)
18. Rasulov Ch.K., Heydarli G.Z., Gasanova G.J., Gurbanova S.Sh. Acylation of phenols with acetic acid and its anhydride (a mini review). *Izv. TulGU. Estestv. Nauki*, 2023, no. 4, pp. 18–27. <https://doi.org/10.24412/2071-6176-2023-4-18-27>. (In Russian)
19. Kochergin P.M., Aleksandrova E.V., Korsunskii V.S. Chemical transformations of 6-[(1-methyl-4-nitro-5-imidazolyl)-thio]purine (azathioprine). *Chem. Heterocycl. Compd.*, 2000, vol. 36, no. 3, pp. 311–318. <https://doi.org/10.1007/BF02256869>.
20. Gerasimov D.A., Shormanov V.K., Severin A.P., Omelchenko V.A. Synthesis from nimesulide of the basic products of its metabolism. *Vestn. Tekhnol. Univ.*, 2018, vol. 21, no. 4, pp. 7–12. (In Russian)
21. Sumina E.G., Shtykov S.N., Uglanova V.Z., Kulakova N.V. *Tonkosloinaya khromatografiya. Teoreticheskie osnovy i prakticheskoe primeneniye* [Thin-Layer Chromatography. Theoretical Foundations and Practical Application]. Saratov, Izd. Sarat. Gos. Univ., 2012. 128 p. (In Russian)

Информация об авторах

Владимир Камбулатович Шорманов, доктор фармацевтических наук, профессор, профессор кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии, Курский государственный медицинский университет

E-mail: r-wladimir@yandex.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8872-0691>

Норайр Гургенович Погосян, аспирант кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии, Курский государственный медицинский университет

E-mail: nullal@ya.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0276-1711>

Сергей Юрьевич Гармонов, доктор химических наук, профессор, профессор кафедры аналитической химии, сертификации и менеджмента качества, Казанский национальный исследовательский технологический университет

E-mail: serggar@mail.ru

Владимир Александрович Омельченко, кандидат фармацевтических наук, начальник Экспертно-криминалистического центра, Главное управление МВД России по Краснодарскому краю

E-mail: eku_adis@krn.mvd.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0504-3478>

Author Information

Vladimir K. Shormanov, Dr. Sci. (Pharmaceutics), Full Professor, Department of Pharmaceutical, Toxicological, and Analytical Chemistry, Kursk State Medical University

E-mail: r-wladimir@yandex.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8872-0691>

Norayr G. Pogosyan, Postgraduate Student, Department of Pharmaceutical, Toxicological and Analytical Chemistry, Kursk State Medical University

E-mail: nullal@ya.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0276-1711>

Sergey Yu. Garmonov, Dr. Sci. (Chemistry), Full Professor, Department of Analytical Chemistry, Certification, and Quality Management, Kazan National Research Technological University

E-mail: serggar@mail.ru

Vladimir A. Omelchenko, Cand. Sci. (Pharmaceutics), Head of Forensic Investigation Center, Main Directorate of the Ministry of Internal Affairs of Russia for the Krasnodar Region

E-mail: eku_adis@krn.mvd.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0504-3478>

Поступила в редакцию 29.06.2024

Принята к публикации 14.10.2024

Received June 29, 2024

Accepted October 14, 2024