

# ОСОБЕННОСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГИДРОКСИБЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТЫ В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ

**В.К. Шорманов**<sup>1</sup>, докт. фарм. наук, **В.В. Чупак**<sup>2</sup>, канд. фарм. наук,  
**А.П. Асташкина**<sup>1</sup>, канд. хим. наук, **Г.Б. Голубицкий**<sup>3</sup>, докт. хим. наук,  
**Н.А. Кибец**<sup>1</sup>, **М.Н. Победоносцева**<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Курский государственный медицинский университет;

305041, Курск, ул. К. Маркса, д. 3

<sup>2</sup>Орловский государственный университет;

302026, Орел, ул. Комсомольская, д. 95

<sup>3</sup>ОАО «Фармстандарт-Лексредства»;

305022, Курская область, Курск, ул. 2-я Агрегатная, д. 1А/18

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

В качестве изолирующего агента для извлечения 2-гидроксibenзойной кислоты из биологических объектов предложена смесь ацетон–этилацетат (7:3). Определены оптимальные условия изолирования 2-гидроксibenзойной кислоты из биологического материала данным изолирующим агентом.

Показана возможность очистки анализируемого соединения от эндогенных веществ биоматериала сочетанием экстракции и жидкостной хроматографии в колонке силикагеля L 40/100 мкм.

Идентификацию 2-гидроксibenзойной кислоты в извлечениях из ткани печени и крови осуществляли методами ТСХ, УФ-спектрофотометрии и ВЭЖХ.

**Ключевые слова:** 2-гидроксibenзойная кислота, салициловая кислота, изолирование, идентификация, определение, биологический материал.

2-Гидроксibenзойная кислота (2-ГОВК), или салициловая кислота представляет собой бесцветные кристаллы с температурой плавления 159°C, сладковато-кислого вкуса. Растворимость 2-ГОВК (в 1 г на 100 г растворителя) в воде составляет 0,18 (20°C) и 1,76 (75°C), в диэтиловом эфире – 50,5 (15°C), в этиловом спирте – 39,2 (15°C) [2, 3]. 2-ГОВК оказывает антисептическое, противовоспалительное и кератолитическое действия [3, 9]. Данное вещество – полупродукт важнейших органических синтезов, метаболит ряда лекарственных средств из группы салицилатов. Оно содержится в некоторых растениях, например, иве белой – *Salix alba* L., тополе черном – *Populus nigra* L., таволге вязолистной – *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. и др. [11].

2-ГОВК токсична для теплокровных организмов: LD<sub>50</sub> при пероральном введении для крыс – 891 мг/кг,

для человека – предположительно 1750 мг/кг, смертельная доза ее натриевой соли для взрослых людей – 20–30 г [7, 8, 10].

Известны методики изолирования 2-ГОВК из органов и крови человека подкисленной водой или диэтиловым эфиром с последующей очисткой в тонком слое силикагеля и фотометрическим определением [1]. Предложено изолирование салицилатов из биологического материала 70% этиловым спиртом при 80°C и последующее их определение методом градиентной ВЭЖХ в колонке Zorbax SB-C18 [11]. Описано сорбционное выделение 2-ГОВК [сорбент с привитой фазой C18, элюент – метанол:вода:0,1М NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (75:15:10)] из биологических объектов с последующим определением вещества методом ВЭЖХ в колонке Prodigy C 8 [13]. Известны варианты определения 2-ГОВК в плазме крови сочетанием хроматографии и вольтамперометрии [12]. Для определения 2-ГОВК в растительном материале вещества изолируют метиловым спиртом или смесью вода–метиловый спирт–уксусная кислота (89:10:1) и очищают фильтрованием или высаливанием в сочетании с экстракцией смесью этилацетат–циклогексан [5, 6].

Вышеописанные методики характеризуются недостаточно высокой степенью извлечения 2-ГОВК и не предусматривают глубокой очистки анализируемого соединения от соэкстрагирующихся веществ сложных биологических матриц, например загнившего трупного материала; поэтому они малоэффективны при химико-токсикологических исследованиях.

Цель настоящего исследования – разработка методики определения 2-ГОВК в тканях органов и крови, применимой в химико-токсикологическом анализе.

#### Экспериментальная часть

Объект исследования – 2-ГОВК, содержание основного вещества  $\geq 99,5\%$ .

Проводили сравнительное изолирование 2-ГОВК из биологического материала водой, водными растворами, органическими растворителями, а также смесями органических растворителей. Для этого готовили модельные смеси 2-ГОВК (размер частиц – 5–50 мкм) и измельченной (размер частиц – 0,2–0,5 см) ткани печени с содержанием 12,5 мг вещества в 25 г биоматериала, которые выдерживали при температуре 18–22°C 20 мин. Осуществляли двукратное (каждый раз по 45 мин) изолирование 2-ГОВК при соотношении изолирующего агента и биоматериала 2:1 (по массе) [4]. Оба извлечения из каждой модельной смеси объединяли, часть объединенного извлечения наносили на пластины «Сорбфил» ПТСХ-АФ-В-УФ и хроматографировали, используя подвижную фазу гексан–ацетон (6:4) в присутствии вещества-свидетеля. На хроматограммах 2-ГОВК проявлялась в виде темного пятна в УФ-свете ( $R_f 0,72 \pm 0,04$ ).

С сорбента 2-ГОВК элюировали этиловым спиртом. Вещество идентифицировали по особенностям поглощения этанольного элюата в УФ-части спектра. По величине оптической плотности элюата, измеренной в области 301 нм, определяли количество 2-ГОВК спектрофотометрическим методом, используя уравнение градуировочного графика:  $A = 0,029009 \cdot C + 0,008217$ , где  $A$  – оптическая плотность;  $C$  – концентрация, мкг/мл. График линейен в интервале концентраций 1–40 мкг/мл. Коэффициент корреляции – 0,996. При определении 2-ГОВК методом спектрофотометрии в субстанции относительная ошибка среднего результата не превышала 1%.

Применяя эту методику, исследовали зависимость степени извлечения 2-ГОВК из биоматериала от продолжительности контакта изолирующей жидкости с биоматериалом, кратности настаивания и количественного соотношения изолирующего агента и биологической ткани.

Моделируя схему экстракционной очистки 2-ГОВК, исследовали ее экстрагируемость из водных растворов органическими растворителями. Изучены особенности очистки рассматриваемого вещества методом колоночной хроматографии. Остаток, полученный после испарения изолирующего агента из объединенного извлечения, растворяли в 3 мл ацетона, смешивали раствор с 1,5 г силикагеля L 40/100 мкм и, после испарения рас-

творителя, вносили данную смесь в колонку размером 490×10 мм, заполненную 8,5 г силикагеля L 40/100 мкм. Хроматографировали, собирая элюат фракциями по 2 мл. 2-ГОВК обнаруживали во фракциях методом ТСХ (пластины «Сорбфил» ПТСХ-АФ-А-УФ; подвижная фаза гексан–ацетон (6:4); наносимый на пластину объем каждой фракции – 5 мкл).

В найденных оптимальных условиях проводили контрольное хроматографирование на колонке извлечения из 25 г ткани печени, заведомо не содержащей 2-ГОВК. Фракции элюата, в которых теоретически возможно присутствие анализируемого вещества, объединяли, испаряли и растворяли остаток в 10 мл ацетона. 2,5 мл полученного раствора вносили в выпарительную чашку и испаряли растворитель в токе воздуха. Остаток обрабатывали 0,5 мл 10% раствора нитрата калия в серной кислоте ( $\rho = 1,83 \text{ г/см}^3$ ), прибавляли 1 мл воды, 8,5 мл 10% раствора гидроксида натрия и измеряли оптическую плотность раствора при 375 нм (условия количественного определения 2-ГОВК). Для предварительной идентификации 2-ГОВК изучена возможность применения нормальнофазовой ТСХ. Вещество хроматографировали вместе с другими салицилатами на пластинах «Сорбфил» ПТСХ-АФ-В-УФ (силикагель СТХ-1А) и «Силуфол» UV-254 (широкопористый силикагель).

Для подтверждающей идентификации и количественного определения 2-ГОВК использовали методы электронной спектрофотометрии и ВЭЖХ. Изучена возможность и определены оптимальные условия перевода 2-ГОВК в ацинитропроизводное для повышения чувствительности количественного определения вещества спектрофотометрическим методом. При использовании ВЭЖХ в качестве неподвижных фаз рассмотрены обращеннофазовые сорбенты Zorbax SB C8, Nova Pack C-18, Zorbax SB CN. Хроматографировали на приборе «Alliance» с диодно-матричным детектором. Для оценки хроматографического поведения 2-ГОВК в колонке сорбента рассчитывали значения времени удерживания ( $t_R$ ), объема удерживания ( $V_R$ ), коэффициента емкости ( $k'$ ), числа теоретических тарелок ( $N$ ) и фактора асимметрии пика.

Сравнение результатов изолирования 2-ГОВК из ткани печени различными растворителями (рис. 1) показало, что наибольшая степень извлечения данного вещества достигается при использовании изолирующего агента ацетон–этилацетат (7:3). Относительно полное извлечение 2-ГОВК из ткани печени смесью растворителей ацетон–этилацетат (7:3) достигается при продолжительности отдельного настаивания 30 мин (рис. 2). При этом достаточно двукратного настаивания биоматериала с изолирующим агентом при условии, что количество смеси

ацетон–этилацетат (7:3) в каждом случае должно превышать количество биоматериала как минимум в 2 раза по массе.

При экстракционной очистке 2-ГОВК оптимальными условиями ее перевода в молекулярной форме из водной фазы в органическую являются извлечение диэтиловым эфиром при pH 1–2,5 и высаливание хлоридом натрия, а условия ее перевода в ионизированной форме из органической фазы в водную – извлечение буфером с pH 9–10.

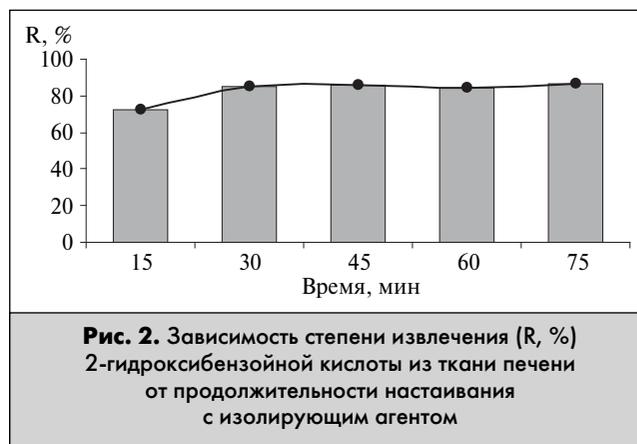
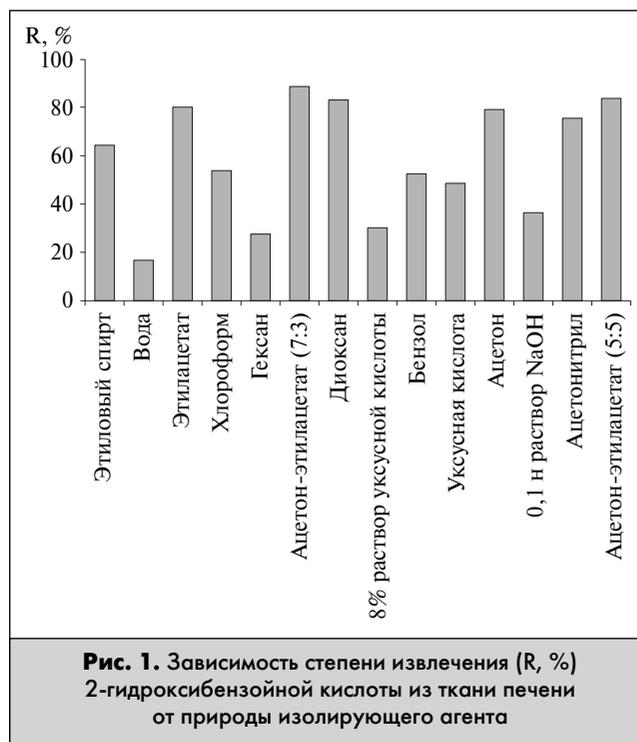
Изучение хроматографической подвижности 2-ГОВК в колонке силикагеля L 40/100 мкм показало, что в качестве элюента целесообразно использование смеси гексан–диэтиловый эфир (7:3). В этом случае анализируемое вещество присутствует в 5 – 11 фракциях элюата (9–22 мл). В контрольных опытах с тканью печени, не содержащей 2-ГОВК, установлено, что фоновое поглощение части элюата, соответствующего фракциям, в которых возможно присутствие рассматриваемого вещества, незначительно и составляет 0,003–0,004 при длине волны 375 нм (аналитическая длина волны при количественном определении методом спектрофотометрии).

Результаты исследования хроматографической подвижности 2-ГОВК в тонких слоях сорбентов (табл. 1) показали, что оптимальными для хроматографирования данного соединения в тонких слоях нормальнофазовых сорбентов на пластинах «Силуфол» UV-254 являются подвижные фазы гексан–ацетон (6:4) и гексан–диэтиловый эфир (4:6), а на пластинах «Сорб-фил» ПТСХ-АФ-В-УФ – подвижные фазы гексан–ацетон (6:4) и гексан–диэтиловый эфир (3:7).

На электронном спектре 2-ГОВК в этиловом спирте присутствуют выраженные полосы поглощения в следующих областях 206 нм ( $\epsilon=32290$ ), 234 нм ( $\epsilon=8010$ ) и 301 нм ( $\epsilon=4580$ ). Сравнение спектральных кривых 2-ГОВК, извлеченной из биоматериала и очищенной по предложенной схеме, со спектром вещества-стандарта в этиловом спирте, показало совпадение формы спектральной кривой и положения точек максимумов.

Для количественного определения 2-ГОВК фотометрическим методом ее переводили в динитропроизводное [обработка в течение 7,5 мин при температуре 20°C 10% раствором нитрата калия в серной кислоте ( $\rho=1,83 \text{ г/см}^3$ )], а затем в аци-нитросоль (прибавление избытка 10% раствора гидроксида натрия). По оптической плотности раствора при 375 нм оценивали количественное содержание вещества, используя уравнение градуировочного графика:  $A = 0,064108 \cdot C + 0,007009$ , где A – оптическая плотность, C – концентрация вещества в фотометрируемом растворе, мкг/мл. Относительная ошибка среднего результата при определении 2-ГОВК в субстанции ( $n=6$ ;  $p=0,95$ ) – 1,15%.

Оптимальное условие для определения 2-ГОВК методом ВЭЖХ: использование колонки 140×4,6 мм Zorbax SB CN (3,5 мкм) и подвижной фазы ацетонитрил – 0,025 М раствор  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  с pH 5,7 (1:9 по объему), подаваемой со скоростью 1 мл/мин при температуре колонки 20°C. Аналитическая длина волны – 234 нм. Параметры хроматографирования составляют при этом: время удерживания – 3,46 мин, коэффициент емкости – 1,56, число теоретических тарелок – 3190, фактор асимметрии пика – 0,97%. Открываемый минимум – 0,02 мкг 2-ГОВК в хроматографируемой пробе. На хроматограммах вещества, извлеченного из биоматериала, по сравнению с хроматограммой стандарта нет дополнительных пиков и заметного увеличения фонового поглощения. Параметры хроматографирования анализируемого вещества и стандарта совпадали.



**РЕЗУЛЬТАТЫ ХРОМАТОГРАФИРОВАНИЯ 2-ГИДРОКСИБЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТЫ  
В ТОНКИХ СЛОЯХ НОРМАЛЬНОФАЗОВЫХ СОРБЕНТОВ**

Подвижные фазы	2-ГОВБК		Фенил-салицилат		Гидрокси-бензол		2-Ацетил-оксибензойная кислота		4-Амино-салициловая кислота		5-Нитро-салициловая кислота	
	Rf	Rf	Rs	Rs	Rs	Rs	Rf	Rs	Rf	Rs	Rf	Rs
<i>Широкопористый силикагель (пластины «Силуфол» UV-254)</i>												
Гексан	0	0	0,12	6,00	0,02	1,00	0	0	0	0	0	0
Этилацетат	0,96	1,03	0,96	1,03	0,93	1,00	0,92	0,98	0,89	0,96	0,6	0,64
Диэтиловый эфир	0,93	0,98	0,94	1,00	0,94	1,00	0,93	0,98	0,90	0,95	0,81	0,86
Гексан—этилацетат (6:4)	0,65	0,88	0,93	1,26	0,74	1,00	0,38	0,516	0,26	0,36	0,40	0,55
Гексан—этилацетат (4:6)	0,89	0,98	0,9	1,04	0,90	1,00	0,706	0,78	0,62	0,69	0,52	0,57
Гексан—диэтиловый эфир (4:6)	0,70	0,97	0,90	1,25	0,72	1,00	0,37	0,51	0,30	0,41	0,47	0,65
Гексан—диэтиловый эфир (5:5)	0,62	0,96	0,89	1,95	0,64	1,00	0,20	0,31	0,17	0,26	0,39	0,60
Гексан—ацетон (6:4)	0,55	0,93	0,76	1,29	0,59	1,00	0,45	0,76	0,35	0,59	0,45	0,76
Гексан—этанол (7:3)	0,26	0,92	0,82	2,92	0,28	1,00	0,14	0,50	0,10	0,35	0,17	0,60
<i>Силикагель СТХ-1А (пластины «Сорбфил» ПТСХ-АФ-В-УФ)</i>												
Гексан	0	0	0,15	6,00	0,02	1,00	0	0	0	0	0	0
Этилацетат	0,18	0,23	0,92	1,19	0,77	1,00	0,51	0,66	0,10	0,13	0,05	0,06
Диэтиловый эфир	0,53	0,54	0,97	1	0,97	1,00	0,86	0,88	0,38	0,39	0,05	0,05
Гексан—этилацетат (6:4)	0,23	0,25	0,93	1,03	0,90	1,00	0,48	0,53	0,07	0,07	0,03	0,03
Гексан—этилацетат (4:6)	0,27	0,32	0,88	0,97	0,83	1,00	0,40	0,48	0,04	0,04	0	0
Гексан—диэтиловый эфир (4:6)	0,28	0,33	0,88	1,04	0,84	1,00	0,44	0,52	0,07	0,08	0	0
Гексан—диэтиловый эфир (3:7)	0,33	0,39	0,91	1,09	0,83	1,00	0,53	0,63	0,06	0,07	0,15	0,18
Гексан—ацетон (7:3)	0,33	0,44	0,87	1,17	0,74	1,00	0,39	0,52	0,04	0,05	0,03	0,04
Гексан—ацетон (6:4)	0,72	0,80	0,90	1,01	0,89	1,00	0,82	0,92	0,09	0,10	0,11	0,12

**Методика определения 2-ГОВБК  
в биологическом материале**

*Изолирование.* 25,00 г мелкоизмельченной до размеров частиц 0,2–0,5 см ткани печени или крови, содержащих от 2,50 до 50,00 мг 2-ГОВБК, заливают 50 г смеси ацетон—этилацетат (7:3) и выдерживают 30 мин при периодическом перемешивании. Извлечение сливают, а процесс настаивания повторяют. Отдельные извлечения объединяют в фарфоровой чашке и упаривают в токе воздуха при температуре 18–22°C до сухого остатка.

*Экстракционная очистка.* Сухой остаток, полученный на завершающем этапе изолирования, растворяют в 10 мл хлороформа и экстрагируют буферным раствором с рН 9–10 (10 мл×2). Экстракты объединяют, подкисляют 24% раствором хлороводородной кислоты до рН 1–2, насыщают хлоридом натрия и экстрагируют диэтиловым эфиром (20 мл×2). Экстракты объединяют в выпарительной чашке и испаряют экстрагент до сухого остатка в токе воздуха при 18–22°C.

*Очистка методом колоночной хроматографии.* Сухой остаток растворяют в 2–3 мл ацетона, смешива-

ют раствор с 1,5 г силикагеля L 40/100 мкм, и после испарения растворителя вносят смесь в стеклянную колонку размером 490×11 мм, заполненную 8,5 г силикагеля L 40/100 мкм. Элюируют смесью гексан—диэтиловый эфир (7:3). Элюат собирают фракциями по 2 мл каждая. Фракции с 5 по 11 включительно объединяют, испаряют в токе воздуха при температуре 18–22°C.

Остаток растворяют в ацетоне, раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводят ацетоном до метки. В 3 выпарительные чашки вносят 0,2–2,5; 0,2–2,5 и 1,0–4,0 мл ацетонового раствора и испаряют растворитель, получая сухие остатки.

*Идентификация методом ТСХ.* Остатки в чашках 1 и 2 растворяют (каждый) в небольшом объеме ацетона. Образующиеся растворы количественно наносят в виде полос на линии старта пластины «Силуфол» UV-254 (раствор из чашки 1) и пластины «Сорбфил» ПТСХ-АФ-В-УФ (раствор из чашки 2). Хроматографируют в подвижной фазе гексан—ацетон (6:4) в присутствии вещества-свидетеля. Анализируемое вещество

Таблица 2

**РЕЗУЛЬТАТЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ  
2-ГИДРОКСИБЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТЫ В МОДЕЛЬНЫХ  
СМЕСЯХ С БИОЛОГИЧЕСКИМИ ОБЪЕКТАМИ**

Биологический объект	Внесено 2-ГОВБ (мг в 25 г биологического объекта)	Найдено 2-ГОВБ, % (n=5; p=0,95)			
		$\bar{x}$	S	$S_x$	$\Delta\bar{x}$
Ткань печени	1,25	83,89	4,23	1,89	4,85
	2,5	84,58	3,76	1,68	4,31
	5,0	84,94	3,33	1,49	3,82
	12,5	85,18	2,94	1,32	3,38
	25,0	85,33	2,84	1,27	3,26
	50,0	85,52	2,57	1,15	2,95
Кровь	1,25	86,15	3,97	1,77	4,56
	2,5	86,73	3,44	1,54	3,95
	5,0	87,08	3,02	1,35	3,47
	12,5	87,22	2,77	1,24	3,18
	25,0	87,28	2,65	1,19	3,05
	50,0	87,51	2,47	1,11	2,84
Гнилостно изменённая ткань печени	1,25	83,72	4,37	1,95	5,02
	2,5	84,49	3,97	1,77	4,56
	5,0	84,78	3,46	1,55	3,98
	12,5	85,24	3,14	1,41	3,61
	25,0	85,39	3,02	1,35	3,47
	50,0	85,44	2,80	1,25	3,22

идентифицируют по величине Rf, которая составляет 0,55±0,03 при использовании пластин «Силуфол» UV-254 и 0,72±0,04 при использовании пластин «Сорбфил» ПТСХ-АФ-В-УФ.

*Идентификация методом ВЭЖХ.* Остаток в чашке 3 растворяют в 2,5 мл ацетонитрила, раствор переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, и доводят содержимое колбы до метки 0,025 М раствором КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> с рН 5,7. 2–16 мкл полученного раствора вводят в хроматограф. Хроматографируют по вышеописанной схеме.

Время удерживания анализируемого соединения должно совпадать с таковым вещества-стандарта и составляет 3,46±0,05 мин.

*Идентификация методом спектрофотометрии.* После идентификации методом ТСХ участок хроматограммы пластины «Силуфол» UV-254 с анализируемым веществом вырезают и элюируют вещество с сорбента 5–10 мл этилового спирта в течение 15 мин. Поглощение элюата исследуют в интервале длин волн 200–360 нм (спектрофотометр СФ-2000). Раствор сравнения – элюат, полученный в контрольном опыте. 2-ГОВБ идентифицируют по форме спектральной кривой и положению максимумов (206, 234 и 301 нм).

*Количественное определение.* Этанольный элюат после определения методом спектрофотометрии упаривают в выпарительной чашке до получения сухого остатка. К остатку прибавляют 0,5 мл 10% раствора нитрата калия в серной кислоте (ρ=1,83 г/см<sup>3</sup>), смесь выдерживают 7,5 мин, разбавляют 1 мл воды и обрабатывают 8,5 мл 10% раствора гидроксида натрия. По оптической плотности образующегося окрашенного раствора (λ=375 нм) определяют количественное содержание 2-ГОВБ, используя уравнение градуировочного графика.

Согласно результатам, при увеличении содержания 2-ГОВБ в модельных смесях от 1,25 до 50,00 мг при постоянной массе навески ткани печени (25,00 г) изменение значения степени извлечения не превышает 2% (табл. 2).

Предложенная методика позволяет определить содержание 2-ГОВБ: в ткани печени – 83,89–85,52±2,95–4,85%, в крови – 86,15–87,51±2,84–4,56%, в гнилостно измененной печени – 83,72–85,44±3,22–5,02%. Открываемый минимум вещества в ткани печени, крови и гнилостно измененной ткани печени составля-

ет 0,10, 0,08 и 0,12 мг в 100 г биоматериала. Методика проста и не требует значительных затрат времени на ее воспроизведение, она может быть использована в практике химико-токсикологических и клинических исследований в случаях отравления 2-ГОВБ.

**Выводы**

1. Обосновано применение смеси этилацетат–ацетон (7:3) в качестве изолирующего агента при химико-токсикологическом исследовании 2-гидроксибензойной кислоты. Найдены оптимальные условия изолирования.
2. Для очистки извлекаемого из биологического материала анализируемого соединения предложено сочетание жидкость–жидкостной экстракции и хроматографии на колонке силикагеля L 40/100 мкм.
3. Разработана методика определения 2-гидроксибензойной кислоты в тканях органов и крови. При содержании вещества 1,25–50,00 мг в 25 г биоматериала методика позволяет определять 83,72–87,51% анализируемого соединения с полушириной доверительного интервала 2,95–5,02 %.

**ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES**

1. Никитин П.В. Судебно-химическое исследование биоматериала при смертельном отравлении ацетилсалициловой кислотой. Актуальные проблемы судебной медицины и медицинского права: Материалы межрегиональной научно-практической конференции с международным участием. М.: ИЦ «ЮрИнфоЗдрав» 2012; 112–114. (Nikitin P.V. Forensic chemical study of biological material at the fatal poisoning of acetylsalicylic acid. Actual problems of forensic medicine and medical law: Materials of inter-regional scientific-practical conference with international participation. Moscow: NP IC «YurInfoZdrav», 2012; 112–114) (in Russian).

2. Полюдек Фабини Р., Бейрих Т. Органический анализ. Л.: Химия, 1981; 624. (Poljudek Fabini R., Beyrich T. Organic Analysis. Leningrad: Khimiya, 1981; 624) (in Russian).
3. Химический энциклопедический словарь. Под ред. И.Л. Кнунянца. М.: Советская энциклопедия, 1983; 792. (Encyclopedic Dictionary of Chemistry (ed. by I.L. Knunjants). Moscow: Sovetskaya Entsiklopediya, 1983; 792) (in Russian).
4. Шорманов В.К., Герасимов Д.А., Омелченко В.А. Особенности изолирования 4-нитроанилина из биологического материала. Судебно-медицинская экспертиза, 2014; 57 (3): 34–38. (Shormanov V.K., Gerasimov D.A., Omelchenko V.A. Properties of 4-nitroaniline isolation from biological material. Sudebno-meditsinskaya expertiza, 2014; 57 (3): 34–38) (in Russian).
5. Chen W.-T., Wang C.-I., Fu S.F., Lin Y.W. Analysis of Salicylic Acid in Tobacco Leaves Using Capillary Zone Electrophoresis with UV Detection. GSTF International Journal of Chemical Sciences (J. Chem.), 2014; 1 (2): 1–7.
6. Guzmán-Télez E., Montenegro D.D., Benavides-Mendoza A.B. Concentration of Salicylic Acid in Tomato Leaves after Foliar Aspersions of This Compound. American Journal of Plant Sciences, 2014; 5: 2048–2056.
7. Itami T., Kanoh S. Studies on the pharmacological bases of fetal toxicity of drugs (VII). Enhancement effect of bacterial pyrogen on the fetal toxicity of salicylic acid. Nihon Yakurigaku Zasshi, 1984; 84 (5): 411–416.
8. Lück E., Jager M. Antimicrobial Food Additives: Characteristics, Uses, Effects. Vol. 2. Berlin-Heidelberg-New-York: Springer-Verlag, 1997; 265.
9. McCarty M.F., Block K.I. Preadministration of high-dose salicylates, suppressors of NF-kappaB activation, may increase the chemosensitivity of many cancers: an example of proapoptotic signal modulation therapy. Integr. Cancer Ther., 2006; 5 (3): 252–268.
10. Rivera W., Kleinschmidt K.C., Velez L.I., Shepherd G., Keyes D.C. Delayed salicylate toxicity at 35 hours without early manifestations following a single salicylate ingestion. Ann. Pharmacother., 2004; 38 (7–8): 1186–1188.
11. Toiu A., Vlase L., Oniga I., Benedec D., Tămaș M. HPLC Analysis of salicylic derivatives from natural products. Farmacia, 2011; 59 (1): 106–112.
12. Torriero A.A.J., Luco J.M., Sereno L., Raba J. Voltammetric determination of salicylic acid in pharmaceuticals formulations of acetylsalicylic acid. Talanta, 2004; 62: 247–254.
13. Yates R.L., Havery D.C. Determination of phenol, resorcinol, salicylic acid and -hydroxy acids in cosmetic products and salon preparations. J. Cosmet. Sci., 1999; 50: 315–325.

*Поступила 3 июня 2015 г.*

## **SPECIFIC FEATURES OF THE DETERMINATION OF HYDROXYBENZOIC ACID IN BIOLOGICAL MATERIAL** **V.K. Shormanov<sup>1</sup>, PhD; V.V. Chupak<sup>2</sup>, PhD; A.P. Astashkina<sup>1</sup>, PhD; G.B. Golubitsky<sup>3</sup>, PhD; N.A. Kibets<sup>1</sup>;** **M.N. Pobedonostva<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Kursk State Medical University; 3, K. Marx St., Kursk 305041*

<sup>2</sup>*Oryol State University; 95, Komsomolskaya St., Oryol 302026*

<sup>3</sup>*ОАО «Farmstandart-Leksredstva»; 1A/18, Second Agregatnaya St., Kursk 305022*

### **SUMMARY**

An acetone-ethyl acetate (7:3) mixture was proposed as an insulator for the extraction of 2-hydroxybenzoic acid (2-HOBA) from biological objects. The optimal conditions for isolating 2-HOBA with this insulator from biological material were determined.

The paper shows how the compound in question can be purified from the endogenous substances of the biomaterial through extraction in combination with liquid chromatography in a column packed with silica gel L 40/100  $\mu\text{m}$ . Thin-layer chromatography, ultraviolet spectrophotometry, and high-performance liquid chromatography were used for the identification of 2-HOBA in the extracts from liver tissue and blood. The photometric isolation of 2-HOBA from organ tissues and blood was quantified using a reaction to obtain an acy-nitro derivative of the substances in question. The least detectable level of 2-HOBA in liver tissue, blood, and putrefactive liver tissue was 0.10, 0.08, and 0.12 mg per 100 g of the biomaterial, respectively.

**Key words:** 2-hydroxybenzoic acid, salicylic acid, isolation, identification, determination, biological material.