

反相高效液相色谱测定对硝基甲苯及其代谢产物

殷芬于鸣* 陈楚良

(上海医科大学公共卫生学院)

在染料、橡胶和炸药等生产过程中, 排放出大量含硝基甲苯的废水, 影响了人们的饮水卫生与健康(1)。

对硝基甲苯对生物体的毒害及作用机制已进行了研究(2-4), 但主要是测定尿或胆汁中的代谢物, 血中测定方法目前尚未报道。本文提出用反相高效液相色谱法同时测定血浆中对硝基甲苯及代谢产物的浓度, 为进一步研究其体内动力学过程提供了必要手段。

实验部分

(一) 仪器: 美国Waters公司液相色谱仪, 510型泵, M490紫外检测器, 840型色谱处理机和U6K型进样阀。

(二) 试剂: 对硝基甲苯(PNT)和硝基苯甲酸(NBA)均为上海试剂一厂生产, 化学纯; 乙酰氨基苯甲酸(AABA), 美国Sigma公司, 纯度>99%; 对硝基尿酸(NHA), 美国Aldrich公司, 纯度>98%; 邻甲苯酚(内标)及甲醇为分析纯; 乙腈为色谱纯。

(三) 样品处理: 取待测血浆0.2ml, 加入20 μ l(0.5mg/ml)内标液及0.2ml乙腈, 于旋涡振荡器上振荡1分钟, 随后以15000rpm高速离心8分钟, 取5 μ l上清液进样测定。

(四) 色谱条件: Waters μ -Bondapak C₁₈ 色谱柱(柱长30cm, 内径3.9mm)配以Waters Guard-pakC₁₈ 保护柱。流动相由0.0025mol/L醋酸钠缓冲液-甲醇(50:50)组成, 流速为1ml/min。用M490紫外检测器的Ma:plot功能, 波长设置为265, 272, 280nm。

实验结果及讨论

(一) 血浆样品的色谱分离 兔血浆样品按前述方法提取及进样, 色谱分离结果见图1, 2。对硝基甲苯在实验条件下未能检出, 可能因为肝脏的首过效应所致, 其初级代谢物NBA的快速生成也反映出PNT代谢快速的特点。

(二) 分析方法的评价 1. 标准曲线: 以样品和内标峰面积之比值和标准液浓度作线性回归分析, 所得参数见表1。2. 灵敏度: 各化合物的血浆

表1 兔血浆样品提取后的标准曲线范围、回归方程及相关系数

化合物名称	线性范围(μ g/0.2ml血浆)	相关系数(r)	回归方程($y=a+bx$)
NHA	0.4~12	0.9999	$y = -0.0239 + 2.6078x$
AABA	0.4~40	0.9958	$y = -0.0707 + 1.1311x$
NBA	0.4~60	0.9998	$y = -0.0617 \pm 2.2196x$
PNT	0.4~40	0.9999	$y = 0.1403 + 2.1389x$

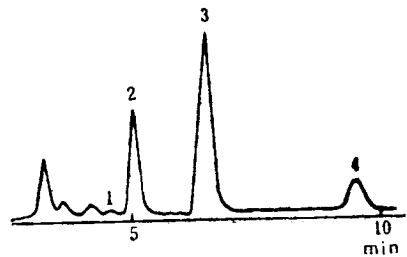
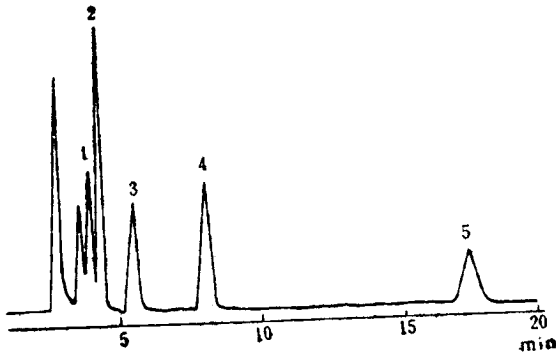


图2 兔子口服对硝基甲苯后血浆提取液色谱图
 色谱峰: 1.NHA, 2. AABA, 3. NBA, 4. 内标。
 <图1 兔血浆外加混合标准提取液色谱图
 色谱峰: 1. NHA, 2. AABA, 3. NBA, 4. 内标, 5. PNT。

* 上海医科大学环境卫生学博士研究生。

最低检测浓度均为20ng/0.2ml。3. 回收率：方法回收率均在95~110%范围内(见表2)。4. 重现性：表2所列天内和天间变异系数(CV)大多小于5%。分析药物在体内的血浓度时间变化，能更好地

表2 血浆样品的方法回收率(%)及精密度(%)

化合物名称	回收率(n=5)			天内变异系数(n=5)			天间变异系数(n=3)		
	4	12	40	4	12	40	4	12	40
NHA	106.5	107.3	104.7	3.45	1.13	4.47	3.44	1.03	—
AABA	100.2	105.3	101.6	2.06	1.91	3.22	2.63	1.46	1.33
NBA	97.7	103.0	101.0	1.80	2.91	4.29	1.76	2.03	5.55
PNT	101.7	103.2	103.2	4.41	3.56	2.94	6.27	3.77	3.21

反映药物的代谢动力学过程,本法可同时测定PNT及其代谢物。方法中采用乙腈沉淀蛋白质后取上清液直接进样的分析步骤,简化了样品处理过程。精密度及准确度都较理想。缺点是灵敏度相对较低。

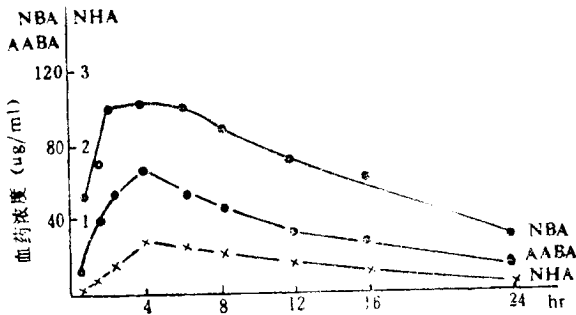


图3 经口给予新西兰兔对硝基甲苯后,血中各代谢物浓度-时间曲线

采用本方法研究了PNT在兔子、大鼠和小鼠体内的代谢动力学过程,取得了令人满意的结果(见图3)。

参 考 文 献

(1) 段宏等, 环境与健康, 2(4), 12(1985).
 (2) D. E. Rikert et al., Chem. Biol. Interactions, 52, 131(1984).
 (3) J. P. Chism et al., Drug Metabolism and Disposition, 12, 5.6 (1984).
 (4) J. P. Chism et al., Drug Metabolism and Disposition, 13, 651 (1985).
 (收稿日期: 1987年6月20日)

Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatographic Determination of p-Nitrotoluene and Its Metabolites in Plasma Yin Fen, Yu Ming and Chen Chuliang, Shanghai Medical University.
 A reversed-phase high performance liquid chromatographic method for the simultaneous measurement of p-nitrotoluene [and its metabolites in plasma using o-methylphenols as the internal standard is presented. Samples were deproteinized with acetonitrile and chromatographed on a μ -Bondapak C₁₈ column with Waters M490 UV Maxplot function for detection. The mobile phase consists of acetic acid buffer and methanol (50:50). The coefficients of variation of the day-to-day assays did not exceed 3.44% for NHA, 4.33% for AABA, 5.35% for NBA, and 6.27% for p-NT. The limit of detection was 20ng/0.2ml plasma. The assay is rapid, accurate and reproducible.

鸭肝中黄曲霉毒素M₁的快速提取及反相高效液相色谱测定

钱耕菽 徐洪兴
 (上海市肿瘤研究所)

黄曲霉毒素B(AFTB)对鸭子具有强烈的致癌作用。动物摄入污染AFTB的饲料后肝脏中就存在AFTB及其代谢物AFTM(1,2)。目前常用测定肝脏中AFT的方法均较繁杂,耗时多,耗费溶剂及样品量大。本文介绍采用二根C₁₈提取小柱(以

下简称C₁₈小柱)提取及净化鸭肝中AFTM的方法,该方法经反相高效液相色谱测定证明,是一种简单、快速、有效的提取法。样品中加入1-5ppb AFTM的平均回收率为73.86-95.28%。AFTM的检出限为0.2ppb。