

一种新的分离三硝基甲苯及其代谢产物的高效液相色谱方法

姚 明

(中国预防医学科学院劳动卫生与职业病研究所 北京 100050)

1 前言

三硝基甲苯(TNT)是一种常用的炸药,职业接触会导致肝损伤及白内障。为了搞清其中毒机制,需对其在体内外的代谢转化进行研究。TNT通过体内代谢还原生成4-氨基-2,6-二硝基甲苯(4A)、2-氨基-4,6-二硝基甲苯(2A)、2,4-二氨基-6-硝基甲苯(2,4-DA)、2,6-二氨基-4-硝基甲苯(2,6-DA)、4-羟氨基-2,6-二硝基甲苯(4HA)。有人提出TNT还可通过甲基的氧化而生成2,4,6-三硝基甲苯甲酸(2,4,6-TNBA),但至今还未被证实。由于有两对异构体,色谱分离十分困难。Kaplan^[1],Yinon^[2]以及作者^[3]分别建立了八种、四种及五种TNT代谢产物的高效液相色谱(HPLC)方法。但主要代谢产物4A和2A都未能达到基线分离。由于在用放射性同位素标记(¹⁴C)TNT进行体内外代谢的研究时,需对馏出组分进行收集。主要代谢产物4A和2A的基线分离将有助于这方面的研究以及进行准确定量。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪 Varian5000 型配可变波长紫外检测器。DS600 型数据工作站。

2,6-DA 购自 Sigma 公司,2,4-DA,2A,4A 以及 4HA 由本所合成室合成。TNT 购自北京坨里化工厂。2,4,6-TNBA 由美国 Merck 公司研究实验部合成。色谱流动相组分均为优级纯。

2.2 色谱条件

色谱柱 1: Supelcosil C₁₈柱(33×4.6mm i. d., 3 μm); 色谱柱 2: Supelcosil CN 柱(250×4.6mm i. d., 5 μm)。将柱 1 和柱 2 依次连接。流动相为甲醇:四氢呋喃:水=35:5:60,流速为 1.0mL/min。柱温为室温。紫外检测器波长为 230nm。100 μL 定量进样环进样。

3 结果与讨论

由初步实验可知,2A 和 4A 在流动相为甲醇:水=48:52 时,可在 CN 柱上部分分离。作者尝试采用一根 C₁₈(3 μm)柱串连在 CN 柱之前,2A 和 4A 可达到基线分离。但此时 TNT 与 4HA 的分离较差。按照 Mayer^[4]提出的优化流动相组成的方法,采用甲醇-四氢呋喃-水为流动相,根据计算三者比例应为 25:15:60,此时多数代谢物的分离大大改善,但 TNT 与 4HA 的分离较差,而且柱压很高,达到 2758kPa。将三者之间的比例改变为 35:5:60 时,柱压降低到 2068kPa 左右,而且除 2,6-DA 和 2,4-DA 之间的分离度为 1.0 外,其它代谢产物之间均大于 2.1,即可达到基线分离,见表 1 和图 1。从而解决了主要代谢产物 4A,2A 以及 4HA 的分离。

表 1 TNT 及其代谢产物的保留时间和分离度

代谢物	保留时间 (min)	峰底宽 (min)	分离度
2,4,6-TNBA	2.07	0.4	
2,6-DA	6.91	0.4	12.1
2,4-DA	7.33	0.45	1.0
TNT	15.35	1	11.1
4HA	17.67	1	2.3
4A	20.33	1.1	2.5
2A	22.81	1.3	2.1

该方法已成功用于 TNT 血红蛋白(Hb)加合物的研究^[5]。 [¹⁴C]TNT-Hb 加合物的水解释出物,经 HPLC 分离并收集馏分,测其放射性,根据每管的放射性绘出放射性色谱图。结果表明,加合物中仅有 4A 和 2A,二者的比例为 6.5:1。该方法还可用于 TNT 的生物监测以及其代谢机理等方面的研究。

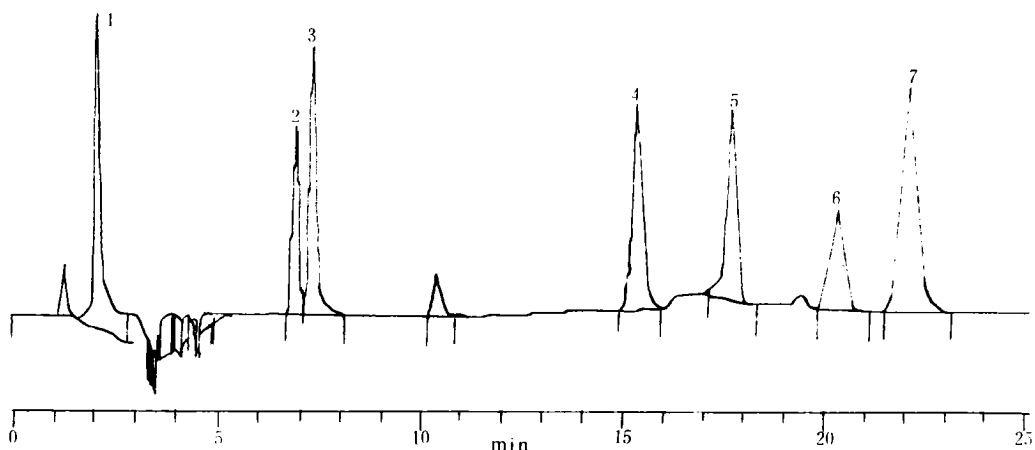


图 1 TNT 及 6 种代谢产物的液相色谱图

1. 2,4,6-TNBA(2.07), 2. 2,6-DA(6.91), 3. 2,4-DA(7.33), 4. TNT(15.35), 5. 4HA(17.67), 6. 4A(20.33), 7. 2A(22.81)。

关键词 高效液相色谱, 三硝基甲苯, 代谢物

123

参考文献

- 1 Kaplan D L, Kaplan A M. Anal Chim Acta, 1982; 136:425
- 2 Yinon J, Hwang D-G. Biomed Chromatogr, 1986;1:

- 3 姚 明, 线引林. 卫生研究, 1989;18(4):7
- 4 Mayer V. Practical high performance liquid chromatography. New York: Wiley, 1988:211
- 5 姚 明, 梁钧衡. 卫生研究, 1994;23(1):1

A New Method for Separation of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) and Its Metabolites by High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Yao Ming

(Institute of Occupational Medicine, CAPM, Beijing, 100050)

An HPLC method is described for separation of TNT and its main reduction metabolites. Two columns (LC-C₁₈ and LC-CN) are connected in series and operated isocratically at 1.0 mL/min with water-methanol-tetrahydrofuran (60+35+5). The baseline separation of 4-amino-2,6-dinitrotoluene (4A) and 2-amino-4,6-dinitrotoluene (2A), which are main metabolites of TNT, is obtained ($R_s = 2.1$). All the TNT and its metabolites, including TNT, 2,6-diamino-4-nitrotoluene (2,6-DA), 2,4-diamino-6-nitrotoluene (2,4-DA), 4-hydroxylamino-2,6-dinitrotoluene (4HA), 4A and 2A, can be separated from each other with this method.

Key words high performance liquid chromatography, trinitrotoluene (or TNT), metabolites