



# 2,6-Di-*tert*-butylo-4-metylofenol

## Dokumentacja proponowanych dopuszczalnych wielkości narażenia zawodowego<sup>1,2</sup>

### 2,6-Di-*tert*-butyl-4-methylphenol

### Documentation of proposed values of occupational exposure limits (OELs)

dr RENATA SOĆKO

<https://orcid.org/0000-0002-4304-9563>

e-mail: [renata.socko@imp.lodz.pl](mailto:renata.socko@imp.lodz.pl)

dr JAN GROMIEC

<https://orcid.org/0002-0002-0550-6655>

Instytut Medycyny Pracy im. prof. dr. med. Jerzego Nofera  
Nofer Institute of Occupational Medicine, Łódź, Poland

<b>NDS</b>	10 mg/m <sup>3</sup>
<b>NDSch</b>	nie ustalono
<b>NDSP</b>	nie ustalono
<b>DSB</b>	nie ustalono

Data zatwierdzenia przez Zespół Ekspertów: 19-21.10.2021 r.

Data zatwierdzenia przez Komisję ds. NDS i NDN: 2.12.2021 r.

#### Streszczenie

2,6-Di-*tert*-butylo-4-metylofenol (BHT) to organiczny związek chemiczny z grupy fenoli, który występuje w postaci białych kryształów lub jasnożółtego proszku. Substancja ta jest produkowana i/lub importowana do Europejskiego Obszaru Gospodarczego w ilości 10 000 ÷ 100 000 t/rok. BHT ze względu na właściwości przeciwutleniające jest stosowany m.in. w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym i kosmetycznym w celu ochrony materiałów przed utlenianiem podczas długotrwałego przechowywania. Pomimo powszechnego stosowania BHT doniesienia o następstwach narażenia na tę substancję u ludzi są sporadyczne i ograniczają się zasadniczo do reakcji skórnych. BHT charakteryzuje się niską toksycznością ostrą po jednorazowym podaniu dożołądkowym lub skórny. W badaniach doświadczalnych wykazano, że zarówno u gryzoni, jak i naczelnych wątroba jest narządem krytycznym działania związku. Badania działania mutagennego i genotoksycznego BHT przeprowadzone w warunkach *in vitro* i *in vivo*

<sup>1</sup> Wartość NDS 2,6-di-*tert*-butylo-4-metylofenolu została w dniu 2.12.2021 r. przyjęta na 100. posiedzeniu Międzyresortowej Komisji do spraw Najwyższych Dopuszczalnych Stężeń i Natężeń Czynników Szkodliwych dla Zdrowia w Środowisku Pracy i następnie została przedłożona ministrowi właściwemu ds. pracy (wniosek nr 116) w celu jej wprowadzenia do rozporządzenia w załączniku nr 1 w części A wykazu najwyższych dopuszczalnych stężeń i natężeń czynników szkodliwych w środowisku pracy.

<sup>2</sup> Opracowano i wydano na podstawie wyników V etapu programu wieloletniego „Poprawa bezpieczeństwa i warunków pracy”, finansowanego w zakresie badań naukowych i prac rozwojowych ze środków Narodowego Centrum Badań i Rozwoju. Projekt nr IL.PB.03 pt. „Opracowanie dokumentacji dopuszczalnych poziomów narażenia zawodowego dla 30 czynników chemicznych szkodliwych dla zdrowia, w tym rakotwórczych”.  
Koordynator programu: Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy

wykazały, że BHT nie stanowi istotnego ryzyka mutagennego i genotoksycznego dla człowieka. U potomstwa samic, które w okresie ciąży narażano na BHT drogą pokarmową, obserwowano wpływ związku na toksyczność rozwojową obejmującą skutki fetotoksyczne i embriotoksyczne. Nie stwierdzono wpływu narażenia na BHT na parametry reprodukcji. Podstawą do wyliczenia wartości NDS była wartość NOAEL wynosząca 25 mg/kg mc./dzień uzyskana z badania przewlekłego przeprowadzonego na szczurach. Po zastosowaniu kilku współczynników niepewności zaproponowano wartość NDS 2,6-di-*tert*-butylo-4-metylofenolu na poziomie 10 mg/m<sup>3</sup>. Ustalona wartość powinna zabezpieczyć pracowników przed skutkami działania układowego i ewentualnego drażniącego związku. Nie ma podstaw do ustalenia wartości NDSCh oraz wartości dopuszczalnego stężenia w materiale biologicznym. Zakres tematyczny artykułu obejmuje zagadnienia zdrowia oraz bezpieczeństwa i higieny środowiska pracy będące przedmiotem badań z zakresu nauk o zdrowiu i inżynierii środowiska.

**Słowa kluczowe:** 2,6-di-*tert*-butylo-4-metylofenol, toksyczność, narażenie zawodowe, NDS, nauki o zdrowiu, inżynieria środowiska.

## Abstract

2,6-Di-*tert*-butyl-4-methylphenol (BHT) is an organic chemical compound from the group of phenols, which occurs in the form of white crystals or in the form of a light yellow powder. This substance is manufactured and/or imported into the European Economic Area in quantities of 10.000–100.000 t/year. BHT due to its antioxidant properties is used, e.g., in the food, pharmaceutical, cosmetic industries to protect materials from oxidation during long-term storage. Despite the widespread use of BHT, reports of the consequences of exposure to this substance in humans are sporadic and are generally limited to skin reactions. BHT is characterized by low acute toxicity after a single intragastric or cutaneous administration. Experimental studies have shown that in both rodents and primates, the liver is a critical organ of BHT action. In vitro and in vivo studies of the mutagenicity and genotoxic effects of BHT have shown that BHT does not pose a significant mutagenic and genotoxic risk to humans. In offspring of mammals who were exposed to BHT by the oral route during pregnancy, effects of the compound on developmental toxicity including fetotoxic and embryotoxic effects were observed. There was no effect of BHT exposure on reproduction parameters. The basis for calculating MAC was a NOAEL of 25 mg/kg/day obtained from a chronic study in rats. After applying several uncertainty factors, MAC of 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol of 10 mg/m<sup>3</sup> was proposed. The established value should protect employees from the effects of systemic action and possible irritating relationship. There are no grounds for establishing the value of STEL and the value of the permissible concentration in biological material. This article discusses the problems of occupational safety and health, which are covered by health sciences and environmental engineering.

**Keywords:** butylated hydroxytoluene, toxicity, occupational exposure, MAC, health sciences, environmental engineering.

## CHARAKTERYSTYKA SUBSTANCJI, ZASTOSOWANIE, NARAŻENIE ZAWODOWE

### Ogólna charakterystyka substancji

2,6-Di-*tert*-butylo-4-metylofenol (BHT) to organiczny związek chemiczny z grupy fenoli.

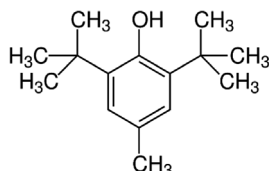
Ogólna charakterystyka 2,6-di-*tert*-butylo-4-metylofenolu (ECHA 2021; PubChem 2021):

– wzór

sumaryczny C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>O;  
[(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C]<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>2</sub>(CH<sub>3</sub>)OH

– wzór

strukturalny



– SMILES <sup>3</sup>	CC1=CC(=C(C(=C1)C(C)(C)C)O)C(C)(C)C
– nazwa chemiczna	2,6-bis(1,1-dimetyloetylo)-4-metylofenol (BHT jest najczęściej stosowanym identyfikatorem tej substancji)
– nazwa wg CAS	butylowany hydroksytoluen
– nazwa wg IUPAC	2,6-di- <i>tert</i> -butylo-4-metylofenol

<sup>3</sup> Sposób jednoznacznego zapisu struktury cząsteczek związków chemicznych z wykorzystaniem ciągu znaków ASCII.

- numer w rejestrze CAS 128-37-0
- numer WE 204-881-4
- synonimy: butylowany hydroksytoluen; 3,5-di-*tert*-butylo-4-hydroksytoluen; 2,6-di-*tert*-butyl-*p*-krezol.
- lepkość kinematyczna: 3,47 mm<sup>2</sup>/s w temp. 0 °C  
1,54 mm<sup>2</sup>/s w temp. 120 °C
- indeks refrakcji 1,4859 w temp. 75 °C
- rozpuszczalność w wodzie rozpuszcza się bardzo słabo (0,6 mg/l w temp. 25 °C)
- rozpuszczalność w innych rozpuszczalnikach rozpuszcza się w różnym stopniu w większości rozpuszczalników organicznych (np. w metanolu, acetonie, toluenie)
- współczynniki przeliczeniowe: 1 ppm = 9,01 mg/m<sup>3</sup>  
1 mg/m<sup>3</sup> = 0,11 ppm (25 °C, 101,3 kPa).

2,6-Di-*tert*-butylo-4-metylofenol nie ma klasyfikacji zharmonizowanej w Unii Europejskiej (Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008).

### Właściwości fizykochemiczne

Właściwości fizykochemiczne 2,6-di-*tert*-butylo-4-metylofenolu (ACGIH 2001; ECHA 2021; NIOSH 2021; PubChem 2021):

- postać, wygląd ciało stałe w postaci białych kryształów, może występować również w postaci jasnożółtego proszku
- zapach bezwonny lub słabo wyczuwalny, zbliżony do zapachu fenolu
- masa cząsteczkowa 220,35 g/mol
- temperatura topnienia 70 °C
- temperatura wrzenia 265 °C
- temperatura zapłonu 127 °C (otwarty tygiel)
- temperatura samozapłonu 470 °C
- prężność par: 0,01 mmHg  
1,3 Pa w temp. 20 °C
- stężenie pary nasyconej ~120 mg/m<sup>3</sup>
- gęstość 1,048 g/cm<sup>3</sup> (w temp. 20 °C)
- gęstość par względem powietrza 7,6 (powietrze = 1)
- współczynnik podziału oktanol-woda (logPow) 5,1

### Otrzymywanie, zastosowanie i narażenie zawodowe

2,6-Di-*tert*-butylo-4-metylofenol jest otrzymywany w reakcji *p*-krezolu z izobutylenem przeprowadzanej w temperaturze 70 °C przy użyciu kwasu siarkowego jako katalizatora (Röper i in. 2000).

2,6-Di-*tert*-butylo-4-metylofenol jest produkowany i/lub importowany do Europejskiego Obszaru Gospodarczego w ilości 10 000 ÷ 100 000 t rocznie. Na stronie ECHA substancję zarejestrowało 25 rejestrujących z różnych państw: Belgii, Francji, Irlandii, Niemiec, Hiszpanii, Wlk. Brytanii, Holandii, Szwecji i Luksemburga (ECHA 2021).

BHT ze względu na właściwości przeciwutleniające, a więc przeciwdziałające tworzeniu się wolnych rodników, jest stosowany w różnych gałęziach przemysłu. Stosowanie BHT w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym i kosmetycznym zapobiega psuciu się produktów żywnościowych oraz leczniczych (Janiski i in. 2008).

Właściwości antyoksydacyjne BHT zostały również wykorzystane przy produkcji olejów smarowych, turbinowych i izolacyjnych, wosków, kauczuku syntetycznego i naturalnego, farb, tworzyw sztucznych i elastomerów. BHT chroni te materiały przed utlenianiem podczas długotrwałego przechowywania (ACGIH 2001). BHT dodaje się

do benzyny stosowanej w pojazdach naziemnych i lotniczych (ECHA 2021).

Substancja ta znajduje zastosowanie także w materiałach opakowaniowych do żywności, takich jak papier woskowany, tektura i polietylen, ponieważ opóźnia proces jęlczenia olejów i tłuszczów (ACGIH 2001).

BHT występuje w produktach: myjąco-czyszczących (płyny do prania, produkty do pielęgnacji samochodów), w środkach ochrony roślin, klejach i uszczelniaczach, pastach i woskach, środkach zapachowych, odświeżaczach powietrza i nawozach. Ponadto stosowany jest w płynach chłodzących w lodówkach, elektrycznych grzejnikach na bazie

oleju, w płynach hydraulicznych, w oleju silnikowym oraz w płynach hamulcowych (ECHA 2021).

W warunkach pracy zawodowej (produkcja i stosowanie substancji) głównymi drogami narażenia na BHT jest droga inhalacyjna (wdychanie par lub aerozoli substancji) i kontakt ze skórą.

Dotychczas w Polsce nie ustalono wartości najwyższego dopuszczalnego stężenia BHT w środowisku pracy, substancja ta nie jest więc monitorowana i dlatego nie znajduje się w ogólnopolskiej bazie danych prowadzonej przez Wojewódzką Stację Sanitarno-Epidemiologiczną w Bydgoszczy i Główny Inspektorat Sanitarny (GIS 2019).

## DZIAŁANIE TOKSYCZNE NA LUDZI

### Obserwacje kliniczne. Działanie ostre i krótkoterminowe

Ustalona przez FAO/WHO wartość ADI (*acceptable daily intake*, dopuszczalne dzienne spożycie (pobranie) – ilość danej substancji, która pobierana codziennie z żywnością, wodą, powietrzem i lekami według aktualnego stanu wiedzy nie przedstawia zagrożenia dla człowieka) dla 2,6-di-*tert*-butylo-4-metylofenolu (BHT) wynosi 0,5 mg/kg mc./dzień.

U dwóch pacjentów przyjmujących duże dawki BHT (4 lub 80 g) obserwowano takie objawy, jak: zawroty głowy, krótkotrwałą utratę przytomności, niestabilność chodu, niewyraźną mowę. Objawy te były przemijające i nie wskazywały na skutki wcześniejszego zatrucia substancją w żadnym z badanych układów lub narządów (Grogan 1986; Shlian, Goldstone 1985).

Pomimo powszechnego stosowania BHT doniesienia o następstwach narażenia na tę substancję u ludzi są sporadyczne i ograniczają się zasadniczo do reakcji skórnych (BUA 1991; Final report... 2002).

### Działanie uczulające na skórę

Jest kilka doniesień o dodatnich wynikach testów naskórkowych przeprowadzonych u pacjentów,

jednak nie wszystkie zostały w pełni udokumentowane (tab. 1). Wyniki kompleksowych badań w klinikach Sieci Informacyjnej Oddziałów Dermatologii (IVDK: Informationsverbund Dermatologischer Kliniken) w Niemczech wykazały, że substancja ta rzadko wykazuje działanie uczulające. Przyczyną mogło być stosowanie małych stężeń BHT (Schnuch i in. 1998).

Wyniki uzyskane w badaniu grupy pacjentów z podejrzeniem alergii na butylowany hydroksyanizol (BHA) i BHT (różnych od pacjentów uczulonych na aspirynę) zostały zakwestionowane (BHT w ilości 100 lub 250 mg), jeżeli chodzi o wykazanie działania uczulającego BHT. U osób tych wystąpiły: zaostrzenie naczynioruchowego nieżyty nosa, zaczerwienienie, bóle głowy, czasami zaostrzenie objawów astmatycznych (Fisherman, Cohen 1973). W innym badaniu przeprowadzonym u 1336 pacjentów nie stwierdzono działania uczulającego BHT. Autorzy badania przypuszczają, że stężenie tego antyoksydanta mogło być zbyt małe, aby wywołać alergię kontaktową (Flyvholm, Menné 1990).

**Tabela 1.** Wyniki testów naskórkowych oceniających działanie uczulające 2,6-di-*tert*-butylo-4-metylofenolu (BHT) u pacjentów  
**Table 1.** Results of epidermal tests assessing sensitization of 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol (BHT) in patients

Badane osoby	Stężenie nośnika	Stężenie BHT, warunki badania	Wynik	Piśmiennictwo
Technik z rumieniem i łuszczącą się skórą na prawej dłoni i podeszwię	2% wazeliny	0,02% BHT w kremie podkładowym	1+ (po 48 h), 2+ (po 72 h)	<i>Bardazzi</i> i in. 1988
40 pracowników przemysłu metalurgicznego z zapaleniem skóry dłoni i przedramion	2% wazeliny	stężenie nieokreślone	reakcja na BHT: 0/40	<i>de Boer</i> i in. 1989
2 pacjentów z owrzodzeniami nóg lub zastoinowym zapaleniem skóry	nieokreślony	stężenie nieokreślone, u 1 pacjenta (niepełna dokumentacja)	1× 1+ i 2+ w każdym przypadku (brak innych szczegółów)	<i>Dissanayake, Powell</i> 1989
1336 pacjentów	2% wazeliny	stężenie nieokreślone	reakcja na BHT: 0/1336	<i>Flyvholm, Menné</i> 1990
20 pracowników z objawami podrażnienia skóry	2% wazeliny	płyn dielektryczny z 0,2% BHT	reakcja na BHT: 0/20	<i>Goh, Ho</i> 1993
358 pacjentów, testy naskórkowe przeprowadzono w latach 1991-1996	2% wazeliny	stężenie nieokreślone	reakcja alergiczna na BHT: 0/358, reakcje podrażnienia u 2/358 badanych	<i>Kanerva</i> i in. 1997; 1999
17 zatrudnionych przy obróbce metali, z podejrzeniem alergicznego wyprysku na dłoniach	1% etanolu	stężenie nieokreślone, BHT w płynie do obróbki metalu	brak reakcji po 24 i 48 h, 1+ (po 72 h)	<i>Koch</i> 1996
Pacjentka z obrzękiem głowy i twarzy	1% wazeliny	stężenie nieokreślone, uczulenie na <i>tert</i> -butylohydrochinon w farbie do włosów; reakcja na BHT (i BHA), która może być interpretowana jako reakcja krzyżowa	1+ (po 48 i 96 h, brak innych szczegółów)	<i>Le Coz, Schneider</i> 1998
360 pacjentów	5% wazeliny	stężenie nieokreślone	reakcja na BHT: 0/360	<i>Meneghin</i> i in. 1971
465 pacjentów z zapaleniem skóry	2% wazeliny	stężenie nieokreślone, testowanie BHT ze składnikami serii środków konserwujących	reakcja na BHT: 3/465 (0,6%)	<i>Meynadier</i> i in. 1982
155 pacjentów z zapaleniem skóry	nie określono	stężenie nieokreślone, 72-godzinna aplikacja	reakcja na BHT: 1/155 po 48 h i 72 h, odczyt po 75 h: reakcja u 2/155 pacjentów	<i>Motolese, Seidenari</i> 1994
103 techników dentystycznych, badanie przeprowadzono w latach 1995-1999, nie określono związku z BHT	2% wazeliny	stężenie nieokreślone	reakcja na BHT: 1/103	<i>Peiler</i> i in. 2000
125 dzieci do lat 12, badanie przeprowadzono w latach 1981-1987	nie określono	stężenie nieokreślone	reakcja na BHT: 2/125	<i>Rademaker, Forsyth</i> 1989
112 pacjentów, badanie przeprowadzono w latach 1974-1975	2% wazeliny lub etanolu	2% BHA, 5% BHT	3 × 2+ (brak innych szczegółów), u 2/3 pacjentów reakcja na 2% BHA w wazelinie, brak reakcji u 83 pacjentów badanych kolejno pod kątem 5% BHT w etanolu	<i>Roed-Petersen, Hjorth</i> 1976
224 pacjentów mających kontakt ze składnikami serii środków konserwujących	2% wazeliny	stężenie nieokreślone	reakcja na BHT: 2/224 (0,9%)	<i>Rudner</i> 1977
11 454 pacjentów, badanie przeprowadzono w latach 1990-1994	2% wazeliny	stężenie nieokreślone	reakcja na BHT: 11/11454 (0,1%), u 51 badanych stwierdzono wątpliwą reakcję alergiczną, ewentualnie działanie drażniące	<i>Schnuch</i> i in. 1998

cd. tab. 1 / Table 1 cont.

Badane osoby	Stężenie nośnika	Stężenie BHT, warunki badania	Wynik	Piśmiennictwo
244 pacjentów podejrzanych o nietolerancję kosmetyków, badanie przeprowadzono w latach 1997-2000	nie określono	stężenie nieokreślone	reakcja na BHT: 5/244 (2,1%)	<i>Trattner i in. 2002</i>
2 pacjentów z hipopigmentacją stóp	0,5, 1 i 5% wazeliny	stężenie nieokreślone, BHT w folii polietylenowej do okluzyjnego opatrunku podczas miejscowej terapii kortykosteroidami; test prowadzono przez 48 h i 7 dni	reakcja na BHT: 0/2	<i>Vollum 1971</i>
12 pacjentów z reakcją na żywicę <i>p-tert</i> -butylofenolowo-formaldehydową	1,77% acetonu	stężenie nieokreślone	reakcja na BHT: 0/12	<i>Zimerson, Bruze 2002</i>
Pacjentka z pokrzywką wywołaną przez tworzywa sztuczne zawierające BHT	1% etanolu	0,01; 0,1 i 1% BHT, 1% BHT – wykonano tylko 20-minutowe badanie skórne	pokrzywka po 20 min narażenia na 1% BHT i 1% BHA, brak reakcji na 0,01 i 0,1% BHT, brak reakcji u 15 osób z grupy kontrolnej	<i>Osmundsen 1980</i>

Wyniki badań zamieszczone w tabeli 1 nie wskazują jednoznacznie na właściwości uczulające BHT.

Piętnastu ochotnikom naniesiono jednorazowo nierozcieńczony BHT na skórę pod opatrunek okluzyjny. Opatrunek trzymano przez 48 h. Substancja ta spowodowała umiarkowaną reakcję alergiczną i niewielkiego stopnia podrażnienia skóry, które wystąpiły dopiero po kolejnym zabiegu przeprowadzonym 14 dni później (*Mallette, von Haam 1952*). Ze względu na brak szczegółowych danych wyniki tego badania nie mogą być wykorzystane w ocenie działania uczulającego BHT.

Ochotnikom nie uskarżającym się na choroby skóry (50 osób) naniesiono jednorazowo na skórę pod opatrunek okluzyjny 0,5% BHT lub 3% BHT w kremie na 48 h. Po tym czasie nie obserwowano żadnej reakcji u badanych ochotników. Po 9 dniach odpowiednio u sześciu i dziewięciu ochotników w miejscu aplikacji preparatu wystąpił niewielki rumień i łuszcząca się skóra jako reakcja na 0,5-procentowy i 3-procentowy preparat. W kolejnej otwartej próbie nanoszono 3-procentowy preparat 2 razy na dzień na skórę pleców, na obszar o średnicy około

5 cm. Po 5 tygodniach od aplikacji BHT na skórze jednego ochotnika wystąpiło zapalenie mieszków włosowych na rumieniowym podłożu. U drugiego ochotnika po 6 tygodniach obserwowane zmiany skórne wystąpiły w postaci rumienia na skórze i jej łuszczenia. Podrażnienie skóry odnotowano również u kilku innych ochotników po 7 tygodniach (*Bentley-Phillips, Bayles 1974*). W powyższym badaniu prawdopodobnie zastosowano mieszaninę BHT/BHA, dlatego wyniki te nie mają znaczenia dla oceny działania uczulającego BHT.

Brak danych dotyczących uczulającego działania par i pyłu BHT na drogi oddechowe.

### Działanie podprzewlekłe i przewlekłe

W dostępnym piśmiennictwie nie ma danych na temat zatruc przewlekłych BHT u ludzi.

### Badania epidemiologiczne

W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono informacji na temat wyników badań epidemiologicznych dotyczących skutków narażenia ludzi na BHT.

## DZIAŁANIE TOKSYCZNE NA ZWIERZĘTA

## Toksyčność ostra i przedłużona

Doświadczalne wartości  $LD_{50}$  uzyskane w badaniach na zwierzętach wskazują na niewielką toksyczność ostrą 2,6-di-*tert*-butylo-4-metylofenolu (BHT), (tab. 2). Po jednorazowym podaniu dożołądkowym BHT większość wartości  $LD_{50}$  wyznaczonych dla szczurów, myszy, królików i kawii domowej wynosiła  $>2000$  mg/kg mc. (Deichmann i in. 1955; Karplyuk 1960).

Wartość  $LD_{50}$  BHT po naniesieniu na skórę szczura także wynosi  $>2000$  mg/kg mc. (Test Guideline 402). Po aplikacji u szczurów nie stwierdzono żadnych objawów układowych ani miejscowych działania BHT (OECD 2020).

W literaturze nie znaleziono danych na temat toksyczności ostrej inhalacyjnej BHT.

Wartość  $RD_{50}$  zgodnie z metodą Alarie'ego (1981) wyznaczono w badaniu na myszach (samce myszy Swiss Webster, sześć grup po cztery zwierzęta), które narażano przez 30 min (tylko przez głowę) na BHT o stężeniach: 4,54; 16; 32; 42,9; 66,6 lub 82,6 ml/m<sup>3</sup>. Wyliczona wartość  $RD_{50}$  wynosiła 59,7 ml/m<sup>3</sup> (około 546 mg/m<sup>3</sup>). U zwierząt nie odnotowano objawów podrażnienia czuciowego w przypadku narażenia na BHT o stężeniach 4,54 lub 16 ml/m<sup>3</sup> (odpowiednio około 41 lub 146 mg/m<sup>3</sup>), (US Consumer... 1998a).

Wartość  $RD_{50}$  wynosząca 3,6 ml/m<sup>3</sup> (Stadler, Lavoie 1997), zgłoszona we wcześniejszych badaniach DuPont, nie była uzasadniona. Rozbieżność

w badaniu DuPont wyjaśniono problemami w analizie (US Consumer... 1998b).

Istotne statystycznie różnice w wielkości dawek śmiertelnych odnotowano u różnych szczepów myszy narażonych drogą dootrzewnową na BHT. Rozbieżności te zostały zinterpretowane jako genetycznie indukowane różnice w metabolizmie BHT (Kawano i in. 1981).

Objawy toksyczności ostrej BHT u myszy obejmowały zmniejszenie masy ciała i duszność. Przeżywalność zwierząt wynosiła 4 ÷ 6 dni. Autopsja ujawniła powiększone płuca z rozległym obrzękiem płuc i ogniskami krwotocznymi sporadycznie sięgającymi do światła jelit (Kawano i in. 1981). W innym badaniu histopatologicznym stwierdzono w płucach przerost i hiperplazję z objawami „uogólnionej dezorganizacji” – przegrody międzypęcherzykowe były pogrubione i wykazywały oznaki stanu zapalnego oraz licznie występujące makrofagi. Najmniejsza dawka BHT zastosowana w tym badaniu, w której substancja powodowała jeszcze zmiany histopatologiczne, wynosiła 40 mg/kg mc. (Marino, Mitchell 1972). Po nieletalnej dawce 400 mg/kg mc. u myszy obserwowano martwicę komórek pęcherzyków płucnych typu I i proliferację komórek pęcherzyków płucnych typu II; następnie wystąpiła proliferacja komórek śródbłonka naczyń włosowatych i komórek śródmiąższowych (Adamson i in. 1977).

**Tabela 2.** Wartości  $LD_{50}$  2,6-di-*tert*-butylo-4-metylofenolu (BHT) wyznaczone dla zwierząt doświadczalnych

**Table 2.**  $LD_{50}$  values of 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol determined for experimental animals

Gatunek/szczep zwierząt	Droga podania	Wartość $LD_{50}$ , mg/kg mc.	Piśmiennictwo
Szczur	<i>per os</i>	1700 ÷ 1900	Deichmann i in. 1955
Szczur		2 450	Karplyuk 1960
Mysz		2 000	Karplyuk 1960
Królik		2 100 ÷ 3 200	Deichmann i in. 1955
Kawia domowa (świnka morska)		10 700	Deichmann i in. 1955
Kot		940 ÷ 2 100	Deichmann i in. 1955
Mysz ddY	dootrzewnowa	3 350	Yamamoto i in. 1980
Mysz DBA/2N		138	Kawano i in. 1981
Mysz AKR		538	Kawano i in. 1981

### Toksyczność podprzewlekła i przewlekła

Dostępnych jest wiele wyników badań dotyczących działania toksycznego BHT po narażeniu drogą pokarmową w warunkach narażenia podprzewlekłego i przewlekłego. U zwierząt oceniano podstawowe parametry określające ogólny stan zdrowia (np. spożycie paszy, masa ciała, objawy kliniczne i śmiertelność) oraz przeprowadzono specjalistyczne badania w kierunku narządów docelowego działania BHT (wątroba, nerki, płuca i badanie krzepnięcia krwi), (BUA 1991; Final report... 2002; WHO 1996). Wyniki badań do oceny toksyczności BHT podsumowano w tabeli 3. Wszystkie przeliczenia stężeń BHT w paszy na dawki zostały podane za autorami poszczególnych prac badawczych lub za ekspertami niemieckimi.

W badaniach doświadczalnych wykazano, że zarówno u gryzoni, jak i naczelnych wątroba jest narządem krytycznym działania BHT (BUA 1991; 2000; Final report... 2002; OECD 2020). U szczurów Sprague-Dawley lub F344 obserwowano adaptacyjne zmiany w wątrobie na początku i podczas całego okresu narażania. Po 2 latach częstość występowania tych zmian zarówno u zwierząt z grupy kontrolnej, jak i zwierząt narażanych na BHT nawet w dużych dawkach (szczury Sprague-Dawley: 160 mg/kg mc./dzień, szczury F344: 450 lub 900 mg/kg mc./dzień) nie różniła się.

BHT podawano samcom szczurów Wistar przez zgłębnik przez 7 i 28 dni w dawkach: 25, 250 lub 500 mg/kg mc./dzień. Substancja w dawce 250 mg/kg mc./dzień spowodowała dysfunkcję wątroby polegającą na nagromadzeniu tłuszczu i glikogenu w wątrobie oraz zwiększenie względnej masy wątroby. Po narażeniu szczurów na BHT w dawce 500 mg/kg mc./dzień obserwowano martwicę komórek wątrobowych układu wrotnego wątroby, podział komórek nabłonka pęcherzyka żółciowego oraz zmiany zwłóknieniowe i martwicę zrazików wątrobowych. Dawka 25 mg/kg mc./dzień była dawką nie działającą (Powell i in. 1986).

Na szczurach Wistar przeprowadzono przewlekłe badania, których celem była ocena histopatologiczna wątroby i aktywności enzymów wątrobowych po narażeniu na BHT. Badania rozpoczęły się w okresie przedurodzeniowym i trwały około 98 tygodni (CEFIC-EBMA 1994). Zwierzęta otrzymywały BHT w standardowej paszy w dawkach: 25, 100 lub 250 mg/kg mc./dzień. Substancja w dawce 25 mg/kg mc./dzień powodowała

przejsiowe zmiany adaptacyjne czynności wątroby prowadzące do zwiększonej aktywności enzymów wątroby (O-deetylazy etoksyrezorufiny i hydrolazy epoksydowej) oraz odwracalnego zwiększenia masy wątroby. Wymienione zmiany występowały sporadycznie, głównie u młodych zwierząt. BHT podawany w dawkach od 100 mg/kg mc./dzień powodował zwiększoną aktywność S-transferazy glutationowej i wyraźnie zwiększoną aktywność O-depentylazy pentoksyrezorufiny (marker CVP1A2). Za poziom bez obserwowanych działań niepożądanych (NOAEL) przyjęto dawkę 25 mg/kg mc./dzień (CEFIC-EBMA 1994; McFarlane i in. 1997). W wyniku indukcji enzymów wątrobowych funkcje tarczycy (nadczynność) szczurów były zaburzone od dawki około 100 mg BHT/kg mc./dzień (CEFIC-EBMA 1994).

W 90-dniowym badaniu przeprowadzonym na szczurach Wistar po podaniu BHT w paszy stwierdzono zwiększenie względnej masy tarczycy po dawce 25 mg BHT/kg mc./dzień (Søndergaard, Olsen 1982). Wynik ten nie został jednak potwierdzony w innych badaniach przeprowadzonych na szczurach tego szczepu narażanych na BHT w małych dawkach (CEFIC-EBMA 1994; Hirose i in. 1981; Olsen i in. 1986). Wyniki badania Søndergaard i Olsena (1982) nie są zatem wykorzystywane do oceny toksyczności BHT. Nadczynność tarczycy wywołana substancjami o właściwościach indukujących enzymy wątrobowe jest reakcją specyficzną dla gryzoni, ponieważ w przeciwieństwie do ludzi szczury są szczególnie podatne na zaburzenia regulacji tarczycowo-przysadkowej spowodowane wzmożonym metabolizmem tyroksyny (T4) w wątrobie.

Wpływ BHT na wątrobę badano również u naczelnych. Dwóm lub trzem młodym małpom rezus podawano drogą pokarmową w oleju kukurydzianym substancję w dawkach: 0, 50 lub 500 mg/kg mc. przez 28 dni. BHT w żadnej z podawanych dawek nie wpływał na względną masę wątroby. W drugim tygodniu narażania na BHT w dawce 50 mg/kg mc./dzień odnotowano nieistotnie statystycznie zwiększenie aktywności demetylazy nitroanizolu w wątrobie ( $6,6 \pm 0,4$   $\mu\text{mol/h}$  i mg białka) u dwóch zwierząt. W czwartym tygodniu narażania aktywność enzymu była taka sama zarówno w grupie kontrolnej, jak i w grupie narażanej. Po podaniu BHT w dawce 500 mg/kg mc./dzień wykazano umiarkowaną proliferację retikulum endoplazmatycznego, niewielkie zwiększenie liczby kropelek lipidów



w cytoplazmie oraz fragmentację jądra komórkowego w niektórych hepatocytach. Aktywność demetylazy *p*-nitroanizolu, która jest określana jako wskaźnik indukcji enzymatycznej w wątrobie, była nieznacznie zwiększona u zwierząt narażanych na BHT w dawce 500 mg/kg mc./dzień, natomiast aktywność glukozo-6-fosfatazy była zmniejszona (Allen, Engblom 1972). Eksperti niemieccy (MAK 2007) uważają za wątpliwe niewielkie zmiany obserwowane u małych po narażeniu na BHT w dawce 50 mg/kg mc. między innymi z powodu małej liczby badanych zwierząt. Z powyższych powodów dawkę 50 mg/kg mc./dzień przyjęto za wartość NOAEL.

W przypadku myszy narządem docelowego działania BHT były płuca, zwłaszcza gdy związek podawano w dużych dawkach drogą pokarmową. Zmiany w płucach są specyficznym skutkiem dla tego gatunku. U myszy martwicę komórek pęcherzykowych typu I i kompensacyjną proliferację komórek pęcherzykowych typu II obserwowano po dawkach powyżej 100 mg/kg mc./dzień. Stosunkowo duże zmiany występowały również po jednorazowym narażeniu na BHT i często prowadziły one do przewlekłych procesów zapalnych (Final report... 2002). U myszy działanie toksyczne BHT na płuca jest przypisywane chinonometrydowi hydroksylovanemu, który tworzy się w stosunkowo dużym stężeniu u tych zwierząt (Kupfer i in. 2002).

U gryzoni badano wpływ narażenia na BHT na funkcje nerek. Wyniki uzyskane z badań są niejednoznaczne. Zmiany w nerkach odnotowano u narażanych na BHT w dużych stężeniach szczurów (8000 ppm, co odpowiada około 400 mg/kg mc.) i myszy (13 500 ppm, co odpowiada około 1570 mg/kg mc.), (Ichikawa i in. 1972; Meyer

i in. 1978; 1989; Takahashi 1992). W badaniach Meyera i in. (1978) zmiany w nerkach wystąpiły tylko wtedy, gdy BHT podawano w półsyntetycznej paszy. Podanie samej paszy bez BHT także wywołało zmiany w nerkach (Meyer i in. 1982). Inni autorzy po zastosowaniu w badaniach równie dużych lub nawet większych dawek BHT nie obserwowali żadnych zmian w nerkach (CEFIC-EBMA 1994; Inai i in. 1988; NCI 1979).

Wyniki badań przeprowadzonych na gryzoniach (szczury, myszy i świnki morskie) głównie przez Takahashiego i Hiragę (1978) wskazują na zmiany w układzie krzepnięcia krwi przy narażeniu tych zwierząt na BHT (dawki 300 mg/kg mc. i większe) drogą pokarmową lub pozajelitową. Wyniki badania na szczurach Sprague-Dawley przeprowadzone z wykorzystaniem wskaźnika protrombiny jako markera tych skutków (czas protrombinowy to wskaźnik dotyczący tempa krzepnięcia krwi) wykazały, że nawet stężenia od 170 ppm BHT w paszy (około 13,4 mg/kg mc./dzień) podawane przez 4 tygodnie powodowały upośledzenie układu krzepnięcia krwi (Takahashi, Hiraga 1978). Zdaniem ekspertów niemieckich (MAK 2007) i Wspólnego Komitetu Ekspertów FAO/WHO ds. Dodatków do Żywności (WHO 1991) zmiany te są nieistotne dla oceny toksyczności BHT, ponieważ wystąpiły u gryzoni narażanych na substancję wyłącznie w bardzo dużych hepatotoksycznych dawkach.

Brak dostępnych danych dotyczących toksyczności inhalacyjnej BHT po wielokrotnym narażeniu zwierząt.

**Tabela 3.** Podsumowanie wyników badań toksyczności podprzewlekłej i przewlekłej u zwierząt doświadczalnych narażanych na 2,6-di-*tert*-butylo-4-metylofenol (BHT)

**Table 3.** Summary of results of sub-chronic and chronic toxicity studies in experimental animals exposed to 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol (BHT)

Gatunek, szczep, płeć, liczba zwierząt w grupie	Warunki doświadczenia, stężenie/dawka BHT	Skutki działania toksycznego	Piśmiennictwo
Szczury Wistar, 10 ÷ 30 ♂	z paszą półsyntetyczną o stężeniach: 0; 500; 5000 ppm dawki: około 0; 25; 250 mg/kg mc./dzień czas narażenia: 90 dni	25 mg/kg mc./dzień: zwiększenie względnej masy tarczycy  250 mg/kg mc./dzień: zwiększenie względnej masy wątroby; zwiększone wchłanianie jodu (nie badano małej dawki)	Søndergaard, Olsen 1982

cd. tab. 3 / Table 3 cont.

Gatunek, szczep, płeć, liczba zwierząt w grupie	Warunki doświadczenia, stężenie/dawka BHT	Skutki działania toksycznego	Piśmiennictwo
Szczury F344, 21 ♂ narażanych, 37 ♂ kontrolnych	z paszą o stężeniach: 0; 100; 300; 1000; 3000; 6000 ppm  dawki: około 7,5; 23; 75; 225; 450 mg/kg mc./dzień  czas narażenia: 76 tyg.	75 mg/kg mc./dzień: brak skutków ujemnych  od 225 mg/kg mc./dzień: zmniejszony przyrost masy ciała  450 mg/kg mc./dzień: zwiększenie względnej masy wątroby; nieistotne statystycznie zwiększenie częstości występowania nowotworów (33% w porównaniu do 17% u zwierząt z grupy kontrolnej)	<i>Williams</i> i in. 1990b
Szczury Sprague, Dawley, 5 ÷ 15 ♂/♀	z paszą o stężeniach: 0; 0,005; 0,02; 0,32%  dawki: około 2,5; 10; 160 mg/kg mc./dzień  czas narażenia: 12; 24; 48 i 96 tyg.	10 mg/kg mc./dzień: brak ujemnych objawów  160 mg/kg mc./dzień: zwiększenie śmiertelności (♀ po 96 tyg.); zwiększenie masy wątroby (96 tyg.); brak zwiększenia liczby przypadków gruczolaków lub raków (w ciągu życia)	<i>Hiraga</i> 1978; <i>Ichikawa</i> i in. 1972; Shell Oil Company 1978
Szczury Wistar, 11 ÷ 19 ♂	<i>in utero</i> (pokolenie F <sub>0</sub> ) i 98 tyg. po odsadzeniu z paszą o stężeniach odpowiadającym zawartości BHT w dawkach: 0; 25; 100 lub 250 mg/kg mc./dzień, w pokoleniu F <sub>1</sub> największą dawkę zmniejszono z 500 do 250 mg/kg mc./dzień z powodu toksyczności substancji  czas narażenia: 98 tyg.	25 mg/kg mc./dzień: zmniejszony przyrost masy ciała; zwiększona aktywność enzymów wątroby ( <i>O</i> -deetylazy etoksyrezorufiny i hydrolazy epoksydowej) tylko u młodych zwierząt (4 tyg. po odsadzeniu)  100 mg/kg mc./dzień: zmniejszenie przyrostu masy ciała; zwiększenie aktywności enzymów wątrobowych (w tym aktywności <i>S</i> -transferazy glutationu i <i>O</i> -depentylazy pentoksyrezorufiny); nadczynność tarczycy  250 mg/kg mc./dzień: zwiększona częstość występowania ognisk i guzków wątrobowokomórkowych; zwiększony poziom tyroksyny w tarczycy	CEFIC-EBMA 1994
Szczury Wistar, 57 ♂/♀ (narażane), 36 ♂/♀ (zwierzęta kontrolne)	z paszą o stężeniach: 0; 0,25; 1%  dawki: około 0; 125; 500 mg/kg mc./dzień  czas narażenia: 104 tyg.	125 mg/kg mc./dzień: zmniejszenie przyrostu masy ciała (♂ do 36. tyg.; ♀ 12. i 48. tygd.); zwiększenie względnej masy wątroby; zmniejszenie względnej masy śledziony (♀); zwiększenie poziomu cholesterolu we krwi (♂/♀); zmniejszenie poziomu trójglicerydów w osoczu; zwiększenie poziomu $\gamma$ -GT (♂); niewielkie zwiększenie liczby przypadków nowotworów (nieistotne statystycznie, brak zależności dawka-odpowiedź)  500 mg/kg mc./dzień: zmniejszenie przyrostu masy ciała; zwiększenie śmiertelności (♂ od 96 tyg.)	<i>Hirose</i> i in. 1981
Myszy B6C3F1, 50 ♂/♀	z paszą o stężeniach: 0, 1, 2% BHT  dawki: 0; 1640 ÷ 1750; 3480 ÷ 4130 mg/kg mc./dzień  czas narażenia: 104 tyg.	od około 1700 mg/kg mc./dzień: zwiększenie współczynnika przeżycia (♂); zmniejszenie przyrostu masy ciała (♀); zwiększona częstość występowania zmian ogniskowych w wątrobie (♂)  około 3800 mg/kg mc./dzień: zwiększenie częstości występowania gruczolaków wątroby (♂)	<i>Inai</i> i in. 1988

cd. tab. 3 / Table 3 cont.

Gatunek, szczep, płeć, liczba zwierząt w grupie	Warunki doświadczenia, stężenie/dawka BHT	Skutki działania toksycznego	Piśmiennictwo
Szczury F344, 50 ♂/♀ (narażane), 20 ♂/♀ (zwierzęta kontrolne)	z paszą o stężeniach: 0; 3000; 6000 ppm  dawki: około 0; 225; 450 mg/kg mc./dzień  czas narażenia: 105 tyg.	od 225 mg/kg mc./dzień: zwiększenie współczynnika przeżycia; zmniejszenie przyrostu masy ciała  do około 450 mg/kg mc./dzień: brak zwiększenia częstości występowania zmian neoplastycznych lub nieneoplastycznych	NCI 1979
Myszy B6C3F1, 50 ♂/♀ (narażane), 20 ♂/♀ (zwierzęta kontrolne)	z paszą o stężeniach: 0; 3000; 6000 ppm  dawki: około 0; 450; 900 mg/kg mc./dzień  czas narażenia: 108 tyg.	450 mg/kg mc./dzień: zwiększenie liczby przypadków gruczolaków płuc (♀; wg autorów nie wiązało się to z narażeniem)  od 450 mg/kg mc./dzień: zmniejszenie przyrostu masy ciała; zwiększenie współczynnika przeżycia; degeneracja komórek wątroby (♂); hepatocytomegalia; <i>peliosis hepatis</i> (schorzenie naczyniowe charakteryzujące się licznymi, losowo rozmieszczonymi, wypełnionymi krwią jamami w całej wątrobie)  900 mg/kg mc./dzień: brak zwiększenia częstości występowania zmian neoplastycznych	NCI 1979
Szczury F344, 27 ♂	z paszą o stężeniach: 0; 12 000 ppm  dawki: około 0; 900 mg/kg mc./dzień  czas narażenia: 110 tyg.	około 900 mg/kg mc./dzień: zmniejszenie przyrostu masy ciała; brak istotnego zwiększenia częstości występowania nowotworów	Williams i in. 1990b
Szczury Wistar, 80 ÷ 100 ♂/♀	<i>in utero</i> z paszą półsyntetyczną o stężeniach odpowiadających zawartości BHT w dawkach: 0; 25; 100 lub 500 mg/kg mc./dzień, w pokoleniu F <sub>1</sub> największą dawkę zmniejszono z 500 do 250 mg/kg mc./dzień z powodu toksyczności substancji  czas narażenia: 144 tyg.	od 25 mg/kg mc./dzień: zmniejszenie przyrostu masy ciała (♂ od 34. tyg.); zmniejszona śmiertelność  od 100 mg/kg mc./dzień: zmniejszenie przyrostu masy ciała  250 mg/kg mc./dzień: gruczolaki i raki wątroby (od 115. tyg.)	Olsen i in. 1986

Objaśnienia:

♂ – samiec.

♀ – samica.

## ODLEGŁE SKUTKI DZIAŁANIA TOKSYCZNEGO

### Działanie mutagenne/genotoksyczne

Działanie mutagenne 2,6-di-tert-butyl-4-metylofenolu (BHT) poddano szczegółowej ocenie po przeprowadzeniu kilku testów mutagenności, w tym

badan w warunkach *in vitro* na bakteriach (*Mortelmans* i in. 1986) i komórkach ssaków (*Galloway* i in. 1987) oraz badan przeprowadzonych w warunkach *in vivo* na *Drosophila melanogaster* i jedwabnikach oraz za pomocą testu locus specyficznych dla myszy

(McGregor i in. 1988). Wyniki badań zostały podane analizie przez Bomharda i in. (1992), którzy wykazali, że BHT nie stanowi istotnego ryzyka mutagennego ani genotoksycznego dla człowieka.

#### **Badania w warunkach in vitro**

Większość dostępnych wyników uzyskanych w badaniach przeprowadzonych za pomocą różnych testów w warunkach in vitro na plazmidach, bakteriach (*Bacillus subtilis*, kilkanaście szczepów *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli* PQ37) i drożdżach (*Saccharomyces cerevisiae*), (Bonin, Baker 1980; Brams i in. 1987; Bruce, Heddle 1979; Chipman i in. 1987; FDA 1975; Fujita, Hiraga 1980; Heil i in. 1996; Karamova i in. 1997; Kinane i in. 1981; Morita i in. 1981; Nagai i in. 1993; Ohta i in. 1980; Potenberg i in. 1988; Rao, Aiyar 1975) nie wskazuje na działanie genotoksyczne BHT.

Istnieją przesłanki, że BHT może hamować syntezę DNA u ssaków (Daugherty, Franks 1986; Daugherty i in. 1978; Heil, Reifferscheid 1992; Heil i in. 1996). Hamowanie syntezy DNA nie jest jednak skutkiem specyficznym dla genotoksyczności.

W badaniach przeprowadzonych na ludzkich hepatocytach stwierdzono nieznacznie zwiększony wskaźnik syntezy nieplanowej DNA (UDS) wywołany przez BHT w dużym cytotoksycznym stężeniu (11  $\mu$ M), (Chipman, Davies 1988). Znaczenie tego wyniku jest wątpliwe ze względu na właściwości cytotoksyczne badanej substancji.

BHT nie powodował wymiany chromatyd siostrzanych (Abe, Sasaki 1977; Galloway i in. 1987; Grillo, Dulout 1995; 1997; Kawachi i in. 1980; Shelby, Stasiewicz 1984; Williams i in. 1984).

W hodowlach komórek V79 (Ochi, Ohsawa 1985), komórek CH Don (Abe, Sasaki 1977), komórek CHL (Ishidate 1983; Ishidate, Odashima 1977; Ishidate i in. 1980; 1984; Kawachi i in. 1980) oraz komórek CHO (Galloway i in. 1987) nie stwierdzono wpływu BHT na powstawanie aberracji chromosomowych.

W innym badaniu przeprowadzonym na komórkach CHO (Grillo, Dulout 1995) wykazano zależne od stężenia BHT zwiększenie częstości występowania pęknięć chromatyd (150-krotne) w porównaniu z kontrolą. Częstoczą DMSO spowodowała 20-krotne zwiększenie częstości występowania pęknięć chromatyd w porównaniu z czystą kontrolą. Ze względu na to, że stężenia BHT wynoszące co najmniej 0,1  $\mu$ g/ml mieściły się w zakresie stężeń cytotoksycznych i nie wystą-

piła indukcja wymiany chromatyd siostrzanych (SCE), która jest odzwierciedleniem uszkodzeń DNA, sugeruje to raczej skutek wtórny niż indukcję uszkodzenia DNA przez BHT. W późniejszym badaniu przeprowadzonym przez Grillo i Dulouta (1997) BHT (1  $\mu$ g/ml) wywołał niewielkie zwiększenie częstości występowania pęknięć chromatyd (maksymalnie 2 razy więcej niż kontrola DMSO) i pęknięć chromosomów (maksymalnie 1,4 raza więcej niż kontrola DMSO) niezależnie od fazy cyklu komórkowego. To badanie sugeruje raczej niespecyficzny skutek.

W badaniu Patterson i in. (1987) rozległa cytotoxyczność, której nie określono ilościowo, została również uznana za powód, dla którego nieprawidłowości chromosomowe spowodowane przez BHT w zakresie stężeń  $1 \div 10$   $\mu$ g/ml nie wiązały się ze stężeniem. Zdecydowanie największy odsetek zmian stanowiły poliploidy. W tym przypadku również rozpuszczalnik etanol był przyczyną podwojenia nieprawidłowych chromosomów, dlatego trudno jest uznać wynik testu za dodatni. Kolejny dodatni wynik testu aberracji chromosomowych (FDA 1972b; Maxwell, Newell 1974) jest również trudny do oceny, ponieważ zastosowano niezwalidowany system testowy, w którym stwierdzono aberracje w anafazie, a dodatni wynik był spowodowany głównie zwiększoną liczbą fragmentów acentrycznych (Bomhard i in. 1992).

W dwóch testach mutacji genowych HPRT przeprowadzonych na hepatocytach szczura (Williams i in. 1990a) i ludzkich komórkach nabłonka (Ferreri i in. 1986) nie wykazano działania mutagennego BHT. W teście HPRT przeprowadzonym na komórkach V79 mutacje wystąpiły tylko w zakresie wysokiej cytotoxyczności BHT (około 20% przeżywalności zwierząt) i w warunkach aktywacji metabolicznej (mieszanina S-9 z wątroby myszy), (Paschin, Bahitova 1984). Badanie to zostało pominięte w ocenie mutagenności BHT, ponieważ skutek wystąpił w zakresie toksycznych stężeń.

Niewielkie zwiększenie częstości mutacji wykazano w teście mutacji TK +/- w komórkach chłoniaka myszy L5178Y bez aktywacji metabolicznej, w zakresie dużej cytotoxyczności w jednej z trzech serii badań. W przypadku zastosowania aktywacji metabolicznej (mieszanina S-9) we wszystkich trzech seriach badań obserwowano skutki genotoksyczne, ale głównie w zakresie dużych cytotoxycznych stężeń. We wszystkich

testach jako rozpuszczalnik zastosowano DMSO (McGregor i in. 1988). Nie określono wielkości kolonii komórek, zatem nie można było wyciągnąć wniosków, czy były to skutki mutagenne, czy klastrogenne. Skutki genotoksyczne występowały wyłącznie w zakresie dużych cytotoksycznych stężeń, nie mogą więc zostać wykorzystane do oceny działania mutagennego BHT.

#### **Badania w warunkach in vivo**

W badaniu potencjału genotoksycznego BHT z użyciem *Drosophila melanogaster* wykazano nieistotną statystycznie utratę chromosomu (Prasad, Kamra 1974).

U *Drosophila melanogaster* BHT nie wywoływał także istotnych zmian w częstości translokacji chromosomowej ani mutacji letalnych recesywnych związanych z płcią (SLRL), (Dellarco i in. 1985; Ennever, Rosenkranz 1986; Kamra 1973; Kamra, Rajaraman 1973).

W teście kometowym wykazano, że BHT indukował pęknięcia nici DNA w komórkach samców myszy ddY. Pęknięcia nici DNA stwierdzono w komórkach okrężnicy po narażeniu jednorazowym na BHT drogą pokarmową w dawce 100 mg/kg mc. i większych dawkach, w komórkach żołądka i pęcherza moczowego po dawce 500 mg/kg mc. i większych dawkach oraz w komórkach mózgowych po dawce 1000 mg/kg mc. po 3 h. Po 24 h od narażenia skutki wystąpiły tylko w komórkach żołądka (po dawce 1000 mg/kg mc.). Indukcji pęknięć nici DNA nie stwierdzono w wątrobie, płucach, nerkach i szpiku kostnym (Sasaki i in. 2002). Analiza pobranych wycinków z poszczególnych narządów nie dostarczyła dowodów na działanie cytotoksyczne oraz indukcję apoptozy w wyniku narażenia na BHT. Fakt, że w płucach i wątrobie, narządach docelowych toksyczności BHT, nie stwierdzono wyżej opisanych zmian, budzi wątpliwości co do biologicznego znaczenia obserwowanych skutków.

Zdolność wiązania makrocząsteczek badano u samców szczurów Wistar, którym podano jednorazowo drogą *per os* znakowany  $^{14}\text{C}$  przy grupie 4-metylowej BHT. W wątrobie szczura oznaczono radioaktywne frakcje białka, DNA i RNA. Specyficzna aktywność kwasów nukleinowych zwiększała się z czasem; znakowanego RNA było około 20 razy więcej niż DNA. Wiązania określono, mierząc radioaktywność związaną z oczyszczonymi frakcjami makrocząsteczek, której nie można

było usunąć przez przemycie rozpuszczalnikami organicznymi (Nakagawa i in. 1980). Późniejsze badania cząsteczki RNA przeprowadzone przez tę samą grupę roboczą wykazały, że oznakowanie radioaktywności nie było spowodowane wiązaniem kowalencyjnym, ale włączeniem węgla znakowanego  $^{14}\text{C}$  z grupy metylowej do zasad purynowych, a następnie włączeniem ich do kwasu nukleinowego (Nakagawa i in. 1981).

Po podaniu myszom BALB/c drogą pokarmową BHT znakowanego  $^{14}\text{C}$  przy grupach *tert*-butylowych odnotowano wiązanie się go z białkami, RNA i DNA we wszystkich badanych narządach (przedżołądka i gruczołowej części żołądka, jelicie cienkim i jelicie grubym, płucach oraz wątrobie), (Daugherty 1984). W badaniu tym oznaczono także radioaktywność związaną z oczyszczonymi frakcjami makrocząsteczek. Pozostaje niejasne, czy oznakowanie kwasów nukleinowych było wynikiem tworzenia adduktów, czy nastąpiło w wyniku procesu metabolicznego. Wiązanie znakowanego  $^{14}\text{C}$  BHT z białkami opisane w kilku badaniach wynika w pewnym stopniu z kowalencyjnego wiązania chinonometrydu z cysteiną białek (Nakagawa i in. 1983).

#### **Testy wykrywające mutacje w komórkach somatycznych**

Mutacje somatyczne badano u ssaków w warunkach *in vivo*. U narażanych na BHT zwierząt nie stwierdzono wpływu badanej substancji ani na częstość występowania mikrojąder w szpiku kostnym (Bruce, Heddle 1979; Paschin i in. 1986) i krwi obwodowej (Karamova i in. 1997) myszy, ani na częstość aberracji chromosomowych w szpiku kostnym myszy (Masubuchi i in. 1976) lub szczurów (FDA 1972b; Kawachi i in. 1980; Maxwell, Newell 1974).

#### **Testy wykrywające mutacje w komórkach płciowych (mutacje dziedziczne)**

Test dominujących mutacji letalnych przeprowadzony u myszy (Epstein, Shafner 1968; Epstein i in. 1972; Sheu i in. 1986; Masubuchi i in. 1976) i szczurów (FDA 1972b; Maxwell, Newell 1974) nie dostarczył dowodów na to, że BHT indukował dominujące mutacje letalne.

BHT nie indukował również dziedziczenia translokacji chromosomowych (Sheu i in. 1986) ani mutacji w określonym locus (Cumming i in. 1976) u myszy.

## Działanie rakotwórcze

### Działanie rakotwórcze na ludzi

W holenderskim badaniu kohortowym, które rozpoczęło się w 1986 r. i obejmowało 120 852 osoby w wieku 55 ÷ 69 lat, badano częstość występowania raka żołądka w związku ze spożyciem produktów zawierających BHT i BHA. Po trwającym 6,3 lat okresie obserwacji uzyskano dane dotyczące wchłaniania BHT i BHA od 192 osób z nowotworami żołądka i od 2035 osób z subkohorty. Średnie spożycie BHT i BHA wynosiło odpowiednio 351 i 105 µg/dzień. Nie stwierdzono związku pomiędzy występowaniem raka żołądka u osób spożywających majonez lub inne kremowe dressingi sałatkowe zawierające BHA lub BHT. Zaobserwowano jednak zmniejszenie – choć nieistotne statystycznie – częstości występowania raka żołądka wraz ze zwiększeniem spożycia BHA i BHT. Ryzyko względne BHT wynosiło 0,74 (95-procentowy przedział ufności: 0,38–1,43), a dla BHA 0,57 (95-procentowy przedział ufności: 0,25–1,30), (Botterweck i in. 2000).

### Działanie rakotwórcze na zwierzęta

Działanie rakotwórcze BHT badano u szczurów F344 i myszy B6C3F1 narażanych na substancję drogą pokarmową (NCI 1979). Szczury i myszy (po 50 sztuk każdej płci) otrzymywały BHT w jednej z dawek, tj. 3000 (około 225 mg/kg mc.) lub 6000 ppm (około 450 mg/kg mc.). Szczury narażano przez 105 tygodni, a myszy przez 107 lub 108 tygodni. Liczebność grup kontrolnych zarówno w przypadku myszy, jak i szczurów wynosiła 20 sztuk każdej płci. Masa ciała narażanych myszy i szczurów była mniejsza w porównaniu z masą ciała zwierząt kontrolnych i widoczna była zależność dawka-skutek. Stopień przeżywalności zwierząt zarówno w grupach narażanych, jak i kontrolnych wynosił 60% lub więcej. Do badania rozwoju ewentualnych nowotworów pozostała liczba zwierząt była wystarczająca. Istotnie więcej przypadków raka oskrzelikowo-pęcherzykowego oraz gruczolaków stwierdzono u samic myszy narażanych na BHT w dawce najmniejszej ( $p = 0,009$ ), ale nie po narażeniu na dawkę największą (kontrola 1/20, dawka mała 16/46, dawka duża 7/50). Nowotworów płuc występujących u samic myszy nie wiązano z narażeniem na BHT. Nie wykazano istotnego zwiększenia liczby nowotworów u samców i samic szczurów po żadnej z zastosowanych

dawek w porównaniu ze zwierzętami z grupy kontrolnej. Zmiany nienowotworowe typu ogniskowa histiocytoza pęcherzykowa występująca częściej u narażanych samic szczurów oraz zmiany w wątrobie u narażanych samców myszy zdaniem autorów badania mogły być związane z warunkami doświadczenia.

BHT w zastosowanych warunkach doświadczalnych nie powodował rozwoju nowotworów u myszy B6C3F1 ani u szczurów F344 (NCI 1979).

Podawanie z paszą BHT w dawkach: 0, 125 lub 500 mg/kg mc./dzień 57 samcom i 57 samicom szczurów Wistar nie spowodowało zależnego od dawki, istotnego zwiększenia częstości występowania nowotworów. Raki i gruczolaki wysp Langerhansa trzustki oraz gruczolaki i raki przysadki mózgowej obserwowano u zwierząt narażonych na BHT, ale tylko częstość występowania gruczolaków przysadki była istotnie zwiększona u samic z grupy otrzymującej małą dawkę. Przeżywalność narażonych zwierząt była większa w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi (Hirose i in. 1981).

W badaniu dwupokoleniowym BHT (0, 25, 100 lub 500 mg BHT/kg mc.) podawano samcom i samicom szczurów Wistar w półsyntetycznej paszy. Pokolenie  $F_0$  narażano przez 13 tygodni, następnie w okresie krycia i do końca laktacji. Masa ciała młodych szczurów  $F_1$  z grupy dawkowania 25 mg/kg mc. i większych dawek w momencie odstawienia od matek była zmniejszona. Masa ciała młodych z grupy dawkowania 500 mg/kg mc. zmniejszyła się w tym czasie o 41%. Wynik ten wskazuje, że została przekroczona maksymalna tolerowana dawka BHT. Ze względu na to, że u samic wystąpiły skutki toksyczne (nefrotoksyczność), dawkę 500 mg/kg mc. zmniejszono dla pokolenia  $F_1$  do 250 mg/kg mc. BHT również w tej dawce istotnie zmniejszał masę ciała zwierząt (u samców ponad 20%, a u samic około 15% w porównaniu z grupą kontrolną). Autorzy badania stwierdzili, że maksymalna tolerowana dawka może zostać uznana za przekroczoną w przypadku długotrwałego narażenia. Wskaźniki przeżywalności pokolenia  $F_1$  (141. ÷ 144. tyg.) pod koniec okresu narażania zwiększyły się u narażanych zwierząt w zależności od dawki. Zwiększona śmiertelność zwierząt w grupie kontrolnej wynikała z większej częstości występowania zapalenia pęcherza moczowego, związanego z obecnością kamieni

w pęcherzu moczowym u samców szczurów, oraz wcześniejszego występowania nefropatii i nowotworów przysadki u samic. Wspomniane objawy mogły wynikać ze stosowania paszy półsyntetycznej. W badaniu histopatologicznym przeprowadzonym pod koniec okresu doświadczalnego, tj. 141. ÷ 144. tygodnia, stwierdzono zależne od dawki zwiększenie częstości występowania gruczolaków wątrobowokomórkowych po narażeniu na BHT w dawce 100 mg/kg mc. i większych dawkach oraz raków wątrobowokomórkowych po BHT w dawce 250 mg/kg mc. Pierwsze nowotwory wystąpiły po 115 tygodniach (Olsen i in. 1986).

Szczury Sprague-Dawley otrzymywały z paszą BHT w dawkach do 160 mg/kg mc./dzień przez okres 3 ÷ 24 miesięcy (10 samców i 10 samic) lub przez całe życie (15 samców i 15 samic). U badanych zwierząt nie stwierdzono zwiększonej częstości występowania zmian nienowotworowych ani nowotworowych (Shell Oil Company 1978).

W niektórych badaniach przeprowadzonych na szczurach nie obserwowano istotnie zwiększonej częstości występowania nowotworów (Hirose i in. 1981; NCI 1979; Shell Oil Company 1978), dlatego przeprowadzono badanie przewlekłe podobne do badania Olsena i in. (1986). Zamiast półsyntetycznej paszy zastosowano standardową paszę, a maksymalny okres badania wyniósł około 98 tygodni zamiast 144. Ponadto u narażanych zwierząt oznaczano aktywność enzymów wątrobowych. BHT w dawce 100 mg/kg mc./dzień i większych dawkach spowodował zależne od dawki wyraźne zwiększenie aktywności tlenu w wątrobie o mieszanej funkcji z równoczesnym powiększeniem wątroby. Po 88 tygodniach u zwierząt karmionych paszą zawierającą BHT w dawce 250 mg/kg mc. stwierdzono w wątrobie zwiększoną częstość występowania guzków oraz zmian ogniskowych, a także niedobór glukozy-6-fosfatazy. Nie stwierdzono natomiast zwiększonej zapadalności na gruczolaki lub raki wątroby (CEFIC-EBMA 1994). Badanie ujawniło przednowotworowe zmiany w wątrobie po mniej więcej 98 tygodniach narażenia.

Samcom szczurów F344 (27 w grupie) podawano z paszą BHT o stężeniu 12 000 ppm (około 900 mg/kg mc./dzień) przez 110 tygodni (od 11. tyg. życia). U badanych zwierząt stwierdzono zmniejszenie masy ciała o około 10%. Zmniejszenie

dawki BHT do 6000 ppm (około 450 mg/kg mc./dzień) i podawanie jej przez 76 tygodni nie wywołało większej liczby przypadków występowania zmian ogniskowych w wątrobie. Odnotowano nieistotnie statystycznie zwiększenie częstości występowania gruczolaków wątroby u zwierząt z grupy o największym narażeniu (2/6; co odpowiada 33%) w porównaniu z grupą kontrolną (3/17; co odpowiada 17%), (Williams i in. 1990b).

Działania rakotwórczego BHT nie wykazano w badaniach przeprowadzonych na myszach B6C3F1 (50 samców i 50 samic) otrzymujących z paszą BHT w dawkach: 0; 30; 150 i 600 mg/kg mc./dzień przez 104 tygodnie (Shirai i in. 1982).

Podawanie z paszą BHT myszom B6C3F1 obu płci (50 samców i 50 samic/grupę) w dawce około 1640 lub 3480 mg/kg mc./dzień (samce) oraz 1750 lub 4130 mg/kg mc./dzień (samice) przez 104 tygodnie spowodowało zależne od dawki zwiększenie częstości występowania ognisk zmienionych hepatocytów (ognisk przednowotworowych) i gruczolaków wątrobowokomórkowych, ale nie raka wątroby. Zaobserwowano nieistotnie statystycznie zwiększenie częstości występowania gruczolaków płuc. U samców i samic odnotowano zależne od dawki zmniejszenie przyrostów masy ciała, które wynosiły do 20% u samców z grupy otrzymującej duże dawki. U samic skutek ten był wyraźniejszy bez względu na dawkę i niekiedy wynosił około 30% w stosunku do zwierząt z grupy kontrolnej (Inai i in. 1988). Należy zaznaczyć, że stopień czystości stosowanego BHT wynosił 96%.

#### *Badania właściwości promotora nowotworów*

BHT jest uważany za promotora nowotworów. Właściwość tę stwierdzono w różnych narządach, takich jak płuca myszy oraz wątroba, okrężnica, tarczycy, przedłożądek i pęcherz moczowy szczurów, po podaniu BHT w połączeniu z czynnikami rakotwórczymi, takimi jak uretan (myszy; 250 mg BHT/kg mc. dootrzewnowo 1 raz w tygodniu przez 12 tygodni) i 2-acetyloaminofluoren (szczury; 5000 ppm w paszy odpowiadało około 375 mg/kg mc./dzień), (BUA 1991).

BHT w najmniejszych dawkach (0,03% w paszy) z jednej strony wykazywał działanie przeciw-rakotwórcze, a z drugiej strony działanie promujące nowotwory (6 × 50 mg/kg mc.). Uważa się, że schemat podawania BHT może wpływać na jakość

obserwowanego skutku. Działanie antynowotworowe obserwuje się po podaniu BHT przed lub razem z substancją rakotwórczą, natomiast jeśli BHT jest podawany po substancji rakotwórczej, należy spodziewać się działania wzmacniającego działania rakotwórcze (BUA 1991; Final report... 2002).

#### *Inhibitor komunikacji międzykomórkowej*

Niezależnie od rodzaju badanej linii komórkowej i czasu trwania inkubacji z BHT stwierdzono zahamowanie komunikacji międzykomórkowej w liniach komórkowych chomików (*Bohrman* i in. 1988; *Budunova* i in. 1989; *Trosko* i in. 1980; 1982), komórek nabłonka płuc myszy (*Chaudhuri* i in. 1993; *Guan* i in. 1995), komórek nabłonka wątroby szczurów (*Guan* i in. 1995) oraz hepatocytów szczura (*Williams* i in. 1990a).

#### *Transformacja komórek*

W badaniach przeprowadzonych na komórkach zarodka chomika syryjskiego (*Potenberg* i in. 1986), na kulturach hepatocytów nowo narodzonych szczurów Wistar (*Latino-Martel* i in. 1988), na komórkach BALB/3T3 (*Saito* i in. 1986; *Sakai, Sato* 1989) i na komórkach C3H/10T $\frac{1}{2}$  (*Djurhuus, Lillehaug* 1982) wykazano, że BHT nie powodował transformacji komórek. Podanie metylocholan-trenu (MC) jako inicjatora lub 12-O-tetradekanoiloforbol-13-octanu (TPA) jako promotora nie ujawniło żadnego skutku transformacji komórek (*Djurhuus, Lillehaug* 1982; *Saito* i in. 1986; *Sakai, Sato* 1989).

#### *Apoptoza*

Chinonometryd BHT i BHT prawie nie wywoływały apoptozy w różnych liniach komórek nabłonka płuc u myszy i ludzi, podczas gdy hydroksylowany BHT wykazywał wyraźne działanie apoptotyczne. Linie komórek nienowotworowych były bardziej wrażliwe na działanie apoptotyczne niż linie komórek nowotworowych (*Dwyer-Nield* i in. 1998).

#### **Jakościowa ocena rakotwórczości**

W UE BHT nie jest klasyfikowany pod względem działania rakotwórczego. Higieniści amerykańscy (ACGIH 2021) zaklasyfikowali BHT do grupy A4,

czyli do czynników nieklasyfikowanych jako rakotwórcze dla ludzi. W Niemczech natomiast BHT zaklasyfikowano do grupy MAK 4, tj. kategorii rakotwórczości obejmującej substancje o właściwościach rakotwórczych, w przypadku których genotoksyczność nie odgrywa żadnej roli lub odgrywa marginalną rolę. Nie oczekuje się w ich przypadku znacznego wpływu na ryzyko wystąpienia raka u człowieka przy przestrzeganiu ustalonej wartości MAK (GESTIS 2021).

Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem (IARC 1986) uznała, że istnieją ograniczone dowody na rakotwórczość BHT u zwierząt doświadczalnych i nie może on być klasyfikowany pod względem działania rakotwórczego na ludzi (grupa 3).

#### **Działanie embriotoksyczne, teratogenne, wpływ na rozrodczość**

##### ***Działanie embriotoksyczne, teratogenne, wpływ na rozrodczość u zwierząt***

##### *Płodność*

Większość wyników badań dotyczących płodności zamieszczono w tabeli 4. Wszystkie przeliczenia stężeń BHT w paszy na dawki zostały podane za autorami poszczególnych prac badawczych lub za ekspertami niemieckimi. W badaniach jedno- i wielopokoleniowych przeprowadzonych na myszach i szczurach nie wykazano wpływu narażenia na BHT na płodność zwierząt. Upośledzenia płodności nie stwierdzono nawet po narażeniu ciężarnych samic na badaną substancję w dużych dawkach. Niewielkie zwiększenie częstości występowania anomalii nasienia myszy (C57BL/6xC3H/He) w pokoleniu F<sub>1</sub>, niezwiązane z dawką, obserwowano po pięciu dootrzewnowych iniekcjach BHT w dawce 62,5 mg/kg mc. i w większych dawkach (*Bruce, Heddle* 1979). Wyniku tego nie uwzględniono w ocenie płodności ze względu na braki metodologiczne.

##### *Toksyczność rozwojowa*

Wyniki badań toksyczności rozwojowej zamieszczono w tabeli 5.



**Tabela 4.** Jedno- i wielopokoleniowe badania na szczurach i myszach narażanych na 2,6-di-*tert*-butylo-4-metylofenol (BHT)  
**Table 4.** One- and multigeneration studies in rats and mice exposed to 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol (BHT)

Gatunek, szczep, płeć zwierząt, liczebność grupy	Warunki narażenia	Wyniki	Piśmiennictwo
Mysz, newsobny albinos i szczep z anoftalmią (bezocze), 144 ♀ łącznie	badanie pokoleniowe (wielokrotne krycie w pokoleniu F <sub>0</sub> przez 18 miesięcy); 0; 0,1; 0,5% w paszy o zawartości tłuszczu 10 lub 20% (około 0; 143; 714 mg/kg mc./dzień); badanie potomstwa w 1., 5. i 12. dniu po urodzeniu	aż do 714 mg/kg mc.: F <sub>1</sub> ; brak skutków; brak anoftalmii	Johnson 1965
Mysz CD-1, po 10 ♂/♀ w grupie	badanie pokoleniowe (F <sub>0</sub> , F <sub>1</sub> , F <sub>2</sub> ); 0; 0,015; 0,045; 0,135; 0,405% w paszy (około 0; 23; 68; 203; 608 mg/kg mc./dzień); pokolenie F <sub>0</sub> narażano od 5. tygodnia życia; krycie pokolenia F <sub>0</sub> i F <sub>1</sub> w wieku 9 tyg.; badanie pokolenia F <sub>2</sub> do 4. dnia po urodzeniu	23 mg/kg mc.: F <sub>1</sub> , F <sub>2</sub> : istotne zwiększenie masy ciała w okresie laktacji F <sub>2</sub> : rotacja zredukowana o 180° w 21. dniu po urodzeniu u ♂ po wszystkich dawkach, brak zależności dawka-skutek  68 mg/kg mc.: F <sub>1</sub> , F <sub>2</sub> : aktywność w teście „otwartego pola” znacznie zmniejszona (w 21. dniu po urodzeniu; brak tego skutku w przypadku pozostałych dawek)  203 mg/kg mc.: F <sub>1</sub> : zmniejszone przyrosty masy ciała w okresie laktacji  608 mg/kg mc.: F <sub>1</sub> : zmniejszone przyrosty masy ciała w okresie laktacji F <sub>2</sub> : przedłużona ujemna geotaksja (tylko w 4. dniu po urodzeniu)	Tanaka i in. 1993
Mysz Swiss Webster, ♂/♀	badanie pokoleniowe (F <sub>0</sub> , F <sub>1</sub> ); 0; 0,5% (około 714 mg/kg mc./dzień) w paszy; badanie zwierząt pokolenia F <sub>1</sub> do wieku 10 tyg.	714 mg/kg mc.: F <sub>1</sub> : skutki behawioralne (senność, agresja) i osłabienie zdolności uczenia się; brak danych dotyczących toksyczności prenatalnej i toksyczności matczynej	Stokes, Scudder 1974
Szczur Wistar, 40 lub 60 ♂/♀ w grupie	badanie pokoleniowe (F <sub>0</sub> , F <sub>1</sub> ); 0, 25, 100, 250 (F <sub>1</sub> ), 500 (F <sub>0</sub> ) mg/kg mc./dzień w półsyntetycznej paszy, początek narażenia 13 tyg. przed kojarzeniem; badanie potomstwa do 141. ÷ 144. tyg. życia	25 mg/kg mc.: F <sub>1</sub> : znaczne zmniejszenie masy ciała potomstwa po odstawieniu od matek (5%)  100 mg/kg mc.: F <sub>1</sub> : zmniejszona masa urodzeniowa; zmniejszenie masy ciała potomstwa po odstawieniu od matek (7%)  250 mg/kg mc.: F <sub>1</sub> : zmniejszona wielkość miotu (9,1 w porównaniu z 10,9); zmniejszenie masy ciała potomstwa po odstawieniu od matek (41%)  500 mg/kg mc.: F <sub>0</sub> : nefrotoksyczność u matek, zatem dawkę zmniejszono do 250 mg/kg mc. w pokoleniu F <sub>1</sub>	Olsen i in. 1983; 1986
Szczur Wistar, 2 ♂, 16 ♀	badanie pokoleniowe (F <sub>0</sub> , F <sub>1</sub> ), (badanie ustalające zakres); 0, 500, 750, 1000 mg/kg mc. w standardowej paszy, początek narażenia 5 tyg. przed kojarzeniem; badanie samic i potomstwa do 21. dnia po urodzeniu	od 500 mg/kg mc.: F <sub>0</sub> : zwiększenie względnej masy wątroby (♀) F <sub>1</sub> : zredukowane przyrosty masy ciała podczas okresu laktacji (możliwy wpływ na ilość lub jakość mleka)	CEFIC-EBMA 1989; 1990; McFarlane i in. 1997

cd. tab. 4 / Table 4 cont.

Gatunek, szczep, płeć zwierząt, liczebność grupy	Warunki narażenia	Wyniki	Piśmiennictwo
		od 750 mg/kg mc.: F <sub>0</sub> : zredukowane przyrosty masy ciała (♀; ostatni tydzień ciąży) F <sub>1</sub> : zmniejszenie masy miotu i masy urodzeniowej  1000 mg/kg mc.: F <sub>0</sub> : zredukowane przyrosty masy ciała (♂); krycie mniej skuteczne	
Szczur Wistar, 7 ♂, 50 ♀	badanie pokoleniowe (F <sub>0</sub> , F <sub>1</sub> ); 0, 25, 100, 250 (F <sub>1</sub> ), 500 (F <sub>0</sub> ) mg/kg mc./dzień w standardowej paszy, rozpoczęcie narażenia 5 tyg. przed kojarzeniem; badanie pomiędzy 19. a 20. dniem ciąży, w 21. dniu pourodzeniowym, a potomstwo 4. i 22. tyg. po odstawieniu	25 mg/kg mc.: F <sub>1</sub> : NOAEL (enzymy wątroby: zwiększenie aktywności O-deetylazy etoksyrezorufiny i hydrolazy epoksydowej tylko u młodych zwierząt 4 tyg. po odstawieniu; sporadyczne przypadki powiększenia wątroby)  100 mg/kg mc.: F <sub>0</sub> : NOAEL F <sub>1</sub> : zwiększenie przyrostów masy ciała i względnej masy wątroby oraz indukcja enzymów wątroby (4. i 22. tyg. po odstawieniu)  250 mg/kg mc.: F <sub>1</sub> : zredukowane przyrosty masy ciała (4. i 22. tyg. po odstawieniu)  500 mg/kg mc.: F <sub>0</sub> : zwiększenie względnej masy wątroby (♀); indukcja enzymów wątroby F <sub>1</sub> : redukcja przyrostów masy ciała w okresie laktacji (możliwy wpływ na ilość lub jakość mleka)	CEFIC-EBMA 1990; 1994; McFarlane 1994; McFarlane i in. 1997
Szczur Sprague-Dawley, po 13 ♀ w grupie	badanie pokoleniowe (F <sub>0</sub> , F <sub>1</sub> ); 0, 0,125; 0,25; 0,5% w paszy (około 0, 83, 167, 333 mg/kg mc./dzień) rozpoczęcie 14 dni przed kojarzeniem; badanie potomstwa do 90. dnia życia	83 mg/kg mc.: F <sub>1</sub> : brak wpływu  od 167 mg/kg mc.: F <sub>1</sub> : zwiększenie śmiertelności pourodzeniowej (pomiędzy 1. a 30. dniem)  333 mg/kg mc.: F <sub>1</sub> : zredukowanie przyrostów masy ciała; opóźniony rozwój przed odstawieniem (rotacja o 180°, otwarte oczy); brak skutków po odstawieniu	Vorhees i in. 1981
Szczur Sprague-Dawley, 16 ♂/♀ w grupie	badanie pokoleniowe (F <sub>0</sub> , F <sub>1A</sub> , F <sub>1B</sub> , F <sub>2A</sub> , F <sub>2B</sub> ); 0, 300, 1000, 3000 ppm w paszy zawierającej 20% tłuszczu (około 0, 20, 67, 200 mg/kg mc./dzień)	67 mg/kg mc.: F <sub>0</sub> , F <sub>1</sub> , F <sub>2B</sub> : brak skutków  200 mg/kg mc.: F <sub>0</sub> , F <sub>1A</sub> , F <sub>1B</sub> , F <sub>2B</sub> : zredukowane przyrosty masy ciała; zwiększenie poziomu cholesterolu w surowicy i zwiększenie względnej masy wątroby (badano tylko F <sub>0</sub> i F <sub>1B</sub> ); brak wpływu na parametry reprodukcji	Frawley i in. 1965

Objaśnienia:

♂ – samiec.

♀ – samica.

**Tabela 5.** Badania toksyczności rozwojowej u zwierząt narażonych na 2,6-di-*tert*-butylo-4-metylofenol (BHT)  
**Table 5.** Developmental toxicity studies in animals exposed to 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol (BHT)

Gatunek, szczep, płeć zwierząt, liczebność grupy	Warunki narażenia	Wyniki	Piśmiennictwo
Mysz CD-1, 20 ♀	po między 6. a 15. dniem ciąży, dawki: 0,2; 8; 39; 180 mg/kg mc./dzień	do 180 mg/kg mc.: samice ciężarne i płody: brak skutków	FDA 1972a
Mysz ICI SPF, 9 ÷ 20 ♀	7 tyg. przed kojarzeniem aż do 18. dnia ciąży, dawki: 0, 250, 300, 500 mg/kg mc. (ze względu na toksyczność początkową dawkę zmniejszono z 500 do 300, a później do 250 mg/kg mc.)	250 mg/kg mc.: samice ciężarne i płody: brak skutków  od 300 mg/kg mc.: samice: zwiększenie śmiertelności; zmniejszenie liczby ciałek żółtych; płody: zmniejszenie liczby płodów  500 mg/kg mc.: samice: zmniejszony indeks krycia	Clegg 1965
Mysz Evans Nr 1, 3 ÷ 7 ♀	32 ÷ 46 dni przed kojarzeniem do 18. dnia ciąży, dawki: 0, 750 mg/kg mc.	750 mg/kg mc.: samice i płody: brak skutków	Clegg 1965
Mysz Evans, 10 ♀	po między 1. a 18. dniem ciąży, dawki: 0, 750 mg/kg mc.	750 mg/kg mc.: samice i płody: brak skutków	Clegg 1965
Mysz Evans Nr 1, 83 ♀	raz po między 1. a 18. dniem ciąży, dawki: 0, 1000 mg/kg mc.	1000 mg/kg mc.: samice i płody: brak skutków	Clegg 1965
Mysz JCL-ICR, 26 ÷ 30 ♀	po między 7. a 13. dniem ciąży, dawki: 0, 70, 240, 800 mg/kg mc./dzień	240 mg/kg mc.: samice: brak skutków  800 mg/kg mc.: samice: zwiększenie masy śledziony; zmniejszenie masy nerek; płody: brak skutków	Hiraga 1978
Mysz JCL-ICR, 19 ÷ 20 ♀	w 9. dniu ciąży, dawki: 0, 1200, 1800 mg/kg mc.	od 1200 mg/kg mc.: samice: zwiększenie śmiertelności (10%); zmniejszenie przyrostu masy ciała; zwiększenie masy płuc; płody: nieznacznie opóźnione kostnienie  1800 mg/kg mc.: samice: zwiększenie śmiertelności (25%); zwiększenie masy śledziony	Hiraga 1978
Szczur Walter Reed-Carworth Farms, 11 ♀	po między 1. a 22. dniem ciąży, dawki: 0, 500 ppm (około 33 mg/kg mc./dzień) w paszy	brak niekorzystnych skutków; zmniejszenie spontanicznej częstości resorpcji	Telford i in. 1962
Szczur Wistar, co najmniej 23 ♀	po między 6. a 15. dniem ciąży, dawki: 0, 2, 10, 48, 225 mg/kg mc./dzień	aż do 225 mg/kg mc.: samice i płody: brak skutków	FDA 1972a
Szczur Sprague-Dawley, brak informacji o liczbie i płci zwierząt	po między 7. a 17. dniem ciąży, dawki: 0, 100, 200, 300, 400 mg/kg mc./dzień	samice: zwiększenie względnej masy wątroby po narażeniu na BHT w dużych dawkach (brak innych szczegółów)  aż do 400 mg/kg mc.: płody: brak skutków	Han i in. 1993
Szczur Porton SPF, 20 ♀	7 tyg. przed kojarzeniem aż do 18. dnia ciąży, dawki: 0, 500 mg/kg mc.	500 mg/kg mc.: samice i płody: brak skutków	Clegg 1965
Szczur Tuck albino lub Bengel hooded, 5 ÷ 8 ♀	10 tyg. przed kojarzeniem aż do 18. dnia ciąży, dawki: 0, 750 mg/kg mc.	750 mg/kg mc.: samice i płody: brak skutków	Clegg 1965

cd. tab. 5 / Table 5 cont.

Gatunek, szczep, płeć zwierząt, liczebność grupy	Warunki narażania	Wyniki	Piśmiennictwo
Szczur Tuck albino, 5 ♀	między 1. a 20. dniem ciąży, dawki: 0, 750 mg/kg mc.	750 mg/kg mc.: samice i płody: brak skutków	Clegg 1965
Szczur Tuck albino, Carworth albino, ♀	raz w 9., 11. lub 13. dniu ciąży, dawki: 0, 1000 mg/kg mc.	1000 mg/kg mc.: samice i płody: brak skutków	Clegg 1965
Szczur, ♀, brak innych szczegółów	rozpoczęcie od 1. dnia ciąży, stężenia: 0; 0,0125; 0,0625; 0,313; 1,55% w paszy (około 0, 8, 42, 210, 1033 mg/kg mc./dzień)	aż do 210 mg/kg mc.: brak skutków  1033 mg/kg mc.: samice: drastyczne zmniejszenie masy ciała (brak innych szczegółów); płody: śmiertelność płodów (brak oceny miotów)	Ames i in. 1956
Chomik złoty (golden hamster), co najmniej 21 ♀	między 6. a 10. dniem ciąży, dawki: 0, 3, 13, 60, 280 mg/kg mc./dzień	aż do 280 mg/kg mc.: samice i płody: brak skutków	FDA 1972a
Królik Dutch belted, co najmniej 12 ♀	między 6. a 18. dniem ciąży, dawki: 0; 3,2; 14,9; 69,1; 320 mg/kg mc./dzień	kontrola: samice: padła 1/12 (14. dzień ciąży)  od 3,2 mg/kg mc.: płody: zwiększona częstość resorpcji i zmniejszona liczba żywych płodów (brak związku z dawką)  14,9 mg/kg mc.: samice: padły 3/15 (9., 11. i 17. dzień ciąży)  od 69,1 mg/kg mc.: samice: padły 3/19 (11., 13. i 15. dzień ciąży); 3 poronienia (10. i 25. dzień ciąży); płody: znacznie zwiększona liczba resorpcji; znacznie zmniejszona liczba żywych płodów; znacznie zmniejszona masa płodów  320 mg/kg mc.: samice: padły 3/18 (13., 14. i 15. dzień ciąży)	FDA 1974
Małpa rezus, 6 ♀	1 rok BHT i BHA 50 mg/kg mc./dzień, następnie  1 rok BHT i BHA 50 mg/kg mc./dzień z przerwą w okresie kojarzenia ♂; 2-letni okres obserwacji	50 mg BHT/kg mc. + 50 mg BHA/kg mc.: samice i potomstwo: brak skutków	Allen 1976

Objaśnienia:

♂ – samiec.

♀ – samica.

*Toksyczność rozwojowa w okresie przedurodzeniowym*

W badaniach przeprowadzonych na myszach nie wykazano toksyczności prenatalnej w wyniku narażenia na BHT w dawkach do 800 mg/kg mc./dzień (Clegg 1965; FDA 1972a; Hiraga 1978). BHT w dawce 800 mg/kg mc./dzień powodował u matek myszy zmiany masy ciała (Hiraga 1978). Jednorazowe podanie samicom myszy BHT w dawce 1200 lub 1800 mg/kg mc. w 9. dniu ciąży spowodowało niewielkie opóźnienie kostnienia (Hiraga 1978).

Działania embriotoksycznego nie odnotowano w przypadku narażenia szczurów na BHT

w dawkach do 750 mg/kg mc./dzień (Clegg 1965; FDA 1972a; Han i in. 1993).

Po 6-miesięcznym narażeniu na BHT samców i samic szczurów fantazyjnych norweskich (*Rattus norvegicus domestica*) stwierdzono utratę wzroku u zwierząt z 3 na 30 miotów. Jednak badania te są niedostatecznie udokumentowane, dlatego nie zostały wykorzystane do oceny toksyczności rozwojowej przedurodzeniowej (Brown i in. 1959).

BHT w dawkach do 280 mg/kg mc./dzień nie powodował także skutków działania embriotoksycznego u chomików (FDA 1972a).

W badaniach toksyczności prenatalnej ciężarnym samicom królików podawano dożołądkowo BHT przez zgłębnik pomiędzy 6. a 18. dniem ciąży w dawkach: 3,2; 14,9; 69,1 lub 320 mg/kg mc./dzień (tab. 6). Zwiększenie liczby przypadków resorpcji wystąpiło nawet po narażeniu na najmniejszą dawkę 3,2 mg/kg mc./dzień; zwiększenie śmiertelności ciężarnych samic oraz zmniejszenie liczby przypadków żywych płodów obserwowano po narażeniu na BHT odpowiednio w dawkach od 14,9 i od 69,1 mg/kg mc. Autorzy badania stwierdzili, że zarówno przeżywalność samic, jak i płodów nie była skorelowana z wielkością dawki. Nie stwierdzono zwiększonej częstości występowania anomalii szkieletowych ani trzewnych (FDA 1974). Przeprowadzona przez ekspertów niemieckich analiza powyższych danych dotyczących poszczególnych zwierząt wskazuje, że w przypadku matek z żywymi płodami liczba płodów na matkę i masa ciała płodów nie zmieniały się znacząco wraz ze zwiększeniem dawki. Zaobserwowano zwiększenie liczby resorpcji, w szczególności resorpcji całkowitej, od dawki 69,1 mg/kg mc./dzień. Ważność

tego badania jest znacznie ograniczona ze względu na bardzo zmienną płodność zastosowanego szczepu i nietypowe wyniki (śmiertelność matek i resorpcje) występujące w grupie kontrolnej. W badaniach przeprowadzonych na małpach reżus narażanych przez 2 lata na BHT w dawce 50 mg/kg mc./dzień łącznie z 50 mg BHA/kg mc./dzień nie stwierdzono toksyczności matczynej oraz żadnych objawów u ich potomstwa (Allen 1976).

#### Toksyczność rozwojowa w okresie pourodzeniowym

W badaniu wielopokoleniowym przeprowadzonym na myszach CD-1 nie obserwowano wpływu narażenia na BHT (do największego stężenia 0,405% BHT w paszy, tj. 608 mg/kg mc./dzień) na wielkość miotu oraz nie zaobserwowano żadnych zmian funkcjonalnych i behawioralnych u młodych z pokolenia F<sub>1</sub> aż do czasu odsadzenia od matek. Przyrosty masy ciała młodych w okresie karmienia przez samice były zmniejszone po BHT w dwóch dużych dawkach (203 lub 608 mg/kg mc./dzień), (Tanaka i in. 1993).

W niedostatecznie udokumentowanym badaniu na myszach Swiss odnotowano upośledzoną

**Tabela 6.** Badanie toksyczności rozwojowej 2,6-di-*tert*-butylo-4-metylofenolu (BHT) u królików (FDA 1974)

**Table 6.** Developmental toxicity study of 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol (BHT) in rabbits (FDA 1974)

Badane parametry	Dawki BHT, mg/kg mc./dzień				
	0	3,2	14,9	69,1	320
Liczba kojarzeń*	12	16	16	22	20
Ciąża*	12	12	15	19	18
Śmiertelność zwierząt*	1	0	3	3	3
Ciała żółte/samicę**	11,27±2,33 (11 zwierząt)	11,75±2,73 (12 zwierząt)	11,38±2,60 (13 zwierząt)	12,25±2,08 (16 zwierząt)	12,69±3,44 (16 zwierząt)
Liczba implantów/samicę**	8,27±2,28 (11 zwierząt)	7,75±2,67 (12 zwierząt)	9,92±1,71 (13 zwierząt)	9,44±2,17 (16 zwierząt)	10,06±3,45 (16 zwierząt)
Liczba miejsc resorpcji u wszystkich samic*	11	32	23	86	81
Żywe samice z całkowitymi resorpcjami lub martwymi urodzeniami**	2/11	3/12	2/12	6/16	6/15
Poronienia*	0	0	0	2	0
Żywe płody/ciężarne samice*	6,0	5,08	7,17	3,67	4,13
Żywe płody/samicę z żywym potomstwem**	7,33±3,08 (9 zwierząt)	6,78±2,33 (9 zwierząt)	8,55±1,33 (10 zwierząt)	6,88±2,03 (8 zwierząt)	6,89±2,89 (9 zwierząt)
Masa płodu*, g	39,8	39,7	37,3	35,4	34,6

Objaśnienia:

\* wyniki autorów pracy.

\*\* wyniki obliczeń przeprowadzonych przez naukowców niemieckich grupy MAK na podstawie danych dotyczących poszczególnych zwierząt.

zdolność uczenia się zwierząt oraz wpływ narażenia na BHT (0,5% BHT w paszy, tj. około 714 mg/kg mc./dzień) na badane parametry behawioralne u poszczególnych młodych  $F_1$  (Stokes, Scudder 1974).

W badaniu wielopokoleniowym przeprowadzonym na szczurach Wistar BHT podawano z paszą półsyntetyczną w dawkach: 25, 100 lub 500 mg/kg mc. Po podaniu BHT nawet w najmniejszej dawce 25 mg/kg mc. obserwowano znaczne zmniejszenie w porównaniu z masą zwierząt kontrolnych masy ciała młodych w momencie odstawienia od matek. BHT w dawce 100 mg/kg mc. powodował zmniejszenie masy urodzeniowej, a w dawce 500 mg/kg mc. zmniejszenie liczebności miotu (Olsen i in. 1983; 1986). W przeciwieństwie do tego zmniejszony przyrost masy ciała młodych obserwowano podczas okresu karmienia mlekiem tylko po dawce 500 mg/kg mc./dzień w badaniu wielopokoleniowym przeprowadzonym w ramach tego samego schematu badania (ale ze standardową paszą zamiast paszy półsyntetycznej), (CEPIC-EBMA 1994). Zmniejszony przyrost masy ciała młodych stwierdzono również tylko po dawce 500 mg/kg mc./dzień w innym badaniu przeprowadzonym na szczurach Wistar. W badaniu dodatkowo odnotowano zaburzenia rozwojowe i behawioralne (Meyer, Hansen 1980). U szczurów Sprague-Dawley odnotowano

zwiększoną śmiertelność poporodową zaczynającą się od dawki 167 mg BHT/kg mc./dzień, zaburzenia rozwojowe po 333 mg BHT/kg mc./dzień (Vorhees i in. 1981) i zmniejszenie przyrostu masy ciała po dawce 200 mg BHT/kg mc./dzień (Frawley i in. 1965).

#### Podsumowanie

W badaniach jedno- i wielopokoleniowych przeprowadzonych na myszach i szczurach nie wykazano wpływu narażenia na BHT na płodność zwierząt, nawet wówczas kiedy na badaną substancję w dużych dawkach narażano ciężarne samice.

Z przeglądu piśmiennictwa wynika, że opisane skutki toksyczności rozwojowej obejmują skutki fetotoksyczne i embriotoksyczne występujące u potomstwa samic, które w okresie ciąży narażano na BHT drogą pokarmową (substancja podawana w paszy). Wśród objawów stwierdzono zwiększoną częstość resorpcji płodów, zwiększenie częstości martwych urodzeń, zmniejszoną liczbę żywych płodów, zmniejszenie masy miotu oraz masy urodzeniowej. Nie stwierdzono wpływu narażenia na BHT na parametry reprodukcji.

BHT nie znajduje się na liście substancji zaburzących funkcjonowanie układu hormonalnego (Endocrine disruptor... 2022). W 2014 r. Francja zgłosiła propozycję wprowadzenia BHT na tę listę.

## TOKSYKOKINETYKA

### Wchłanianie i rozmieszczenie

2,6-Di-*tert*-butylo-4-metylofenol (BHT) w niewielkim stopniu wchłania się przez skórę; wartość  $LD_{50}$  BHT po naniesieniu na skórę szczura (samce, samice) Sprague-Dawley wynosiła >2000 mg/kg mc. (ECHA 2021). Badania przeprowadzone w warunkach *in vitro* i *in vivo* wykazały, że zaledwie mniej niż 4% BHT przenika przez skórę (Final report... 2002).

Wchłanianie przez skórę BHT badano u szczurów i chomików. Na skórę samic i samców szczurów F344 zaaplikowano 240 mg BHT w 0,6 ml roztworu DMSO (co odpowiadało dawce 1967 lub 2286 mg/kg mc. odpowiednio dla samców i samic). Chomikom złocistym (samcom) naniesiono na skórę

480 mg BHT w roztworze 1,2 ml DMSO (co odpowiadało dawce 3097 mg/kg mc.). Zwierzętom obu gatunków substancje nanoszono na skórę 3 razy w tygodniu przez 4 tygodnie. Znikome skutki narażenia drogą skórną, takie jak nieznaczne zmniejszenie przyrostu masy ciała i brak zmian histopatologicznych w płucach oraz w innych narządach samców szczurów i chomików, świadczą również o niewielkim wchłanianiu BHT tą drogą (Miyakawa i in. 1986).

Po jednorazowej aplikacji na skórę świnek morskich 5 mg znakowanego  $^{14}C$  BHT w roztworze acetonu (1,66 mg BHT/cm<sup>2</sup>) 9,1% podanej dawki oznaczono w moczu, a 5% w kale po 7 dniach od narażenia (Courtheoux i in. 1985; Marty i in. 1984).

W warunkach *in vitro* naniesiono na skórę pobraną od świnek morskich BHT o stężeniu 200 µg/cm<sup>2</sup>, a po 30 min skórę przemyto. Całkowita ilość BHT, która wniknęła w skórę, wyniosła 0,13 µg/cm<sup>2</sup>, czyli 0,07% zastosowanej dawki (Final report... 2002).

Po naniesieniu znakowanego radioaktywnie BHT w nośniku zawierającym aceton (około 5 µg BHT/cm<sup>2</sup>; 15 µl acetonu/cm<sup>2</sup>) na skórę grzbietu szczurów (grubość 200 µm; 0,64 cm<sup>2</sup>) 2,3% radioaktywności przeniknęło przez skórę po 24 h, a 11,1% zastosowanej dawki pozostało w skórze (Bronaugh i in. 1989; 1990a; 1990b).

Dla BHT strumień 0,023 mg/cm<sup>2</sup> × h, czyli 45,3 mg/2000 cm<sup>2</sup>, uzyskuje się zgodnie z modelem *Fiserovej-Bergerovej* i in. (1990), a strumień <0,001 mg/cm<sup>2</sup> × h, czyli 0,4 mg/2000 cm<sup>2</sup>, według modelu *Guya* i *Potts*a (1993).

Po jednorazowej dootrzewnowej iniekcji myszom znakowanego <sup>14</sup>C BHT w dawce 400 mg/kg mc. stwierdzono 1,8 i 0,14% podanej radioaktywności odpowiednio w wątrobie i płucach. Maksymalne stężenia w wątrobie wystąpiły po 2 h, a w płucach po 4 ÷ 8 h (*Williamson* i in. 1978).

*Zhang* i in. (2020) wykazali największe stężenia BHT nie tylko w wątrobie, lecz również w nerkach. Jeżeli chodzi o metabolity, to 2,6-di-*tert*-butylo-4-hydroksy-4-metylo-2,5-cykloheksadion (BHT-chinol) gromadził się w wątrobie, podczas gdy 3,5-di-*tert*-butylo-4-kwas hydroksybenzoesowy (BHT-COOH) był głównym metabolitem oznaczanym w kale. Główną drogą wydalania BHT i jego metabolitów był układ pokarmowy, z kałem wydalaniu ulegało 25,1% dawki początkowej, a z moczem 1,27% tej dawki.

Można przypuszczać, że po narażeniu drogą pokarmową występuje duża biodostępność BHT zarówno u zwierząt doświadczalnych, jak i u ludzi. Po podaniu szczurom (samice, samce) drogą pokarmową BHT o stężeniach: 0,5%, 30 ppm i 45 ppm największy jego poziom stwierdzono w tkance tłuszczowej, a znacznie mniejszy w wątrobie (*Daniel*, *Gage* 1965). Po przerwaniu narażenia na substancję okres półtrwania wyznaczony dla tkanki tłuszczowej i wątroby wyniósł 7 ÷ 10 dni.

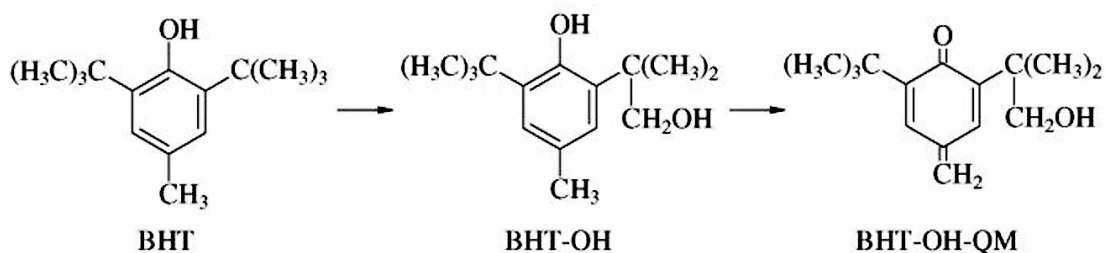
BHT szybko wchłania się z krwi do tkanek, a okres półtrwania u królików wynosił około 1 h (*El-Rashidy*, *Niazi* 1980).

W dostępnej literaturze nie znaleziono danych na temat wchłaniania BHT drogą inhalacyjną.

## Metabolizm i wydalanie

Metabolizm BHT badano u ludzi, królików, szczurów i myszy. Podstawowe szlaki metabolizmu BHT u wszystkich badanych gatunków obejmują procesy utleniania *para*-metylu i jednego lub obu podstawników *tert*-butylowych oraz pierścienia aromatycznego (*Ousji*, *Sleno* 2020). Utlenianie grupy metylowej jest katalizowane przez enzym mikrosomalny, oksydazę BHT i kilka pochodnych, które zidentyfikowano w wątrobie szczura. Utlenianie podstawnika *para*-metylowego jest główną drogą metabolizmu u szczurów i królików, a kwas BHT stanowi około 30% pobranej dawki.

Główny szlak metaboliczny prowadzi do powstania alkoholu BHT (BHT-OH), aldehydu BHT (BHT-CHO) i kwasu BHT (BHT-COOH) w wyniku stopniowego utleniania grupy 4-metylowej (*Hathaway* 1966). Szlak metaboliczny cykliczny przebiegający z powstaniem metabolitów chinoidowych utlenianych do C<sub>4</sub>, np. 2,6-di-*tert*-butylo-4-hydroperoksy-4-metylo-2,5-cykloheksadionu (BHT-OOH), (*Chen*, *Shaw* 1974; *Yamamoto* i in. 1979), zaobserwowano w mikrosomach wątroby szczura. Prawdopodobnie z tego szlaku pochodzą również takie metabolity, jak 2,6-di-*tert*-butylo-*p*-benzochinon i 2,6-di-*tert*-butylohydrochinon (*Yamamoto* i in. 1979). Kolejne metabolity chinoidowe, chinonometryd 2,6-di-*tert*-butylo-4-metylene-2,5-cykloheksadionu (*Takahashi*, *Hiraga* 1979) i BHT-OOH (*Yamamoto* i in. 1979), są uważane za metabolity reaktywne. U królików jako połączenia oznaczono głównie glukuronidy, zwłaszcza BHT-COOH, ale także niewielkie ilości glukuronidu hydrochinonu (*Tajima* i in. 1983). U szczurów oznaczono połączenie chinometrydu z glutationem (*Tajima* i in. 1983). Wciąż pozostaje kwestią kontrowersyjną, czy BHT-COOH jest również głównym metabolitem u ludzi (*Daniel* i in. 1968; *Holder* i in. 1970a). W badaniu przeprowadzonym u ludzi stwierdzono tylko niewielką ilość BHT-COOH, a za główny metabolit uznano 5-karboksy-7-(1-karboksy-1-metyloetylo)-3,3-dimetylo-2-hydroksy-2,3-dihydroksybenzofuran powstały po zamknięciu pierścienia i utlenieniu (*Wiebe* i in. 1978).



**Rycina 1.** Utlenianie 2,6-di-*tert*-butylo-4-metylofenolu (BHT) do hydroksylowanego 2,6-di-*tert*-butylo-4-metylofenolu, a następnie do hydroksylowanego chinonometrydu 2,6-di-*tert*-butylo-4-metylofenolu u myszy

**Figure 1.** Oxidation of 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol (BHT) to hydroxylated 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol and then to hydroxylated 2,6-di-*tert*-butyl quinonemethide-4-methylphenol in mice

Obserwowany u myszy toksyczny wpływ BHT na płuca nie koreluje jednak z powstaniem chinonometrydu BHT. Jest natomiast przypisywany zależnemu od CYP2B utlenianiu BHT do hydroksylowanego BHT, który jest następnie przekształcany w hydroksylowany chinonometryd BHT (ryc. 1). Hydroksylowany chinonometryd BHT jest bardziej reaktywny niż chinonometryd BHT i skuteczniej wiąże się z glutationem. Hydroksylowany chinonometryd oznaczono głównie w komórkach Clara myszy (Thompson i in. 1993).

## Wydalanie

U ludzi i gryzoni BHT jest wydalany w postaci metabolitów pochodzących z utlenienia jednej lub obu grup *tert*-butylowych. Podczas gdy u ludzi BHT wydalana się głównie z moczem, to w przypadku gryzoni 50 ÷ 80% jest wydalane z kałem (Daniel, Gage 1965; Ladomery i in. 1967a; 1967b; Holder i in. 1970b).

Po jednorazowym podaniu mężczyznom (ochotnikom) znakowanego <sup>14</sup>C BHT w całkowitej ilości 40 mg (odpowiada to w przybliżeniu dawce 0,5 mg/kg mc. zalecanej przez Komitet Ekspertów FAO/WHO ds. Dodatków do Żywności (JECFA 1980) jako maksymalne dopuszczalne dzienne spożycie dla człowieka) około 75% radioaktywności zostało wydalone z moczem, przy czym około 50% pobranej dawki uległo wydalaniu w ciągu 24 h od podania. Druga faza wydalenia związku macierzystego lub jego metabolitów przebiegała wolniej, co mogło być spowodowane gromadzeniem tych substancji w tkankach. Kinetyka wydalenia jest podobna zarówno dla BHA, jak i BHT (Daniel i in. 1967).

Wang i Kannan (2019) analizowali BHT i jego metabolity (kwas 3,5-di-*tert*-butylo-4-hydroksybenzoesowy – BHT-COOH) oznaczone w 145 próbkach moczu pobranych od mieszkańców Chin, Indii, Japonii, Arabii Saudyjskiej oraz Stanów Zjednoczonych. BHT oznaczono w 88% próbek moczu na poziomie 1,26 i 15 ng/ml. Oszacowana mediana dziennego spożycia (EDI) BHT, obliczona na podstawie stężeń tej substancji w moczu, u dzieci i dorosłych wynosiła odpowiednio 0,38 ÷ 56,6 i 0,21 ÷ 31,3 μg/kg mc./dobę. Stężenia BHT były duże w próbkach moczu pobranego od mieszkańców Japonii, Indii i Stanów Zjednoczonych.

Daniel i Gage (1965) wykazali, że opóźnienie w wydalaniu BHT przez szczura było spowodowane krążeniem jelitowo-wątrobowym.

U szczurów głównymi metabolitami 3,5-di-*tert*-butylo-4-hydroksytoluenu (BHT) są kwas 3,5-di-*tert*-butylo-4-hydroksybenzoesowy (kwas BHT), niezwiązany (9% dawki) i w postaci glukuronidu (15%), oraz S-(3,5-di-*tert*-butylo-4-hydroksybenzylo)-*N*-acetylcysteina. Kwas merkapturowy nie wydaje się pochodzić z powszechnie akceptowanego mechanizmu enzymatycznego i może obejmować nieenzymatyczną reakcję pomiędzy wolnym rodnikiem BHT a cysteiną. Ester glukuronidu i kwas merkapturowy oznaczone w moczu szczurów są również głównymi metabolitami w żółci szczura i są odpowiedzialne za krążenie jelitowo-wątrobowe. Niezwiązany kwas BHT jest głównym składnikiem szczurzych odchodów. U człowieka natomiast kwas BHT, wolny i związany, występuje w niewielkich ilościach w moczu, a kwas merkapturowy jest praktycznie nieobecny. Większość radioaktywności jest wydalana jako



nierozpuszczalny w eterze glukuronid metabolitu, w którym przy pierścieniu grupa metylowa i jedna grupa *tert*-butylometylowa są utleniane do grup karboksylowych, a grupa metylowa na drugiej grupie *tert*-butylowej jest również utleniona, prawdopodobnie do grupy aldehydowej. Różnice w metabolizmie szczura i człowieka tłumaczą różnicę w wydalaniu metabolitów przez oba gatunki (Daniel i in. 1968).

### Podsumowanie

2,6-Di-*tert*-butylo-4-metylofenol dobrze wchłania się drogą pokarmową i w niewielkim stopniu przez skórę, nie ma natomiast danych o wchłanianiu drogą inhalacyjną.

Po wchłonięciu BHT do organizmu największy jego poziom stwierdzono w tkance tłuszczowej, a znacznie mniejszy w wątrobie.

Głównymi metabolitami BHT oznaczonymi w moczu szczurów są ester glukuronidu i kwas merkapturowy. U człowieka natomiast kwas BHT, wolny i związany, występuje w niewielkich ilościach w moczu, a kwas merkapturowy jest praktycznie nieobecny. Głównym metabolitem jest natomiast 5-karboksy-7-(1-karboksy-1-metyloetylo)-3,3-dimetylo-2-hydroksy-2,3-dihydroksybenzofuran.

BHT szybko wchłania się z krwi do tkanek, a okres półtrwania u królików wynosi około 1 h. U ludzi około 50% pobranej dawki wydalane jest z moczem w ciągu 24 h od narażenia.

## MECHANIZM DZIAŁANIA TOKSYCZNEGO

### Wpływ na wątrobę

Wpływ 2,6-di-*tert*-butylo-4-metylofenolu (BHT) na wątrobę dotyczy głównie indukowania aktywności układu enzymatycznego metabolizującego ksenobiotyki (fenobarbital-tytu). Przejściowe zwiększenie aktywności *O*-dealkilazy 7-etoksyrezorufiny (EROD, CYP1A) i hydrolazy epoksydowej (EH) stwierdzono u młodych szczurów po podaniu 25 mg BHT/kg mc./dzień. Dawka 100 mg/kg mc./dzień i większe dawki prowadzą do zwiększenia aktywności EROD i EH, zwiększenia aktywności *S*-transferazy glutationu oraz znacznego zwiększenia aktywności *O*-dealkilazy-7-pento-ksyrezorufiny (PROD; CYP2B rodziny) u zwierząt z różnych grup wiekowych (CEFIC-EBMA 1994). Enzymy z podrodziny cytochromu P4502B są zlokalizowane w rejonie środkowych zrazików, a narażenie na BHT powodowało zmiany w wątrobie, głównie w tym regionie (Powell, Connolly 1991). Hipertrofia i proliferacja retikulum endoplazmatycznego powodowały zaburzenia metabolizmu lipidów i glikogenu oraz późne następstwa, takie jak ogniska przednowotworowe oraz gruczolaki i raki wątroby. Wtórny wpływ na czynność i morfologię tarczycy również przypisano indukcji enzymów (WHO 1996).

Toksyczne działanie na wątrobę przypisuje się chinonometry, reaktywnemu metabolitowi,

który oznaczono w wątrobach szczurów (Tajima i in. 1981; Thompson i in. 1991; 1993). Skutki toksyczne wydają się widoczne tylko wtedy, gdy występuje przeciążenie fizjologicznych zdolności metabolicznych, na przykład w przypadku długotrwałego wyczerpywania się glutationu (Nakagawa i in. 1984). Wyniki badań wpływu BHT na proliferację komórek pokazują, że zwiększona proliferacja komórek w wątrobie szczurów F344 (Uno i in. 1994), szczurów Sprague-Dawley (Kerr i in. 1966; Lane, Lieber 1967), szczurów Wistar (Briggs i in. 1989; Powell, Grasso 1988) i myszy B6C3F1 (Miyagawa i in. 1995) występuje tylko w ciągu pierwszych kilku dni po narażeniu na BHT w dużych dawkach i szybko ulega zmniejszeniu aż do całkowitego zaniku po długotrwałym narażeniu (Briggs i in. 1989; CEFIC-EBMA 1994).

W przypadku naczelnych wątroba również była krytycznym narządem narażenia na BHT (Allen, Engblom 1972), aczkolwiek naczelne były mniej wrażliwe na działanie związku niż szczury Wistar. Ze względu na nieodpowiednią metodę zastosowaną w badaniu naczelnych (tylko 28-dniowe narażenie, mała liczba zwierząt, duża zmienność wyników i mała liczba badanych enzymów) nie można porównać uzyskanych wyników ze skutkami obserwowanymi u szczurów.

Zmiany obserwowane w wątrobie szczura narażonego na BHT, które należy uznać za istotne

również dla naczelnych i ludzi, można interpretować jako następstwo indukcji enzymów metabolizujących ksenobiotyki, które można oznaczyć biochemicznie. Chociaż mechanizmy indukcji enzymów nie są szczegółowo znane, można założyć, że jeśli unika się indukcji enzymów wątrobowych, nie oczekuje się wystąpienia toksycznych zmian w wątrobie lub powstania nowotworów wątroby.

### Wpływ na płuca

Badania na myszach wykazały, że narażenie na BHT powoduje uszkodzenia w płucach komórek pęcherzykowych typu I oraz w ramach naprawy prowadzi do proliferacji komórek pęcherzykowych płuc typu II. W tym samym czasie stymulowano fibrogenezę i angiogenezę (Adamson i in. 1977). Toksyczność płucna u myszy i promowanie nowotworu wywołane przez BHT po inicjacji uretanem wrażliwych szczepów myszy (np. BALB i A/J) przypisuje się hydroksylovanemu metylideno chinonowi BHT (Kupfer i in. 2002; Thompson i in. 1993; 2001). Charakterystyczne dla mechanizmu działania BHT u myszy jest to, że promo-

cja nowotworów płuc korelowała z przewlekłymi procesami zapalnymi płuc, w szczególności z gromadzeniem się makrofagów i limfocytów oraz powstawaniem prostaglandyn (np. PGE<sub>2</sub>), (Bauer i in. 2001). Zdaniem autorów zarówno zmiany reparacyjne – proliferacja komórek pęcherzyków płucnych typu II, jak i nadmierna synteza prostaglandyny E<sub>2</sub>, do której przyczyniają się zarówno komórki Clara, jak i makrofagi płucne, mogą powodować inicjację komórek płucnych do proliferacji klonalnej. Według tej teorii kompensacyjny rozrost pneumocytów z jednej strony, a mobilizacja makrofagów z drugiej strony są decydującymi procesami na drodze do powstania nowotworu. Proliferacja komórek jako skutek narażenia na BHT została stwierdzona w płucach różnych szczepów myszy, takich jak rasH2 (Umemura i in. 2002), CBA (Anderstam i in. 1982) i Swiss Webster (Witschi, Saheb 1974).

Aktywację BHT w płucach myszy do hydroksylowanego metylideno chinonu BHT obserwowano głównie u niektórych szczepów myszy, ale nie u szczurów, innych gryzoni lub naczelnych, dlatego tego skutku nie stosuje się do oceny toksyczności BHT u ludzi.

## DZIAŁANIE ŁĄCZNE

W dostępnym piśmiennictwie opisano kilka prac dotyczących narażenia na 2,6-di-*tert*-butylo-4-metylofenol (BHT) i inne związki.

Znany jest prooksydacyjny wpływ fenolowego przeciwutleniacza (witaminy E) w połączeniu z inicjatorami na ludzką lipoproteinę o małej gęstości. Wykazano, że stres oksydacyjny wywołany przez witaminę E w połączeniu z herbicydem parakwatem zwiększał uszkodzenia struktury chromosomów w hodowanych leukocytach płazów bezogonowych (*Pelophylax*). Badaniem stwierdzono, że fenolowy przeciwutleniacz witaminy E, syntetyczny analog 2,6-di-*tert*-butylo-*p*-krezolu (BHT), w połączeniu z parakwatem zwiększał strukturalne uszkodzenia chromosomów w hodowli leukocytów *Pelophylax* (*Rana nigromaculatus*) w większym stopniu niż sam parakwat lub parakwat plus fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADPP). Parakwat

plus strukturalne uszkodzenie chromosomów wzmocnione przez BHT było hamowane przez dysmutazę ponadtlenkową i katalazę rozkładającą nadtlenek wodoru. W teście opartym na redukcji kationów parakwatu stwierdzono, że BHT redukuje chemicznie kation parakwatu do rodnika monokationowego parakwatu. Wyniki te sugerują, że BHT oddaje elektrony parakwatowi i w ten sposób indukuje nagromadzenie reaktywnych form tlenu, co powoduje zwiększenie liczby uszkodzeń chromosomów (Hanada 2012).

Wykazano, że BHT podawany po substancji rakotwórczej, takiej jak uretan czy acetyloaminofluoren, nasila działanie rakotwórcze tych substancji (BUA 1991; Final report... 2002).

## ZALEŻNOŚĆ SKUTKU TOKSYCZNEGO OD WIELKOŚCI NARAŻENIA

Badania umożliwiające analizę zależności skutku toksycznego od wielkości narażenia zwierząt doświadczalnych przedstawiono w tabeli 7. Wszystkie przeliczenia stężeń 2,6-di-*tert*-butylo-4-mety-

lofenolu (BHT) w paszy na dawki zostały podane za autorami poszczególnych prac badawczych lub za ekspertami niemieckimi.

**Tabela 7.** Zależność skutku toksycznego od wielkości narażenia zwierząt doświadczalnych na 2,6-di-*tert*-butylo-4-metylofenol (BHT)  
**Table 7.** Dependence of toxic effect on the exposure of experimental animals to 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol (BHT)

Gatunek, szczep, płeć, liczba zwierząt w grupie	Warunki doświadczenia, stężenie/dawka BHT	Objawy działania toksycznego	Piśmiennictwo
Szczury Sprague-Dawley, 5 ÷ 15 ♂/♀	z paszą w dawce 10 mg/kg mc./dzień, czas narażenia: 12, 24, 48 i 96 tyg.	10 mg/kg mc./dzień: brak ujemnych objawów	Hiraga 1978; Ichikawa i in. 1972; Shell Oil Company 1978
Szczury Wistar, 11 ÷ 19 ♂	<i>in utero</i> i 98 tyg. po odsadzeniu, z paszą w dawce 25 mg/kg mc./dzień, czas narażenia: 98 tyg.	NOAEL 25 mg/kg mc./dzień: zmniejszony przyrost masy ciała; zwiększona aktywność enzymów wątroby ( <i>O</i> -deetylazy etoksyrezorufiny i hydrolazy epoksydowej) tylko u młodych zwierząt (4 tyg. po odsadzeniu)	CEFIC-EBMA 1994
Szczury Wistar, 10 ÷ 30 ♂	z paszą półsyntetyczną w dawce 25 mg/kg mc./dzień, czas narażenia: 90 dni	25 mg/kg mc./dzień: zwiększenie względnej masy tarczycy	Søndergaard, Olsen 1982
Szczury Wistar, 80 ÷ 100 ♂/♀	<i>in utero</i> (pokolenie F <sub>0</sub> ) z paszą półsyntetyczną w dawce 25 mg/kg mc./dzień, czas narażenia: 144 tyg.	25 mg/kg mc./dzień: zmniejszenie przyrostu masy ciała (♂ od 34. tyg.), zmniejszona śmiertelność	Olsen i in. 1986
Szczury F344, 21 ♂ narażanych, 37 ♂ kontrolnych	z paszą w dawce 75 mg/kg mc./dzień, czas narażenia: 76 tyg.	75 mg/kg mc./dzień: brak skutków ujemnych	Williams i in. 1990b
Szczury Wistar, 11 ÷ 19 ♂	<i>in utero</i> i 98 tyg. po odsadzeniu, z paszą w dawce 100 mg/kg mc./dzień, czas narażenia: 98 tyg.	100 mg/kg mc./dzień: zmniejszenie przyrostu masy ciała; zwiększenie aktywności enzymów wątrobowych (w tym aktywności <i>S</i> -transferazy glutationu i <i>O</i> -depentylazy pentoksyrezorufiny); nadczynność tarczycy	CEFIC-EBMA 1994
Szczury Wistar, 80 ÷ 100 ♂/♀	<i>in utero</i> z paszą półsyntetyczną w dawce 100 mg/kg mc./dzień, czas narażenia: 144 tyg.	100 mg/kg mc./dzień: zmniejszenie przyrostu masy ciała	Olsen i in. 1986
Szczury Wistar, 57 ♂/♀ (narażane), 36 ♂/♀ (zwierzęta kontrolne)	z paszą w dawce 125 mg/kg mc./dzień, czas narażenia: 104 tyg.	125 mg/kg mc./dzień: zmniejszenie przyrostu masy ciała (♂ do 36. tyg.; ♀ w 12. i 48. tyg.); zwiększenie względnej masy wątroby; zmniejszenie względnej masy śledziony (♀); zwiększenie poziomu cholesterolu we krwi (♂/♀); zmniejszenie poziomu trójglicerydów w osoczu; zwiększenie poziomu $\gamma$ -GT (♂); niewielkie zwiększenie liczby przypadków nowotworów (nieistotne statystycznie, brak zależności dawka-odpowiedź)	Hirose i in. 1981
Szczury Sprague-Dawley, 5 ÷ 15 ♂/♀	z paszą w dawce 160 mg/kg mc./dzień, czas narażenia: 12, 24, 48 i 96 tyg.	160 mg/kg mc./dzień: zwiększenie śmiertelności (♀ po 96 tyg.); zwiększenie masy wątroby (96 tyg.); brak zwiększenia liczby przypadków gruczolaków lub raków (w ciągu życia)	Hiraga 1978; Ichikawa i in. 1972; Shell Oil Company 1978
Szczury F344, 21 ♂ narażanych, 37 ♂ kontrolnych	z paszą w dawce 225 mg/kg mc./dzień, czas narażenia: 76 tyg.	225 mg/kg mc./dzień: zmniejszony przyrost masy ciała	Williams i in. 1990b

cd. tab. 7 / Table 7 cont.

Gatunek, szczerp, płeć, liczba zwierząt w grupie	Warunki doświadczenia, stężenie/dawka BHT	Objawy działania toksycznego	Piśmiennictwo
Szczury F344, 50 ♂/♀ (narażane), 20 ♂/♀ (zwierzęta kontrolne)	z paszą w dawce 225 mg/kg mc./dzień, czas narażenia: 105 tyg.	225 mg/kg mc./dzień: zwiększenie współczynnika przeżycia; zmniejszenie przyrostu masy ciała	NCI 1979
Szczury Wistar, 11 + 19 ♂	<i>in utero</i> i 98 tyg. po odsadzeniu, z paszą w dawce 250 mg/kg mc./dzień, czas narażenia: 98 tyg.	250 mg/kg mc./dzień: zwiększona częstość występowania ognisk i guzków wątrobowokomórkowych; zwiększony poziom tyroksyny w tarczycy	CEFIC-EBMA 1994
Szczury F344, 21 ♂ narażanych, 37 ♂ kontrolnych	z paszą w dawce 450 mg/kg mc./dzień, czas narażenia: 76 tyg.	450 mg/kg mc./dzień: zwiększenie względnej masy wątroby; nieistotne statystycznie zwiększenie częstości występowania nowotworów (33% w porównaniu do 17% u zwierząt z grupy kontrolnej)	Williams i in. 1990b
Szczury F344, 50 ♂/♀ (narażane), 20 ♂/♀ (zwierzęta kontrolne)	z paszą w dawce 450 mg/kg mc./dzień, czas narażenia: 105 tyg.	do około 450 mg/kg mc./dzień: brak zwiększenia częstości występowania zmian neoplastycznych lub nieneoplastycznych	NCI 1979
Myszy B6C3F1, 50 ♂/♀ (narażane), 20 ♂/♀ (zwierzęta kontrolne)	z paszą w dawce 450 mg/kg mc./dzień, czas narażenia: 108 tyg.	450 mg/kg mc./dzień: zwiększenie liczby przypadków gruczolaków płuc (♀; wg autorów nie były związane z narażeniem)  od 450 mg/kg mc./dzień: zmniejszenie przyrostu masy ciała; zwiększenie współczynnika przeżycia; degeneracja komórek wątroby (♂); hepatocytomegalia; <i>peliosis hepatis</i> (schorzenie naczyniowe charakteryzujące się licznymi, losowo rozmieszczonymi, wypełnionymi krwią jamami w całej wątrobie)	NCI 1979
Szczury Wistar, 57 ♂/♀ (narażane), 36 ♂/♀ (zwierzęta kontrolne)	z paszą w dawce 500 mg/kg mc./dzień, czas narażenia: 104 tyg.	500 mg/kg mc./dzień: zmniejszenie przyrostu masy ciała; zwiększenie śmiertelności (♂ od 96 tyg.)	Hirose i in. 1981
Myszy B6C3F1, 50 ♂/♀ (narażane), 20 ♂/♀ (zwierzęta kontrolne)	z paszą w dawce 900 mg/kg mc./dzień, czas narażenia: 108 tyg.	900 mg/kg mc./dzień: zmniejszenie przyrostu masy ciała; zwiększenie współczynnika przeżycia; degeneracja komórek wątroby (♂); hepatocytomegalia; <i>peliosis hepatis</i> (schorzenie naczyniowe charakteryzujące się licznymi, losowo rozmieszczonymi, wypełnionymi krwią jamami w całej wątrobie); brak zwiększenia częstości występowania zmian neoplastycznych	NCI 1979
Szczury F344, 27 ♂	z paszą w dawce 900 mg/kg mc./dzień, czas narażenia: 110 tyg.	około 900 mg/kg mc./dzień: zmniejszenie przyrostu masy ciała; brak istotnego zwiększenia częstości występowania nowotworów	Williams i in. 1990b
Myszy B6C3F1, 50 ♂/♀	z paszą w dawce 1750 mg/kg mc./dzień, czas narażenia: 104 tyg.	od około 1700 mg/kg mc./dzień: zwiększenie współczynnika przeżycia (♂); zmniejszenie przyrostu masy ciała (♀); zwiększona częstość występowania zmian ogniskowych w wątrobie (♂)	Inai i in. 1988
Myszy B6C3F1, 50 ♂/♀	z paszą w dawkach 3480 + 4130 mg/kg mc./dzień, czas narażenia: 104 tyg.	od około 3800 mg/kg mc./dzień: zwiększenie częstości występowania gruczolaków wątroby (♂)	Inai i in. 1988

Objaśnienia:

♂ – samiec.

♀ – samica.

## NAJWYŻSZE DOPUSZCZALNE STĘŻENIE (NDS) W POWIETRZU NA STANOWISKACH PRACY ORAZ DOPUSZCZALNE STĘŻENIE W MATERIALE BIOLOGICZNYM (DSB)

### Istniejące wartości NDS i DSB

W Polsce dotychczas nie ustalono wartości najwyższego dopuszczalnego stężenia (NDS) 2,6-di-tert-butyl-4-metylofenolu (BHT) w powietrzu środowiska pracy.

Zestawienie wartości normatywów higienicznych BHT w poszczególnych państwach zamieszczono w tabeli 8.

W Stanach Zjednoczonych w ACGIH i NIOSH ustalono wartości normatywów higienicznych środowiska pracy dla BHT (ACGIH 2020).

Higieniści amerykańscy (ACGIH 2001) uważają, że nie ma dowodów potwierdzających działanie drażniące BHT na oczy i błony śluzowe układu oddechowego, mimo że w kartach charakterystyki substancji niebezpiecznych takie działanie jest wymieniane (Genium Publishing Corp. 1999).

Higieniści amerykańscy w przypadku narażenia zawodowego na BHT zalecają wartość TLV – TWA na poziomie  $2 \text{ mg/m}^3$  (0,22 ppm). Biorąc pod uwagę, że BHT jest nielotnym ciałem stałym o stężeniu pary nasyconej wynoszącym około  $120 \text{ mg/m}^3$  (13 ppm), TLV – TWA dotyczy narażenia na parę i aerozol. W temperaturze otoczenia BHT występuje przeważnie w fazie aerozolu, a przy stężeniu  $2 \text{ mg/m}^3$  faza parowa prawdopodobnie nie przekroczyłaby 0,11 ppm (3% wartości  $\text{RD}_{50}$ ). Wykazane u myszy zmniejszenie częstości oddechów ( $\text{RD}_{50} = 3,6 \text{ ppm}$ ) po narażeniu na parę BHT wskazuje na działanie drażniące tej substancji na oczy i górne drogi oddechowe (Stadler, Lavoie 1997), chociaż takiego działania nie odnotowano u osób zawodowo narażonych na związek. Zdaniem higienistów amerykańskich wartość TLV – TWA  $2 \text{ mg/m}^3$  zminimalizuje skutki działania układowego BHT oraz zabezpieczy przed ewentualnymi skutkami działania drażniącego u pracowników. Ocena działania rakotwórczego BHT wykazała, że substancja ta w zależności od dawki i badanych narządów może wpływać negatywnie lub pozytywnie na proces kancerogenezy. W konsekwencji BHT przypisano notację A4, tzn. substancja nieklasyfikowana jako czynnik rakotwórczy dla ludzi. Nie ma wystarczających danych, aby zalecić notację „Skin” i „SEN” oraz TLV – STEL.

W Niemczech BHT został zaliczony do substancji o działaniu układowym. Wartość MAK dla par i frakcji wdychalnej aerozolu BHT ustalono na poziomie  $10 \text{ mg/m}^3$ , a wartość pikowego stężenia na poziomie  $40 \text{ mg/m}^3$ . Wartość pikowego stężenia nie może częściej niż 4 razy dziennie przekroczyć przez 15 min dwukrotnej wartości MAK. Eksperti niemieccy MAK Commission (MAK 2007) uważają, że nie ma dowodów wskazujących na istotny potencjał genotoksyczny BHT.

Wyniki uzyskane w badaniach przeprowadzonych na szczurach Wistar i myszach B6C3F1 dostarczyły dowodów na to, że zwiększona częstość występowania nowotworów wątrobowokomórkowych może zaistnieć w specjalnych warunkach doświadczalnych (szczur; okres badania do 144 tyg.) lub w przypadku zastosowania bardzo dużych dawek BHT (mysz;  $3480 \text{ mg BHT/kg mc./dzień}$  podawanych przez 2 lata). W niektórych dwuetapowych eksperymentach inicjacji i promocji ujawniono działanie BHT promujące nowotwory. Badania nad hamowaniem komunikacji międzykomórkowej przeprowadzone w warunkach in vitro oraz stymulacji proliferacji komórek w warunkach in vitro i in vivo sugerują, że hepatokancerogenne działanie BHT obserwuje się w specjalnych warunkach, a wynika ono z właściwości BHT, tj. proliferujących lub promujących nowotwory. Dlatego eksperci niemieccy zaklasyfikowali BHT do 4. kategorii rakotwórczości, do której należą substancje o potencjalnych właściwościach rakotwórczych, w przypadku których genotoksyczność nie odgrywa żadnej roli lub odgrywa marginalną rolę. Nie oczekuje się w ich przypadku znacznego wpływu na ryzyko wystąpienia raka u człowieka przy przestrzeganiu ustalonej wartości MAK. Klasyfikacja opiera się głównie na dowodach potwierdzających, że zwiększenie proliferacji komórek i zmiany w sposobie ich różnicowania mają istotny związek z mechanizmami działania substancji. W celu scharakteryzowania ryzyka wystąpienia raka rozważa się różnorodne mechanizmy prowadzące do procesu kancerogenezy i charakterystyczne zależności dawka-czas-odpowiedź.

Decydujące znaczenie dla ustalenia wartości MAK ma działanie układowe BHT, głównie jego wpływ na wątrobę. Można oczekiwać, że stężenia BHT, które nie powodują mierzalnej indukcji enzymów indukujących ksenobiotyki w wątrobie, nie powodują promocji nowotworów. Dlatego indukcja tych enzymów jest uważana za główny skutek promocji nowotworu. Wartość NOAEL ustalona w badaniach przewlekłych dla działania BHT na wątrobę wynosi 25 mg/kg mc./dzień (CEFIC-EBMA 1994). Ze względu na to, że BHT w tej dawce powodował niewielkie skutki adaptacyjne u młodych zwierząt, przyjęto oszacowaną wartość NOEL wynoszącą około 10 mg/kg mc./dzień. W przypadku ludzi dawka 10 mg/kg mc./dzień odpowiada stężeniu w powietrzu 70 mg/m<sup>3</sup> przy masie ciała człowieka 70 kg i objętości powietrza 10 m<sup>3</sup> wchłoniętego przez drogi oddechowe w ciągu 8 h. Biorąc pod uwagę, że są to dane z badań na zwierzętach, wartość MAK ustalono na poziomie 10 mg/m<sup>3</sup>. Chociaż nie są dostępne żadne wyniki badań toksyczności inhalacyjnej po wielokrotnym narażeniu na BHT, wartość NOAEC (stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian) wynoszącą 146 mg/m<sup>3</sup> wyznaczono dla ostrego podrażnienia nerwów czuciowych myszy. BHT w stężeniu równym wartości MAK – 10 mg/m<sup>3</sup> nie powinien spowodować podrażnienia błon śluzowych dróg oddechowych (MAK 2007).

Po jednorazowym 24-godzinnym naniesieniu BHT na skórę kawii domowej 14% podanej dawki zostało wchłonięte przez skórę. W przeliczeniu na godzinne narażenie dermalne w miejscu pracy prawdopodobnie poniżej 1% zostanie wchłonięte

tą drogą. Zatem wchłanianie przez skórę przyczyni się w niewielkim stopniu do zwiększenia ogólnej dawki BHT w organizmie, dlatego eksperci niemieccy nie proponują oznaczenia substancji literą „H”.

Z danych uzyskanych z badania klinicznego osób narażonych na BHT wynika, że substancja ta wywoływała nieznaczny alergię kontaktową skóry. Nie ma również jednoznacznych wyników uzyskanych z badań na zwierzętach, dlatego BHT nie został oznaczony „Sh”. Ze względu na brak danych na temat działania uczulającego na drogi oddechowe nie oznakowano substancji literami „Sa”.

Dane uzyskane z badań na zwierzętach (myszy, szczury, chomiki) dotyczące toksyczności rozwojowej nie wskazują na prenatalną toksyczność BHT nawet w przypadku stosowania dużych dawek substancji. Ustalone wartości NOAEL dla tego rodzaju skutku dla myszy, szczurów i chomików wynosiły odpowiednio: 800, 750 i 280 mg/kg mc./dzień (maksymalne badane dawki). Pod względem toksyczności prenatalnej eksperci niemieccy zaklasyfikowali BHT do grupy C, tj. substancji, w przypadku których nie należy się obawiać ryzyka ze strony szkodliwego działania na płód, gdy stężenie związku jest mniejsze od ustalonej wartości MAK wynoszącej 10 mg/m<sup>3</sup> (co odpowiada 1,45 mg/kg mc./dzień). Zatem BHT zaklasyfikowano do grupy ryzyka ciąży C.

Nie ma dostępnych danych literaturowych, które uzasadniałyby klasyfikację BHT w jednej z kategorii zagrożenia dla działania mutagennego na komórki rozrodcze.

**Tabela 8.** Wartości normatywów higienicznych 2,6-di-*tert*-butylo-4-metylofenolu (BHT) w różnych państwach (ACGIH 2020; GESTIS 2021)

**Table 8.** Values of hygienic standards of 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol (BHT) in different countries (ACGIH 2020; GESTIS 2021)

Państwo	Wartość NDS, mg/m <sup>3</sup>	Wartość NDSCh, mg/m <sup>3</sup>	Oznaczenia
Australia	10	–	
Austria	10	–	
Belgia	2 (1)	–	
Dania	10	20	
Finlandia	10	20 (1)	
Francja	10	–	
Hiszpania	10	–	
Irlandia	2	–	
Kanada – Ontario	2 (1)	–	

cd. tab. 8 / Table 8 cont.

Państwo	Wartość NDS, mg/m <sup>3</sup>		Wartość NDSch, mg/m <sup>3</sup>	Oznaczenia
Kanada – Quebec	–		10 (1)	
Niemcy (AGS)	10 (1)		40 (1) (2)	
Niemcy (DFG)	10 (1)		40 (1) (2)	kategoria rakotwórczości: MAK 4
Nowa Zelandia	10		–	
Szwajcaria	10 frakcja wdychalna		–	
USA	ACGIH (2001)	2 frakcja wdychalna i pary	–	kategoria rakotwórczości: A4, działanie drażniące na górne drogi oddechowe
	NIOSH	10	–	
	OSHA	–	–	
Wielka Brytania	10		–	

Objaśnienia:

Belgia: (1) frakcja wdychalna aerozolu i pary.

Finlandia: (1) 15 min średnia wartość.

Kanada – Ontario: (1) frakcja wdychalna aerozolu i pary.

Kanada – Quebec: (1) 15 min średnia wartość.

Niemcy (AGS): (1) frakcja wdychalna aerozolu i pary (2) 15 min okres.

Niemcy (DFG): (1) frakcja wdychalna aerozolu i pary (2) 15 min średnia wartość.

MAK 4 – kategoria rakotwórczości, do której należą substancje o potencjalnych właściwościach rakotwórczych, w przypadku których genotoksyczność nie odgrywa żadnej roli lub odgrywa marginalną rolę. Nie oczekuje się w ich przypadku znacznego wpływu na ryzyko wystąpienia raka u człowieka przy przestrzeganiu ustalonej wartości MAK. Klasyfikacja opiera się głównie na dowodach potwierdzających, że zwiększenie proliferacji komórek i zmiany w sposobie ich różnicowania mają istotny związek z mechanizmami działania substancji. W celu scharakteryzowania ryzyka wystąpienia raka rozważa się różnorodne mechanizmy prowadzące do procesu kancerogenezy i charakterystyczne zależności dawka-czas-odpowiedź.

A4 – czynnik nieklasyfikowany jako rakotwórczy dla ludzi; czynniki budzące niepokój, jeżeli chodzi o ich działanie rakotwórcze, które nie mogą być ostаточно ocenione ze względu na brak danych. Testy in vitro oraz badania na zwierzętach nie dostarczają wskazówek wystarczających do zaklasyfikowania czynnika do którejkolwiek z pozostałych kategorii.

## Podstawy proponowanej wartości NDS

2,6-Di-*tert*-butylo-4-metylofenol został zaliczony do substancji o działaniu układowym, głównie hepatotoksycznym.

Podstawą do wyliczenia proponowanej wartości NDS było badanie przeprowadzone na szczurach Wistar (samce) narażanych na BHT w okresie przedurodzeniowym i pourodzeniowym trwającym około 98 tygodni po odstawieniu od matki (CEPIC-EBMA 1994). Badanie to obejmowało głównie wpływ BHT na wątrobę. Zdaniem autorów badania można oczekiwać, że stężenia BHT, które nie powodują mierzalnej indukcji enzymów indukujących ksenobiotyki w wątrobie, nie powodują promocji nowotworów. Wartość NOAEL ustalona przez autorów tych badań lub przez ekspertów niemieckich (MAK 2007) dla skutku BHT na wątrobę wynosi 25 mg/kg mc./dzień. Wprawdzie BHT w tej dawce powodował zmniejszony przyrost masy ciała oraz zwiększoną aktywność enzymów wątroby (*O*-deetylasy etok-

syrezorufiny i hydrolazy epoksydowej), ale tylko u młodych zwierząt. Zmiany te uznano za niewielką przejściową adaptację czynnościową wątroby głównie u młodych, ale nie u dorosłych zwierząt. Zdaniem autorów początkowych skutków adaptacyjnych obserwowanych po podaniu BHT w dawce 25 mg/kg mc./dzień nie można pominąć przy ocenie właściwości toksycznych substancji jako promującej nowotwory. BHT podany w większych dawkach, od około 100 mg/kg mc./dzień, powodował ponadto zwiększoną aktywność *S*-transferazy glutationowej i istotne zwiększenie aktywności *O*-depentylazy pentoksyrezorufinowej. Nowotwory i ogniska wątrobowokomórkowe obserwowano po podaniu zwierzętom BHT w dawce 250 mg/kg mc./dzień.

Wartość NOAEL ustalona w badaniach przewlekłych dla działania BHT na wątrobę wynosząca 25 mg/kg mc./dzień posłużyła do wyliczenia wartości NDS.

Dawka dzienna pobrana przez szczura ( $D_w$ ) wynosi 25 mg/kg mc. (NOAEL). Równoważną

dawkę dla człowieka ( $D_c$ ) wchłoniętą w czasie 8 h pracy obliczono na podstawie wzoru:

$$D_c = D_w \cdot \frac{W_h}{V_h},$$

w którym:

- $W_h$  – masa człowieka – 70 kg,  
 $V_h$  – objętość powietrza wdychana przez 8 h – 10 m<sup>3</sup>.

Po podstawieniu podanych wartości

$$D_c = 25 \frac{\text{mg}}{\text{kg mc.}} \cdot \frac{70 \text{ kg}}{10 \text{ m}^3} = 175 \text{ mg/m}^3.$$

Wartość NDS obliczono na podstawie wzoru:

$$\text{NDS} = \frac{D_c}{U_F},$$

w którym:

- $U_F$  – iloczyn współczynników niepewności:  
 $A = 2$ , związany z wrażliwością osobniczą człowieka  
 $B = 3$ , związany z różnicami międzygatunkowymi i drogą podania (badanie na szczurach, podanie w paszy),  
 $C = 1$ , narażenie trwało ponad 98 tygodni,  
 $D = 1$ , do wyliczenia wartości NDS przyjęto wartość NOAEL,  
 $E = 3$ , współczynnik modyfikacyjny dotyczy oceny kompletności danych oraz potencjalnych skutków odległych. U zwierząt doświadczalnych narażanych na BHT opisano skutki

toksyczności rozwojowej (fetotoksyczne, embriotoksyczne) oraz wykazano, że BHT jest promotorem nowotworów.

Po podstawieniu wartości do wzoru

$$\text{NDS} = \frac{175 \text{ mg/m}^3}{2 \cdot 3 \cdot 1 \cdot 1 \cdot 3} = 9,7 \text{ mg/m}^3 \approx 10 \text{ mg/m}^3.$$

Wartość NDS 2,6-di-*tert*-butylo-4-metylofenolu przyjęto na poziomie 10 mg/m<sup>3</sup>. Nie ma podstaw do ustalenia wartości chwilowej NDS<sub>ch</sub>, ponieważ substancja wykazuje niewielkiego stopnia działanie drażniące; z tego samego powodu nie przypisano substancji notacji „I” – substancja działająca drażniąco. Ustalona wartość powinna zabezpieczyć przed skutkami działania układowego i ewentualnego drażniącego związku. Ze względu na znikomą wchłanianalność BHT przez skórę oraz niską wartość LD<sub>50</sub> po narażeniu drogą skórną (>2000 mg/kg mc.) nie zaleca się oznakowania substancji notacją „skóra”. Wyniki badań klinicznych osób narażonych na BHT i wyniki badań na zwierzętach, oceniających działanie uczulające związku są niejednoznaczne, a więc nie dostarczają dowodów, aby oznakować substancję literą „A” (substancja o działaniu uczulającym). Nie ma podstaw do wyznaczenia wartości dopuszczalnego stężenia w materiale biologicznym (DSB).

## PIŚMIENNICTWO

Abe S., Sasaki M. (1977). Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster cells exposed to various chemicals. *J. Natl. Cancer Inst.* 58(6), 1635–1641.

ACGIH, American Conference of Governmental Industrial Hygienists (2001). Butylated hydroxytoluene (on CD-ROM TLVs and BEIs with 7<sup>th</sup> ed. Documentation).

ACGIH, American Conference of Governmental Industrial Hygienists (2021). Guide to Occupational Exposure Values. Cincinnati, USA.

Adamson I.Y., Bowden D.H., Cote M.G. i in. (1977). Lung injury induced by butylated hydroxytoluene: cytodynamic and biochemical studies in mice. *Lab. Invest.* 36(1), 26–32.

Alarie Y. (1981). Bioassay for evaluating the potency of airborne sensory irritants and predicting acceptable levels of exposure in man. *Food Cosmet. Toxicol.* 19(5), 623–626 [cyt. za: MAK 2007].

Allen J.R., Engblom J.F. (1972). Ultrastructural and biochemical changes in the liver of monkeys given butylated hydroxy-



- toluene and butylated hydroxyanisole. *Food Cosmet. Toxicol.* 10(6), 769–779.
- Allen J.R. (1976). Long-term antioxidant exposure effects on female primates. *Arch. Environ. Health* 31(1), 47–50.
- Ames S.R., Ludwig M.L., Swanson W.J. i in. (1956). Effect of DPPD, methylene blue, BHT and hydroquinone on reproductive process in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 93(1), 39–42.
- Anderstam B., Segerback D., Ehrenberg L. (1982). Studium av DNA-syntheshastigheten som mått på promotorverkan av partiklar från koleldat kraftverk. KHM Teknisk Rapport 29, Stockholm Universitet.
- Bardazzi F., Misciali C., Borrello P. i in. (1988). Contact dermatitis due to antioxidants. *Contact Dermatitis* 19(5), 385–386.
- Bauer A.K., Dwyer-Nield L.D., Hankin J.A. i in. (2001). The lung tumor promoter, butylated hydroxytoluene (BHT), causes chronic inflammation in promotion-sensitive BALB/cByJ mice but not in promotion-resistant CXB4 mice. *Toxicology* 169(1), 1–15.
- Bentley-Phillips B., Bayles M.A.H. (1974). Butylated hydroxytoluene as a skin lightener. *Arch. Dermatol.* 109(2), 216–217.
- de Boer E.M., van Ketel W.G., Bruynzeel D.P. (1989). Dermatoses in metal workers: (II). Allergic contact dermatitis. *Contact Dermatitis* 20(4), 280–286.
- Bohrman J.S., Burg J.R., Elmore E. i in. (1988). Interlaboratory studies with the Chinese hamster V79 cell metabolic cooperation assay to detect tumor-promoting agents. *Environ. Mol. Mutagen.* 12(1), 33–51.
- Bomhard E.M., Bremmer J.N., Herbold B.A. (1992). Review of the mutagenicity/genotoxicity of butylated hydroxytoluene. *Mutat. Res.* 277(3), 187–200 [cyt. za: ACGIH 2001].
- Bonin A.M., Baker R.S.U. (1980). Mutagenicity testing of some approved food additives with the Salmonella/microsome assay. *Food Technol. Aust.* 32(12), 608–611.
- Botterweck A.A.M., Verhagen H., Goldbohm R.A. i in. (2000). Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands Cohort Study. *Food Chem. Toxicol.* 38(7), 599–605.
- Brams A., Buchet J.P., Crutzen-Fayt M.C. i in. (1987). A comparative study, with 40 chemicals, of the efficiency of the Salmonella assay and the SOS chromotest (kit procedure). *Toxicol. Lett.* 38(1–2), 123–133.
- Briggs D., Lok E., Nera E.A. i in. (1989). Short-term effects of butylated hydroxytoluene on the Wistar rat liver, urinary bladder and thyroid gland. *Cancer Lett.* 46(1), 31–36.
- Bronaugh R.L., Stewart R.F., Storm J.E. (1989). Extent of cutaneous metabolism during percutaneous absorption of xenobiotics. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 99(3), 534–543.
- Bronaugh R.L., Collier S.W., Storm J.E. i in. (1990a). In vitro absorption/metabolism studies in human and animal skin. [In:] R.C. Scott, R.H. Guy, J. Hadgraft (eds.). Prediction of percutaneous penetration, methods, measurements, modelling. IBC Technical Services Ltd, 58–72.
- Bronaugh R.L., Collier S.S.W., Storm J.E. i in. (1990b). In vitro evaluation of skin absorption and metabolism. *J. Toxicol. Cut. Ocular. Toxicol.* 8(4), 453–467.
- Brown W.D., Johnson A.R., O'Halloran M.W. (1959). The effect of the level of dietary fat on the toxicity of phenolic antioxidants. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 37, 533–548.
- Bruce W.R., Heddle J.A. (1979). The mutagenic activity of 61 agents as determined by the micronucleus, Salmonella, and sperm abnormality assays. *Can. J. Genet. Cytol.* 21(3), 319–334.
- BUA (Beratergremium für Altstoffe), (GDCh-Advisory Committee on Existing Chemicals of Environmental Relevance). (1991). Butylated hydroxytoluene. BUA Report 58 S. Hirzel Verlag, Stuttgart [cyt. za: MAK 2007].
- BUA (GDCh-Advisory Committee on Existing Chemicals) (2000). BUA Report 219, Supplementary Report VI S. Hirzel Verlag, Stuttgart [cyt. za: MAK 2007].
- Budunova I.V., Mittelman L.A., Belitsky G.A. (1989). Identification of tumor promoters by their inhibitory effect on intercellular transfer of lucifer yellow. *Cell Biol. Toxicol.* 5(1), 77–89.
- CEFIC-EBMA (1989). Dose ranging experiment on the role of hepatocellular injury in the chronic toxicity of BHT. Final report 7/88/TX, Robens Institute of Health and Safety, University of Surrey, Surrey, UK [cyt. za: MAK 2007].
- CEFIC-EBMA (1990). Long term toxicity study effects produced by BHT in a two generation study: an overview of results obtained to date. Robens Institute of Health and Safety, University of Surrey, Surrey, UK [cyt. za: MAK 2007].
- CEFIC-EBMA (1994). The role of hepatocellular injury in the chronic toxicity of BHT: two generation Wistar albino rat study. Final Report RI93/TOX/0020, Robens Institute of Health and Safety, University of Surrey, Surrey, UK [cyt. za: MAK 2007].
- Chen C., Shaw Y.S. (1974). Cyclic metabolic pathway of a butylated hydroxytoluene by rat liver microsomal fractions. *Biochem. J.* 144(3), 497–501.
- Chipman J.K., Davies J.E., Paterson P. (1987). Mechanisms of butylated hydroxytoluene-mediated modulation of 2-acetylaminofluorene mutagenicity in rat and human hepatocyte/Salmonella assays. *Mutat. Res.* 187(3), 105–112.
- Chipman J.K., Davies J.E. (1988). Reduction of 2-acetylaminofluorene-induced unscheduled DNA synthesis in human and rat hepatocytes by butylated hydroxytoluene. *Mutat. Res.* 207(3–4), 193–198.
- Clegg D.J. (1965). Absence of teratogenic effect of butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT) in rats and mice. *Food Chem. Toxicol.* 3(3), 387–403.

- Courtheoux S.I., Wepierre J., Marty J.P.* (1985). Topical pharmacokinetics of [<sup>14</sup>C] butylated hydroxytoluene in the guinea pig. *Dermatology* 9, 153–164.
- Cumming R.B., Walton M.F., Kelley E.M.* i in. (1976). The lack of induction of specific-locus mutations in mice by long-term exposure to high levels of butylated hydroxytoluene. *Biology division annual progress report for period ending June 30, 1976*, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tennessee, USA, ORNL-5195, 20–22.
- Daniel J.W., Gage J.C.* (1965). The absorption and excretion of butylated hydroxytoluene (BHT) in the rat. *Food Cosmet. Toxicol.* 3(3), 405–415.
- Daniel J.W., Gage J.C., Jones D.I.* i in. (1967). Excretion of butylated hydroxytoluene (BHT) and butylated hydroxyanisole (BHA) by man. *Food Cosmet. Toxicol.* 5(4), 475–479.
- Daniel J.W., Gage J.C., Jones D.I.* (1968). The metabolism of 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxytoluene in the rat and in man. *Biochem. J.* 106(4), 783–790.
- Daugherty J.P., Davis S., Yielding K.L.* (1978). Inhibition by butylated hydroxytoluene of excision repair synthesis and semiconservative DNA synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80(4), 963–969.
- Daugherty J.P.* (1984). Mechanism of butylated hydroxytoluene-associated modification of diethyl-nitrosamine-induced squamous stomach carcinoma. *Food Chem. Toxicol.* 22(12), 951–961.
- Daugherty P.J., Franks H.* (1986). Effect of monocyclic derivatives on DNA repair in human lymphocytes. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 54(1), 133–136.
- Deichmann W.B., Gables C., Clemmer J.J.* i in. (1955). Toxicity of ditertiary-butylmethylphenol. *Arch. Ind. Health* 11, 93–101 [cyt. za: ACGIH 2001].
- Dellarco V.L., Mavournin K.H., Tice R.R.* (1985). Aneuploidy and health risk assessment: current status and future directions. *Environ. Mutagen.* 7(3), 405–424.
- Dissanayake M., Powell S.M.* (1989). Allergic contact dermatitis from BHT in leg ulcer patients. *Contact Dermatitis* 21(3), 195.
- Djurhuus R., Lillehaug J.R.* (1982). Butylated hydroxytoluene: tumor-promoting activity in an in vitro two-stage carcinogenesis assay. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 29, 115–120.
- Dwyer-Nield L.D., Thompson J.A., Peljak G.* i in. (1998). Selective induction of apoptosis in mouse and human lung epithelial cell lines by the tert-butyl hydroxylated metabolite of butylated hydroxytoluene: a proposed role in tumor promotion. *Toxicology* 130(2–3), 115–127.
- ECHA, European Chemicals Agency (2021). Registered Substances. 2,6-Di-tert-butyl-p-cresol (CAS number: 128-37-0, EC number: 204-881-4), <https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/15975/7/3/4> [dostęp: 12.10.2021].
- El-Rashidy R., Niazi S.* (1980). Comparative pharmacokinetics of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene in rabbits. *J. Pharm. Sci.* 69(12), 1455–1457.
- Endocrine disruptor assessment list (2021). ECHA, <https://echa.europa.eu/pl/ed-assessment>, aktualizacja: 6.04.2021 [dostęp: 6.04.2021].
- Ennever F., Rosenkranz S.* (1986). Short-term test results for NTP noncarcinogens: an alternate, more predictive battery. *Environ. Mutagen.* 8(6), 849–865.
- Epstein S.S., Shafner H.* (1968). Chemical mutagens in the human environment. *Nature* 219, 385–387.
- Epstein S.S., Arnold E., Andrea J.* i in. (1972). Detection of chemical mutagens by the dominant lethal assay in the mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 23(2), 288–325.
- FDA, Food and Drug Administration (1972a). Teratologic evaluation of FDA 71–25 (butylated hydroxytoluene – ionol). Food and Drug Research Labs, Inc., National Technical Information Service PB- 221782.
- FDA, Food and Drug Administration (1972b). Study of mutagenic effects of ionol C. P. (butylated hydroxytoluene) (71-25). Stanford Research Institute, National Technical Information Service PB-221827 [cyt. za: MAK 2007].
- FDA, Food and Drug Administration (1974). Teratologic evaluation of compound FDA 71–25 butylated hydroxytoluene (ionol) in rabbits. Food and Drug Research Labs, Inc., National Technical Information Service PB- 267201 [cyt. za: MAK 2007].
- FDA, Food and Drug Administration (1975). Mutagenic evaluation of compound FDA 71–25, butylated hydroxytoluene. Litton Bionetics, Inc., National Technical Information Services PB- 245487 [cyt. za: MAK 2007].
- Ferreri A.M., Grilli M.P., Capucci A.* i in. (1986). Effect of antioxidants on mutagenesis induced by DMBA in human cells. *Nutr. Cancer* 8(4), 267–272.
- Final report on the safety assessment of BHT (2002). [No authors listed]. *Int. J. Toxicol.* 21(Suppl. 2), 19–94 [cyt. za: MAK 2007].
- Fisherman E.W., Cohen G.* (1973). Chemical intolerance to butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT) and vascular response as an indicator and monitor of drug intolerance. *Ann. Allergy* 31(3), 126–133 [cyt. za: ACGIH 2001].
- Flyvholm M.A., Menné T.* (1990). Sensitizing risk of butylated hydroxytoluene based on exposure and effect data. *Contact Dermatitis* 23(5), 341–345 [cyt. za: ACGIH 2001].
- Frawley J.P., Kohn F.E., Kay J.H.* i in. (1965). Progress report on multigeneration reproduction studies in rats fed butylated hydroxytoluene (BHT). *Food Cosmet. Toxicol.* 3(3), 377–386.
- Fujita H., Hiraga K.* (1980). Effect of butylated hydroxytoluene on the mutagenicity of thiobendazole in the *Salmonella*

- microsome test. *Ann Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. Publ. Health.* 31, 26–28.
- Galloway S.M., Armstrong M.A., Reuben C. i in. (1987). Chromosome aberration and sister chromatid exchange in Chinese hamster ovary cells: evaluation of 108 chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.* 10(Suppl. 10), 1–176 [cyt. za: ACGIH 2001].
- Genium Publishing Corp. (1999). 2,6-Di-tert-butyl-p-cresol. [In:] Genium's Handbook of Environmental, Health, and Safety Data for Common Hazardous Substances CD-ROM. McGraw-Hill, New York [cyt. za: ACGIH 2002].
- GESTIS (2021). 2,6-Di-tert-butyl-p-cresol. GESTIS International Limit Values for chemical agents (Occupational exposure limits, OELs). IFA Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung, [https://limitvaleue.ifa.dguv.de/WebForm\\_ueliste2.aspx](https://limitvaleue.ifa.dguv.de/WebForm_ueliste2.aspx) [dostęp: 13.10.2021].
- GIS, Główny Inspektorat Sanitarny (2019). Baza danych prowadzona przez Wojewódzką Stację Sanitarno-Epidemiologiczną w Bydgoszczy zawierająca dane dotyczące ekspozycji pracowników na wybrane substancje chemiczne [dane nieopublikowane].
- Goh C.L., Ho S.F. (1993). Contact dermatitis from dielectric fluids in electrodischarge machining. *Contact Dermatitis* 28(3), 134–138.
- Grillo C.A., Dulout F.N. (1995). Cytogenetic evaluation of butylated hydroxytoluene. *Mutat. Res.* 345(1–2), 73–78 [cyt. za: ACGIH 2001].
- Grillo C.A., Dulout F.N. (1997). The effect of butylated hydroxytoluene on the chromosomal damage induced by bleomycin in Chinese hamster ovary cells. *Mutat. Res.* 375(1), 83–89.
- Grogan M.W. (1986). Toxicity from BHT ingestion (correspondence). *West J. Med.* 145(2), 245–246.
- Guan X., Hardenbrook J., Fernstrom M.J. i in. (1995). Down-regulation by butylated hydroxytoluene of the number and function of gap junctions in epithelial cell lines derived from mouse lung and rat liver. *Carcinogenesis* 16(10), 2575–2582.
- Guy R.H., Potts R.O. (1993). Penetration of industrial chemicals across the skin: a predictive model. *Am. J. Ind. Med.* 23(5), 711–719.
- Han S.Y., Kim P.G., Park K.L. i in. (1993). A teratogenicity study on phenolic antioxidants in rats. *Teratology* 48, 507.
- Hanada H. (2012). Phenolic antioxidant 2,6-di-tert-butyl-p-cresol (vitamin E synthetic analogue) does not inhibit 1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridium dichloride (paraquat)-induced structural chromosomal damage in cultured leukocytes of the dark-spotted-frog *Pelophylax (Rana) nigromaculatus*. *Hereditas* 149(5), 173–177.
- Hathaway D.E. (1966). Metabolic fate in animals of hindered phenolic antioxidants in relation to their safety evaluation and antioxidant function. *Adv. Food Res.* 15, 1–56.
- Heil J., Reifferscheid G. (1992). Detection of mammalian carcinogens with an immunological DNA synthesis-inhibition test. *Carcinogenesis* 13(12), 2389–2394.
- Heil J., Reifferscheid G., Waldmann P. i in. (1996). Genotoxicity of dental materials. *Mutat. Res.* 368(3–4), 181–194.
- Hiraga K. (1978). Chronic toxicity, teratogenicity and mutagenicity tests with dibutyl hydroxy toluene. Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health, Tokyo, Japan.
- Hirose M., Shibata M., Hagiwara A. i in. (1981). Chronic toxicity of butylated hydroxytoluene in Wistar rats. *Food Cosmet. Toxicol.* 19, 147–151.
- Holder G.M., Ryan A.J., Watson T.R. i in. (1970a). The metabolism of butylated hydroxy-toluene, (3,5-di-t-butyl-4-hydroxytoluene) in man. *J. Pharm. Pharmacol.* 22(5), 375–376.
- Holder G.M., Ryan A.J., Watson T.R. i in. (1970b). The biliary metabolism of butylated hydroxytoluene (3,5-di-t-butyl-4-hydroxytoluene) and its derivatives in the rat. *J. Pharm. Pharmacol.* 22(11), 832–838.
- IARC, International Agency for Research on Cancer (1986). IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Vol. 40, Some naturally occurring and synthetic food components, furocoumarins, and ultraviolet radiation, 161–170. IARC, Lyon, France.
- Ichikawa H., Fujii T., Kobayashi H. i in. (1972). Toxicological potentiation studies on food additives (II); subchronic oral toxicity of butylated hydroxytoluene, sodium nitrite and their combination in rats. *Kenkyu Nenpo-Tokyo-toritsu Eisei* 29, 345–371.
- Inai K., Kobuke T., Nambu S. i in. (1988). Hepatocellular tumorigenicity of butylated hydroxytoluene administered orally to B6C3F1 mice. *Jpn. J. Cancer. Res.* 79(1), 49–58.
- Ishidate M., Odashima S. (1977). Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells in vitro: a screening for chemical carcinogens. *Mutat. Res.* 48(3–4), 337–354.
- Ishidate M., Yoshikawa K., Sofuni T. (1980). A primary screening for mutagenicity of food additives in Japan. *Mutagen. Toxicol.* 3, 82–90.
- Ishidate M. (1983). Butylated hydroxytoluene: chromosomal aberration test in vitro. *Realize Inc, Japan*, 80.
- Ishidate M., Sofuni T., Yoshikawa K. i in. (1984). Primary mutagenicity screening of food additives currently used in Japan. *Food Chem. Toxicol.* 22(8), 623–636.
- Janicki S., Fiebig A., Sznitowska M. (2008). *Farmacja stosowana. Podręcznik dla studentów farmacji*. Warszawa, Wydawnictwo Lekarskie PZWL.
- JECFA, The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (1980). Butylated hydroxytoluene. [In:] *Toxicological evaluation of certain food additives*, WHO Additive Series

No. 15, 1106–1115. FAO/WHO, Geneva, Switzerland [cyt. za: MAK 2007].

Johnson A.R. (1965). A re-examination of the possible teratogenic effects of butylated hydroxytoluene (BHT) and its effect on the reproductive capacity of the mouse. *Food Cosmet. Toxicol.* 3(3), 371–375.

Kamra O.P. (1973). Radiosensitizing property of butylated hydroxytoluene in *Drosophila* sperm. *Int. J. Radiat. Biol.* 23(3), 295–297.

Kamra O.P., Rajaraman R. (1973). Potentiation of gamma-ray induced sex-linked recessive lethal mutations by butylated hydroxytoluene (BHT) in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 21, 9.

Kanerva L., Jolanki R., Estlander T. (1997). Allergic and irritant patch test reactions to plastic and glue allergens. *Contact Dermatitis* 37(6), 301–302.

Kanerva L., Jolanki R., Alanko K. i in. (1999). Patch-test reactions to plastic and glue allergens. *Acta Derm. Venereol.* 79(4), 296–300.

Karamova N.S., Il'inskaia O.N., Ivanchenko O.B. i in. (1997). [Genotoxic effects of tonarol]. *Genetika* 33, 1310–1312.

Karplyuk I.A. (1960). [Elementary raw fats containing phenolic antioxidants: an elevation from the point of view of hygiene]. *Vorp. Pitan.* 19, 67.

Kawachi T., Komatsu T., Kada T. i in. (1980). Results of recent studies on the relevance of various short-term screening tests in Japan. [In:] G.M. Williams, R. Kroes, H.W. Waaijers i in. (eds.). *The predictive value of short-term screening tests in carcinogenicity evaluation*, 253, 253–269.

Kawano S., Nakao T., Hiraga K. (1981). Strain differences in butylated hydroxytoluene-induced deaths in male mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 61(3), 475–479.

Kerr R., Lefevre A., Lane B. i in. (1966). Liver growth induced by butylated hydroxytoluene (BHT). *Clin. Res.* 14, 299.

Kinae N., Hashizume T., Makita T. i in. (1981). Studies on the toxicity of pulp and paper mill effluents: 1. Mutagenicity of the sediment samples derived from Kraft paper mills. *Water Res.* 15(1), 17–24.

Koch P. (1996). Kontaktallergien bei Metallarbeitern [Contact allergies in metal workers]. *Dermatosen Beruf Umwelt* 44, 62–67.

Kupfer R., Dwyer-Nield L.D., Malkinson A.M. i in. (2002). Lung toxicity and tumor promotion by hydroxylated derivatives of 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT) and 2-tert-butyl-4-methyl-6-iso-propylphenol: correlation with quinone methide reactivity. *Chem. Res. Toxicol.* 15(8), 1106–1112.

Ladomery L.G., Ryan A.J., Wright S.E. (1967a). The excretion of [<sup>14</sup>C] butylated hydroxytoluene in the rat. *J. Pharm. Pharmacol.* 19(6), 383–387

Ladomery L.G., Ryan A.J., Wright S.E. (1967b). The biliary metabolites of butylated hydroxytoluene in the rat. *J. Pharm. Pharmacol.* 19(6), 388–394.

Lane B., Lieber C.S. (1967). Effects of butylated hydroxytoluene on the ultrastructure of rat hepatocytes. *Lab. Invest.* 16, 342–348.

Latino-Martel P., Chaumontet C., François V. i in. (1988). An in vivo – in vitro model to study the cellular transformation elicited by liver tumor promoters: application to phenobarbital, butylated hydroxytoluene and butylated hydroxyanisole. [In:] A. Guillouzo (ed.). *Liver cells and drugs, Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd.*, 164, 459–464.

Le Coz C.J., Schneider G.A. (1998). Contact dermatitis from tertiary-butylhydroquinone in a hair dye, with cross-sensitivity to BHA and BHT. *Contact Dermatitis* 39(1), 39–40.

MAK (2007). 2,6-Di-tert-butyl-p-cresol (BHT). MAK Value Documentation, Vol. 23. First published: 31 January 2012, <https://doi.org/10.1002/3527600418.mb12837e0023> [dostęp: 11.05.2021].

Mallette F.S., von Haam E. (1952). Studies on the toxicity and skin effects of compounds used in the rubber and plastics industries: I. Accelerators, activators, and antioxidants. *AMA Arch. Ind. Hyg. Occup. Med.* 5(4), 311–317.

Marino A.A., Mitchell J.T. (1972). Lung damage in mice following intraperitoneal injection of butylated hydroxytoluene. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 140(1), 122–125.

Marty J.P., Courtheoux S., Maibach H. i in. (1984). Percutaneous absorption of <sup>14</sup>C-butylated hydroxytoluene and <sup>14</sup>C-malathion in the guinea pig: effect of repeated skin administration. *Biopharm Pharmacokinet. Eur. Congr.* 2nd, 1, 272–281.

Masubuchi M., Takahashi A., Takahashi O. i in. (1976). The cytogenetic studies and dominant lethal tests of long term administration with butylated hydroxytoluene (BHT) and linear alkyl-benzene sulfonate (LAS) in mice and rats. *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. Publisher Health* 27, 100–104.

Maxwell W.A., Newell G.W. (1974). Screening techniques for environmental mutagens. [In:] L. Prakash, F. Sherman, M.W. Miller i in. (eds.). *Molecular and environmental aspects of mutagenesis*, Charles C Thomas Publisher, Springfield, Ill, USA, 223–252.

McFarlane M. (1994). Butylated hydroxytoluene treatment prior to and during pregnancy in the rat: effects of subsequent exposure on hepatic biochemical and histological parameters in male offspring. Doctoral thesis, The Robens Institute, University of Surrey, Guildford, UK.

McFarlane M., Price S.C., Cottrell S. i in. (1997). Hepatic and associated response of rats to pregnancy, lactation and simultaneous treatment with butylated hydroxytoluene. *Food. Chem. Toxicol.* 35(8), 753–767.

McGregor D.B., Brown A., Cattanaach P. i in. (1988). Responses of the L5178Y tk+/tk- mouse lymphoma cell forward

- mutation assay to coded chemicals: II. 18 coded chemicals. Environ. Mol. Mutagen. 11(1), 91–118.
- Meneghini C.L., Rantuccio F., Lomuto M.* (1971). Additives, vehicles and active drugs of topical medicaments as causes of delayed-type allergic dermatitis. *Dermatologica* 143(3), 137–147.
- Meyer O., Blom L., Olsen P.* (1978). Influence of diet and strain of rat on kidney damage observed in toxicity studies. *Arch. Toxicol.* 1, 355–358.
- Meyer O., Hansen E.* (1980). Behavioural and developmental effects of butylated hydroxytoluene dosed to rats in utero and in the lactation period. *Toxicology* 16(3), 247–258.
- Meyer O., Blom L., Søndergaard D.* (1982). The influence of minerals and protein on the nephrocalcinosis potential for rats of semisynthetic diets. *Lab. Anim.* 16(3), 271–273.
- Meynadier J.M., Meynadier J., Colmas A.* i in. (1982). Allergie aux conservateurs [Allergy to preservatives]. *Ann. Dermatol. Venerol.* (Paris) 109, 1017–1023.
- Miyagawa M., Takasawa H., Sugiyama A.* i in. (1995). The in vivo – in vitro replicative DNA synthesis (RDS) test with hepatocytes prepared from male B6C3F1 mice as an early prediction assay for putative nongenotoxic (Ames-negative) mouse hepatocarcinogens. *Mutat. Res.* 343(2–3), 157–183.
- Miyakawa Y., Takahashi M., Furukawa F.* i in. (1986). Pneumotoxicity of butylated hydroxytoluene applied dermally to CD-1 mice. *Toxicol. Lett.* 34(1), 99–105.
- Morita K., Ishigaki M., Abe T.* (1981). Mutagenicity of materials related with cosmetics. *J. Soc. Cosmet. Chem. Jp.* 15(3), 243–253.
- Mortelmans K., Haworth S., Lawlor T.* i in. (1986). Salmonella mutagenicity tests: II. Results from the testing of 270 chemicals. *Environ. Mutagen.* 8(Suppl. 7), 1–119 [cyt. za: ACGIH 2001].
- Motolese A., Seidenari S.* (1994). Patch test reading: a comparison between 2 application methods. *Contact Dermatitis* 30, 49–50.
- Nagai F., Ushiyama K., Kano I.* (1993). DNA cleavage by metabolites of butylated hydroxytoluene. *Arch. Toxicol.* 67(8), 552–557.
- Nakagawa Y., Hiraga K., Suga T.* (1980). Biological fate of butylated hydroxytoluene (BHT) – binding of BHT to nucleic acid in vivo. *Biochem. Pharmacol.* 29, 1304–1306.
- Nakagawa Y., Hiraga K., Suga T.* (1981). On the mechanism of binding of <sup>14</sup>C-labeled butylated hydroxytoluene to liver ribonucleic acid in vivo. *Biochem. Pharmacol.* 30(22), 3132–3133.
- Nakagawa Y., Hiraga K., Suga T.* (1983). On the mechanism of covalent binding of butylated hydroxytoluene to microsomal protein. *Biochem. Pharmacol.* 32(8), 1417–1421.
- Nakagawa Y., Tayama K., Nakao T.* i in. (1984). On the mechanism of butylated hydroxytoluene-induced hepatic toxicity in rats. *Biochem. Pharmacol.* 33(16), 2669–2674.
- NCI, National Cancer Institute (1979). Bioassay of butylated hydroxytoluene (BHT) for possible carcinogenicity. NCI-CG-TR-150, National Cancer Institute, Bethesda, MD, National Technical Information Service PB 298539.
- NIOSH, The National Institute for Occupational Safety and Health (2021). <https://www.cdc.gov/niosh/npg/npgd0246.html> [dostęp: 6.05.2021].
- OECD, Organization for Economic Cooperation and Development (2020). ENV/JM/MONO (2020) 19, [https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2020\)19&docLanguage=en](https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2020)19&docLanguage=en) [dostęp: 11.05.2021].
- Ochi T., Ohsawa M.* (1985). Participation of active oxygen species in the induction of chromosomal aberrations by cadmium chloride in cultured Chinese hamster cells. *Mutat. Res.* 143(3), 137–142.
- Ohta T., Moriya M., Kaneda Y.* i in. (1980). Mutagenicity screening of feed additives in the microbial system. *Mutat. Res.* 77(1), 21–30.
- Olsen P., Bille N., Meyer O.* (1983). Hepatocellular neoplasms in rats induced by butylated hydroxytoluene (BHT). *Acta Pharmacol. Toxicol.* (Copenh.) 53(5), 433–434.
- Olsen P., Meyer O., Bille N.* i in. (1986). Carcinogenicity study on butylated hydroxytoluene (BHT) in Wistar rats exposed in utero. *Food Chem. Toxicol.* 24(1), 1–12.
- Osmundsen P.E.* (1980). Contact urticaria from nickel and plastic additives (butylhydroxytoluene, oleylamide). *Contact Dermatitis* 6(7), 452–454.
- Ousji O., Sleno L.* (2020). Identification of in vitro metabolites of synthetic phenolic antioxidants BHT, BHA, and TBHQ by LC-HRMS/MS. *Int. J. Mol. Sci.* 21(24), 9525.
- Paschin Y.V., Bahitova L.M.* (1984). Inhibition of the mutagenicity of benzo[a]pyrene in the V79/ HGPRT system by bioantioxidants. *Mutat. Res.* 137(1), 57–59.
- Paschin Y.V., Bakhitova L.M., Benthien T.I.* (1986). Increased antimutagenic activity of simple substituted phenols mixed with the hindered phenolic antioxidant dibunol. *Food Chem. Toxicol.* 24(8), 881–883.
- Patterson R.M., Keith L.A., Stewart J.* (1987). Increase in chromosomal abnormalities in Chinese hamster ovary cells treated with butylated hydroxytoluene in vitro. *Toxicol. In Vitro* 1(1), 55–57.
- Peiler D., Rustemeyer T., Pflug B.* i in. (2000). Allergic contact dermatitis in dental laboratory technicians. Part II: Major allergens and their clinical relevance. *Dermatol. Beruf Umwelt* 48(2), 48–54.

- PubChem (2021). 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/#query=128-37-0> [dostęp: 11.05.2021].
- Potenberg J., Schiffman D., Kahl R. i in. (1986). Modulation of benzo[a]pyrene-induced morphological transformation of Syrian hamster embryo cells by butylated hydroxytoluene and butylated hydroxyanisole. *Cancer Lett.* 33(2), 189–198.
- Potenberg J., von der Hude W., Bauszus M. i in. (1988). Enhancement and inhibition of benzo[a]pyrene-induced SOS function in *E. coli* by synthetic antioxidants. *Mutat. Res.* 207(1), 7–11.
- Powell C.J., Connelly J.C., Jones S.M. i in. (1986). Hepatic responses to the administration of high doses of BHT to the rat: their relevance to hepatocarcinogenicity. *Food Chem. Toxicol.* 24(10–11), 1131–1143.
- Powell C.J., Grasso P. (1988). Characteristics of the acute hepatic damage induced by high doses of BHT. *Hum. Toxicol.* 7, 70.
- Powell C.J., Connolly A.K. (1991). The site specificity and sensitivity of the rat liver to butylated hydroxytoluene-induced damage. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 108(1), 67–77.
- Prasad O.M., Kamra O.P. (1974). Radiosensitization of *Drosophila* sperm by commonly used food additives – butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* 25(1), 67–72.
- Rademaker M., Forsyth A. (1989). Contact dermatitis in children. *Contact Dermatitis* 20, 104–107.
- Rao V.S., Aiyar A.S. (1975). Mutagenicity evaluation studies with food additives and radiolytic products of sugars. *Proceedings of the Symposium on Mutagenicity, Carcinogenicity and Teratogenicity of Chemicals*, 104–114.
- Roed-Petersen J., Hjorth N. (1976). Contact dermatitis from antioxidants. *Br. J. Dermatol.* 94(3), 233–241.
- Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniające i uchylające dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniające rozporządzenie WE nr 1907/2006 ze zm. (Dz. Urz. WE L 353, 1–1355 ze zm.).
- Röper M. i in. (2000). Acylation and alkylation. *Ullmann's Encyclopedia of industrial chemistry* 7th ed. (1999–2016). New York, John Wiley & Sons. Online Posting Date: June 15, 2000.
- Rudner E.J. (1977). North American Group results. *Contact Dermatitis* 3(4), 208–209.
- Saito M., Ohkawa Y., Inui N. (1986). Retinoic acid and butylated hydroxyanisole inhibit promoter-enhanced transformation in vitro. *Cancer Lett.* 33(2), 161–165.
- Sakai A., Sato M. (1989). Improvement of carcinogen identification in BALB/3T3 cell transformation by application of a 2-stage method. *Mutat. Res.* 214(2), 285–296.
- Shirai T., Hagiwara A., Kurata Y. i in. (1982). Lack of carcinogenicity of butylated hydroxytoluene on long-term administration to B6C3F1 mice. *Food. Chem. Toxicol.* 20(6), 861–865.
- Schnuch A., Geier J., Uter W. i in. (1998). Patch testing with preservatives, antimicrobials and industrial biocides: results from a multicentre study. *Br. J. Dermatol.* 138(3), 467–476.
- Shell Oil Company (1978). Chronic toxicity, teratogenicity and mutagenicity tests with dibutyl hydroxy toluene. Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 32, NTIS-OTS0535892, Doc ID 88-920001303 [cyt. za: MAK 2007].
- Sheu C.W., Cain K.T., Rushbrook C.J. i in. (1986). Tests for mutagenic effects of ammoniated glycyrrhizin, butylated hydroxytoluene, and gum arabic in rodent germ cells. *Environ. Mutagen.* 8, 357–367.
- Shlian D.M., Goldstone J. (1985). Toxicity of butylated hydroxytoluene (Letter). *New Engl. J. Med.* 314, 648–649.
- Søndergaard D., Olsen P. (1982). The effect of butylated hydroxytoluene (BHT) on the rat thyroid. *Toxicol. Lett.* 10(2–3), 239–244.
- Stadler J.C., Lavoie D.A. (1997). Sensory irritation in mice with carpet emission chemicals. *Toxicologist* 36, 328 [cyt. za: ACGIH 2001].
- Stokes J.D., Scudder C.L. (1974). The effect of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene on behavioral development of mice. *Dev. Psychobiol.* 7(4), 343–350.
- Tajima K., Yamamoto K., Mizutani T. (1981). Biotransformation of butylated hydroxytoluene (BHT) to BHT-quinone methide in rats. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 29(12), 3738–3741.
- Tajima K., Yamamoto K., Mizutani T. (1983). Identification and determination of glutathione and glucuronide conjugates formed from butylated hydroxytoluene in rats. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 31(10), 3671–3677.
- Takahashi O., Hiraga K. (1978). Effects of low levels of butylated hydroxytoluene on the prothrombin index of male rats. *Food Cosmet. Toxicol.* 16(5), 475–477.
- Takahashi O., Hiraga K. (1979). 2,6-Di-tert-butyl-4-methylene-2,5-cyclohexadienone: a hepatic metabolite of butylated hydroxytoluene in rats. *Food Cosmet. Toxicol.* 17(5), 451–454.
- Takahashi O. (1992). Haemorrhages due to defective blood coagulation do not occur in mice and guinea-pigs fed butylated hydroxytoluene, but nephrotoxicity is found in mice. *Food Chem. Toxicol.* 30(2), 89–97.
- Tanaka T., Oishi S., Takahashi O. (1993). Three generation toxicity study of butylated hydroxytoluene administered to mice. *Toxicol. Lett.* 66(3), 295–304 [cyt. za: ACGIH 2001].
- Telford I.R., Woodruff C.S., Linford R.H. (1962). Fetal resorption in the rat as influenced by certain antioxidants. *Am. J. Anat.* 110, 29–36.
- Thompson J.A., Bolton J.L., Malkinson A.M. (1991). Relationship between the metabolism of butylated hydroxytoluene

- (BHT) and lung tumor promotion in mice. *Exp. Lung Res.* 17(2), 439–453.
- Thompson D.C., Thompson J.A., Sugumaran M. i in. (1993). Biological and toxicological consequences of quinone methide formation. *Chem. Biol. Interact.* 86(2), 129–162.
- Thompson J.A., Carlson T.J., Sun Y. i in. (2001). Studies using structural analogs and inbred strain differences to support a role for quinone methide metabolites of butylated hydroxytoluene (BHT) in mouse lung tumor promotion. *Toxicology* 160(1–3), 197–205.
- Trattner A., Farchi Y., David M. (2002). Cosmetics patch tests: first report from Israel. *Contact Dermatitis* 47(3), 180–181.
- Trosko J.E., Yotti L.P., Dawson B. i in. (1980). In vitro assay for tumor promoters. [In:] H. Stich, R.H.C. Sam (eds.). *Short-term tests for chemical carcinogens*. Springer, New York, USA, 420–427.
- Umamura T., Kodama Y., Hioki K. i in. (2002). The mouse rasH2/BHT model as an in vivo rapid assay for lung carcinogens. *Jpn. J. Cancer. Res.* 93(8), 861–866.
- Uno Y., Takasawa H., Miyagawa M. i in. (1994). An in vivo – in vitro replicative DNA synthesis (RDS) test using rat hepatocytes as an early prediction assay for non-genotoxic hepatocarcinogens: screening of 22 known positives and 25 noncarcinogens. *Mutat. Res.* 320(3), 189–205.
- US Consumer Product Safety Commission (1998a). Pulmonary/sensory irritation study of butylated hydroxytoluene (BHT) in mice. IIT Research Institute, Project No. LO6322, US Consumer Product Safety Commission, Bethesda, MD, USA [cyt. za: MAK 2007].
- US Consumer Product Safety Commission (1998b). Hazard assessment of butylated hydroxytoluene from urethane carpet cushions. US Consumer Product Safety Commission, Bethesda, MD, USA [cyt. za: MAK 2007].
- Wang W., Kannan K. (2019). Quantitative identification of and exposure to synthetic phenolic antioxidants, including butylated hydroxytoluene, in urine. *Environ. Int.* 128, 24–29.
- WHO, World Health Organisation (1991). Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants. WHO Technical Report Series 806, World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- WHO, World Health Organisation (1996). Safety evaluation of certain food additives. WHO Food Additives Series 35, World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Wiebe L.I., Mercer J.R., Ryan A.J. (1978). Urinary metabolites of 3,5-di-(1-[13C]methyl-1-methylethyl)-4-hydroxytoluene (BHT-13C) in man. *Drug. Metab. Dispos.* 6(3), 296–302.
- Williams G.M., Shimada T., McQueen C. i in. (1984). Lack of genotoxicity of butylated hydroxytoluene (BHT). *Toxicologist* 4, 104.
- Williams G.M., McQueen C.A., Tong C. (1990a). Toxicity studies of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene: I. Genetic and cellular effects. *Food. Chem. Toxicol.* 28(12), 793–798.
- Williams G.M., Wang C.X., Iatropoulos M.J. (1990b). Toxicity studies of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene: II. Chronic feeding studies. *Food Chem. Toxicol.* 28(12), 799–806.
- Williamson D., Esterez P., Witschi H.P. (1978). Studies on the pathogenesis of butylated hydroxytoluene-induced lung damage in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 43(3), 577–587.
- Witschi H., Saheb W. (1974). Stimulation of DNA synthesis in mouse lung following intraperitoneal injection of butylated hydroxytoluene. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 147(3), 690–693 [cyt. za: MAK 2007].
- Vollum D.I. (1971). Hypomelanosis from an antioxidant in polyethylene film. *Arch. Dermatol.* 104(1), 70–72.
- Vorhees C.V., Butcher R.E., Brunner R.L. i in. (1981). Developmental neurobehavioural toxicity of butylated hydroxytoluene in rats. *Food. Chem. Toxicol.* 19, 153–162.
- Yamamoto K., Tajima K., Mizutani T. (1979). Identification of new metabolites of butylated hydroxytoluene (BHT) in rats. *J. Pharm. Dyn.* 2, 164–168.
- Yamamoto K., Tajima K., Mizutani T. (1980). The acute toxicity of butylated hydroxytoluene and its metabolites in mice. *Toxicol. Lett.* 6(3), 173–175.
- Zhang R., Li J., Cui X. (2020). Tissue distribution, excretion, and metabolism of 2,6-di-tert-butyl-hydroxytoluene in mice. *Sci. Total Environ.* 739(Suppl. 2), 139862.
- Zimerson E., Bruze M. (2002). Contact allergy to the monomers in p-tert-butylphenol-formaldehyde resin. *Contact Dermatitis* 47(3), 147–153.

**Adres do korespondencji/Contact details:**

dr RENATA SOĆKO  
e-mail: renata.socko@imp.lodz.pl  
Instytut Medycyny Pracy  
im. prof. dr. med. Jerzego Nofera  
91-348 Łódź, ul. św. Teresy od Dzieciątka Jezus 8  
POLAND





## ZAKRES BADAŃ WSTĘPNYCH I OKRESOWYCH, NARZĄDY (UKŁADY) KRYTYCZNE, PRZECIWWSKAZANIA LEKARSKIE DO ZATRUDNIENIA W NARAŻENIU NA 2,6-DI-*TERT*-BUTYLO-4-METYLOFENOL

dr. n. med. Marcin Rybacki  
Instytut Medycyny Pracy  
im. prof. dr. med. Jerzego Nofera  
91-348 Łódź  
ul. św. Teresy od Dzieciątka Jezus 8

### Zakres badania wstępnego

Ogólne badanie lekarskie ze zwróceniem uwagi na skórę.

Badania pomocnicze: AST, ALT, GGTP.

### Zakres badania okresowego

Ogólne badanie lekarskie ze zwróceniem uwagi na skórę.

Badania pomocnicze: AST, ALT, GGTP.

Częstotliwość badań okresowych: co 2 – 4 lata.

### U w a g a

Lekarz przeprowadzający badanie profilaktyczne może poszerzyć jego zakres o dodatkowe specjalistyczne badania lekarskie oraz badania pomocnicze, a także wyznaczyć krótszy termin następnego badania, jeżeli stwierdzi, że jest to niezbędne do prawidłowej oceny stanu zdrowia osoby przyjmowanej do pracy lub pracownika.

### Narządy (układy) krytyczne

Narządem (układem) krytycznym podczas pracy w narażeniu na 2,6-di-*tert*-butylo-4-metylofenol jest wątroba.

### Przeciwwskazania lekarskie do zatrudnienia

Przeciwwskazaniami do zatrudnienia w narażeniu na 2,6-di-*tert*-butylo-4-metylofenol są:

- choroby przebiegające ze znacznym upośledzeniem funkcji wątroby,
- ciąża.

### U w a g a

Wymienione przeciwwskazania dotyczą kandydatów do pracy. O przeciwwskazaniach w przebiegu zatrudnienia powinien decydować lekarz sprawujący opiekę profilaktyczną, biorąc pod uwagę wielkość i okres trwania narażenia zawodowego oraz ocenę stopnia zaawansowania i dynamikę zmian chorobowych.