

XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG TRINITROTOLUEN TRONG MÁU TRÊN HỆ THỐNG SẮC KÍ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

HOÀNG TH LAN ANH, NGUYỄN PHÚC THÁI và CS.
Viện Vệ sinh phòng dịch quân sự

TÓM TẮT

Phương pháp định lượng TNT trong máu người trực tiếp nghiên cứu và qua nghiên cứu này, chúng tôi đã xây dựng quy trình định lượng TNT trong máu trên hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) như sau:

- X lý mẫu như sau:
 - + B ng acid Sulfuric v i t l th tích m u/acid là 5/6
 - + Chi t TNT t m u máu b ng Dietylete, th i khô, hoà tan c n b ng MeOH.
- Xây d ng ng chu n trên n n m u máu. M u chu n c x lý theo qui trình nh i v i m u th c
- i u ki n ch y s c kí:
 - + Detector PDA, b c sóng 230nm
 - + Pha ng: MeOH: ACN: H₂O=35:35:30 (%v/v)
 - + T c dòng 1ml/phút

Phương pháp đã xây dựng, chúng tôi đã định lượng hàm lượng TNT trong 32 mẫu máu công nhân tiếp xúc trực tiếp với thuốc phát hiện 19 mẫu có TNT trong máu (chiếm 59,37%) và 67 mẫu máu công nhân tiếp xúc gián tiếp với thuốc phát hiện 13 mẫu có TNT trong máu (chiếm 19,40%).

SUMMARY

Establishing the procedure for determination of trinitrotoluene in blood by high performance liquid chromatography.

Military Institute of Hygiene and Epidemiology.

And this experimental study was carried out to establish procedure for determination of Trinitrotoluen (TNT) in blood by high performance liquid chromatography (HPLC). The results were as follows:

* The extraction procedure for TNT in blood:

- Transfer 0,5ml of blood to a tube, add 0.6ml Sulfuric acid and mix the mixture.

- Then transfer this mixture to an extract funnel and extraction by Diethyl ether. Recover diethyl ether phase and take to dryness. Dissolve in 1ml Methanol.

* Establishing calibration curve in blood: The standard samples were treated similar real sample.

* Then analyse the samples by HPLC with condition as:

- Detector PDA, $\lambda = 230\text{nm}$.
- Mobile phase: Methanol: Acetonitrile: distilled water = 35: 35: 30 (%v/v)
- Flow rate: 1ml/min.

This method was used to determination of TNT in 32 blood samples of direct contact with explosive worker, detection 19 samples has TNT (scale 59.37%). When we analyse 67 blood samples of

indirect contact with explosive worker, we detected 13 samples has TNT (scale 19.40%). Thus, this method can use to determination of TNT in blood.

T V N

Trinitrotoluen (TNT) là hợp chất độc hại nghiêm trọng sản xuất từ dầu mỏ giá thành rẻ và an toàn cao trong bộ quân và vận chuyển [6]. Nhu cầu sử dụng thuốc nổ ngày càng tăng cùng với lòng tin ngày càng tăng của nhân dân khi TNT xâm nhập vào các thị trường hoá thành các chất chuyển hoá khác của TNT và gây tổn thương nghiêm trọng cho cơ thể, như hình ảnh của các kho mìn có tiếp xúc với chất nổ [1,2,4,5].

Hiện nay, Viện Vệ sinh phòng dịch quân sự đang công bố định lượng TNT trong máu, mà mục đích để làm cơ sở cho định lượng TNT trong nước tiểu bằng phương pháp so màu, nên ảnh hưởng của các nhân tố sinh học thâm nhiễm và nhiễm c TNT nghiêm trọng. Trong khi đó các phòng thí nghiệm trên thế giới, TNT trong không khí, trong nước, trong máu, nước tiểu hay trong mô ảnh hưởng của các phương pháp hiện tại khác nhau: GC, HPLC, GC-MS, LC-MS,....[7,8,].

Chính vì vậy, chúng tôi đã nghiên cứu xây dựng quy trình định lượng TNT trong máu người trực tiếp nghiên cứu trên hệ thống HPLC. Chúng tôi đã chọn cách xử lý mẫu (dùng axit sulfuric), dung môi chiết mẫu (b ng dietylete), pha ng, b c sóng cho phân tích TNT, và khảo sát các yếu tố ảnh hưởng khi xây dựng quy trình (r= 0,9998) khi pha trực tiếp TNT trong Metanol[3]. Nghiên cứu định lượng quy trình đã xây dựng để định lượng TNT trong máu người có tiếp xúc với chất nổ chúng tôi thấy có một số bất cập như: cách kh c ph c hi u su t chi t nh th nào? và trên s c kí có nhi u pic ph gây nhi u pic chính TNT,...

Thực tế đó chúng tôi đã tiếp tục nghiên cứu xây dựng hoàn thiện phương pháp định lượng TNT trong máu công nhân tiếp xúc với chất nổ bằng phương pháp HPLC, góp phần chọn lựa nhân tố thâm nhiễm, nhiễm c TNT nghiêm trọng.

V T LI U VÀ PH NG PHÁP NGHIÊN C U

1. V t li u nghiên c u:

- Hệ thống HPLC – Waters bao gồm cột C18 (150 x 4,6mm, 5µm), Detector PDA, áp suất cao 4 kênh,...
- Bình chiết 50ml và các dụng cụ thu tinh y
- Hoá chất: Metanol, Acetonitril dùng cho HPLC, Axit Sulfuric m c (PA), Dietylete PA, TNT chu n.
- Mẫu máu người không có TNT do Viện 108 cung c p.

2. Ph ng pháp nghiên c u

- Phương pháp khảo sát hiu suất chi t m u khi xây d ng ng chu n trong Metanol.
- Phương pháp xây d ng ng chu n TNT trong máu.
- Phương pháp x lý m u: Kh o sát t l axit và m u máu.
- Ảnh giá qui trình xây d ng c trên m u máu ng i có ti p xúc v i ch t n .

K T Q U VÀ BÀN LU N

1. Ảnh giá h s chi t c a ph ng pháp xây d ng ng chu n trong Metanol

B ng 1. H s chi t TNT.

| TT | N ng TNT lý thuy t (ppm) | S m u (n) | N ng TNT th c (ppm) $\bar{X} \pm SD$ | Hi u su t (%) |
|----|--------------------------|-----------|--------------------------------------|---------------|
| 1 | 0,25 | 03 | 0,221 ± 3,87 | 88,50 ± 4,67 |
| 2 | 0,5 | 07 | 0,415 ± 1,56 | 83,08 ± 1,88 |
| 3 | 1,50 | 05 | 1,158 ± 0,50 | 77,22 ± 0,97 |
| 4 | 4,62 | 05 | 3,810 ± 1,13 | 82,43 ± 1,31 |
| 5 | 10,00 | 05 | 9,356 ± 2,05 | 93,56 ± 2,35 |

Qua b ng 1 th y r ng, hi u su t chi t t t 77% n 94% cho các n ng , hàm l ng TNT trong máu càng cao thì hi u su t thu h i càng l n.

Theo b ng 1, sai chu n (SD) gi a các l n chi t là nh (t 0,971 n 4,670), hi u su t chi t TNT qua các l n là khá n nh.

Nh v y, n u s d ng ng chu n v i các m u TNT pha tr c ti p trong metanol thì s ph i tính n h s chi t tránh gây sai s , kh c ph c h s chi t chúng tôi ã ti n hành xây d ng ng chu n v i các m u TNT pha trong máu và c ng c x lý theo qui trình nh v i x lý m u th c.

2. Xây d ng ng chu n trong máu

B ng 2. H s tuyen tính khi xây d ng ng chu n TNT trong máu

| TT | Kho ng n ng | n | H s r |
|----|-------------|---|-------|
| | | | |

3. Kh o sát t l axit Sulfuric và m u máu khi dùng ng chu n trong máu

B ng 3. N ng TNT trong m u máu v i th tích acid khác nhau.

| TT | Th tích m u (ml) | Th tích H ₂ SO ₄ (ml) | S m u (n) | Màu d ch chi t | Th i gian l u (phút) | D ng píc | | | |
|----|------------------|---|-----------|----------------|----------------------|----------|-------|---------|-------|
| | | | | | | p | | Không p | |
| | | | | | | SL | % | SL | % |
| 1 | 0,5 | 0,5 | 18 | Trong | 3,010 ± 0,06 | 14 | 77,78 | 4 | 22,22 |
| 2 | 0,5 | 0,6 | 20 | Trong | 2,996 ± 0,03 | 17 | 85,0 | 3 | 15,0 |
| 3 | 0,5 | 0,7 | 10 | Trong | 3,007 ± 0,05 | 7 | 70,0 | 3 | 30,0 |
| | 0,5 | 1,0 | 05 | | | | | | |

(píc p: khi chân píc g n, không b choãi, píc không b gủ)

V i th tích acid Sulfuric thêm vào các m u thí nghi m (0,5ml m u) l n l t là 0,5ml; 0,6ml; 0,7ml; 1,0ml, l c u, th y r ng v i th tích axit Sulfuric thêm vào là 1ml thì m u b vón c c, c s t l i. Nh v y chúng tôi s lo i b kh n ng x lý m u (0,5ml

| | (ppm) | | |
|---|-----------------------|----|-----------------|
| 1 | T 20ppm n 100ppm | 04 | 0,9986 ± 0,0051 |
| 2 | T 10ppm n 40ppm | 01 | 0,9995 |
| 4 | T 5ppm n 25ppm | 04 | 0,9981 ± 1,5860 |
| 5 | T 0,5ppm n | 02 | 0,9994 |
| 6 | 2,0ppm | | 0,9967 |
| 7 | T 0,25ppm n 1,5ppm | 05 | 0,9981 ± 0,0156 |

Khi xây d ng ng chu n trong máu ng v t th c nghi m, chúng tôi ã kh o sát h s t ng quan r cho m i t ng quan gi a di n tích píc và n ng , gi a chi u cao píc và n ng th y m i t ng quan gi a il ng n ng và di n tích píc liên quan ch t ch v i nhau h n so v i il ng n ng và chi u cao píc ($r_1=0,75$ so v i $r_2=0,7$)[3]. Vì v y, khi xây d ng ng chu n TNT trong máu, chúng tôi s d ng m i t ng quan gi a n ng và di n tích píc.

ng chu n c a TNT do ph n m m c a máy xây d ng và tính toán h s r. Qua b ng 2, th y r ng h s tuyen tính c a ng chu n u l n h n 0,9980 áp ng c h s tuyen tính trong phép xây d ng ng chu n (h s tuyen tính l n h n 0,9950).

H s tuyen tính c a ng chu n khi xây d ng trên n n m u th c (r n m trong kho ng t 0,9981 n 0,9994) th ph n so v i h s tuyen tính khi xây d ng t các n ng TNT pha tr c ti p trong Metanol (r n m trong kho ng t 0,9997 n 0,9999), nh ng v i h s này v n áp ng c yêu c u trong phép xây d ng ng chu n. V i vi c s d ng ng chu n trong máu, chúng tôi s lo i b c h s chi t.

Vì v y, khi xây d ng ng chu n cho các m u phân tích chúng tôi s dùng ng chu n c xây d ng trong máu.

m u máu) b ng 1ml acid Sulfuric m c.

V i th tích axit sulfuric thêm vào m u máu (0,5ml m u máu) l n l t là 0,5ml; 0,6ml; 0,7ml, l c u h n h p m u, yên qua êm. Sau ó chi t TNT t m u ã x lý v i acid Sulfuric b ng Dietylete. Thu c dung d ch ch a TNT, cho bay h i h t Dietylete, hoà tan c n thu c b ng 1ml Metanol, em ch y s c k

trên hệ thống HPLC.

Qua bảng 3, thấy rằng với thể tích axit sulfuric thêm vào là 0,5ml; 0,6ml và 0,7ml thì số lượng pic TNT là gần tương đương nhau (tổng nồng độ là 77,78%; 85%; và 70%), vì vậy chúng tôi lựa chọn phương pháp thêm 0,7ml axit sulfuric để tiến hành phân tích. Mặt khác, khi quan sát trên sắc ký thu được mẫu khi xử lý với 0,5ml axit sulfuric, thì thấy có các pic phụ gây nhiễu nên số vị sắc ký của mẫu khi xử lý với 0,6ml axit sulfuric. Như vậy với thể tích mẫu là 0,5ml thì thêm 0,6ml acid Sulfuric là tối ưu nhất cho phương pháp xử lý.

Vì vậy, chúng tôi lựa chọn phương pháp xử lý mẫu bằng acid Sulfuric với tỉ lệ mẫu/axit là 5/6 với thể tích.

4. Kỹ thuật phân tích mẫu máu người tiếp xúc với chất nổ theo quy trình và xây dựng cơ.

Tất cả các điều kiện đã khảo sát, chúng tôi tiến hành phân tích mẫu máu của người tiếp xúc trực tiếp và tiếp xúc gián tiếp với chất nổ. Kỹ thuật của phương pháp như sau:

Bảng 4. Mẫu máu người tiếp xúc trực tiếp với thuốc nổ

| STT | Số mẫu phân tích | Khoảng nồng độ TNT (ppm) | Số mẫu tìm thấy TNT | Nồng độ TNT trung bình (ppm) | Tỉ lệ (%) |
|------|--|--------------------------|---------------------|------------------------------|-----------|
| 1 | Mẫu máu người tiếp xúc trực tiếp với chất nổ | | | | |
| | 32 | 0,100 – 1,5 | 10 | 0,463 | |
| | | 1,500 – 5,000 | 07 | 2,64 | |
| | | > 10,000 | 02 | 11,915 | |
| Tổng | 32 | | 19 | | 59,37 |
| 2 | Mẫu máu người tiếp xúc gián tiếp với chất nổ | | | | |
| | 67 | 0,001 - 0,500 | 08 | 0,201 | |
| | | 0,500 – 1,500 | 05 | 1,32 | |
| Tổng | 67 | 13 | | | 19,40 |

Qua bảng 4, với 32 mẫu máu người có tiếp xúc với chất nổ phát hiện 19 mẫu có TNT (chiếm 59,37%) với nồng độ trung bình là 0,130ppm, các biệt trong 32 mẫu có 02 mẫu máu công nhân trực tiếp sản xuất chất nổ thì thấy nồng độ TNT trong máu lớn hơn 10,000ppm.

Chúng tôi cũng nhận thấy 67 mẫu máu người tiếp xúc gián tiếp với TNT, phát hiện 13 mẫu có TNT (chiếm 19,40%). Nồng độ TNT thấp nhất phát hiện là 0,006ppm với người tiếp xúc gián tiếp với chất nổ.

Như vậy, với quy trình đã xây dựng, chúng tôi đã nhận thấy nồng độ TNT trong máu người có tiếp xúc trực tiếp và gián tiếp với thuốc nổ, và thấy rằng kết quả các mẫu tìm thấy TNT và nồng độ TNT trong các mẫu máu của người tiếp xúc trực tiếp lớn hơn với mức của người tiếp xúc gián tiếp. Vì vậy kỹ thuật này

góp phần vào việc chẩn đoán sớm thâm nhiễm, nhiễm độc của người tiếp xúc với TNT.

KẾT LUẬN

Qua các mẫu nghiên cứu, chúng tôi đã xây dựng quy trình phân tích TNT trong máu trên hệ thống HPLC với cột C18, 150 x 4,6mm, 5µm, như sau:

- Chi tiết uth c:

+ Lấy 0,5ml máu vào ống nghiệm, thêm 0,6ml acid sulfuric để chuyển màu. Chuyển vào bình chiết, thêm 10ml Diethyl ete, lắc đều, yên tĩnh để tách lớp hoàn toàn, gạn lấy Diethyl ete vào ống nghiệm sạch. Chiết lại lần 2 với 8ml Diethyl ete. Thu toàn bộ dịch chiết Diethyl ete chứa TNT trong 2 lần chiết vào ống nghiệm sạch.

+ Cho bay hơi khô dung dịch Diethyl ete chứa TNT, thu được cặn chứa TNT.

+ Hoà tan cặn thu được bằng 1ml Metanol, lắc qua màng lọc 0,45µm vào ống nghiệm sạch để phân tích trên hệ thống HPLC.

- Xây dựng quy trình chuẩn trên nồng độ mẫu: Các mẫu chuẩn sẽ xử lý theo quy trình tương tự như mẫu thực nghiệm.

- Chọn số vị sắc ký mẫu và xử lý trên hệ thống HPLC với điều kiện sau:

+ Pha loãng: Acetonitril – Metanol – Nước cất với tỉ lệ 35 – 35 – 30 (%v/v).

+ Detector: PDA, với $\lambda = 230\text{nm}$.

+ Tốc độ dòng: 1ml/phút

Quy trình và xây dựng cơ, chúng tôi đã nhận thấy nồng độ TNT trong máu người có tiếp xúc với chất nổ trên hệ thống HPLC, góp phần chẩn đoán sớm thâm nhiễm và nhiễm độc TNT người tiếp xúc.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Nguyễn Lưu
"Nghiên cứu tác hại của chất nổ TNT đối với người tiếp xúc với chất nổ trong thời gian dài", Luận án Phó tiến sĩ Y học, 1996.
- Lê Trung
"Bệnh nhiễm độc TNT (Trinitrotoluen)", 16 bệnh độc hại, Viện Y học Lao động và Vệ sinh môi trường, 1994: 210 – 216.
- Hoàng Thị Lan Anh, Nguyễn Phúc Thái và CS
"Xây dựng quy trình nhận định trinitrotoluen trong mẫu nước thải thực nghiệm trên hệ thống sắc ký lỏng hiệu suất cao", báo cáo khoa học toàn văn hội nghị Y học Lao động và Vệ sinh môi trường toàn quốc, 04/2007: 207 – 212.
- B.S.Levin et al., "Six month oral toxicity study of TNT in beagle dogs", Toxicology – Amsterdam 1990 – Vol.63, No.2: 233 – 244.
- Channon. H.J.
"The metabolism of 2,4,6 – Trinitrotoluene", Bio – chem.J., 1944:38-70.
- Charles. C. et al.
"Trinitrotoluen, Poisoning: Toxicology – symptom – Treatment", Thomas publisher, 1986: 206
- Yion.J, Hwang.D.G,
"High-performance liquid chromatography – mass

spectrometry of metabolites of 2,4,6 – Trinitrotoluen”.
Journal of Chromatography, 339 (1995): 127 – 137.
8. “TNT, RDX, HMX and 2,4-DNT in waste water

and Groundwater”, AOAC official, Method 986.22,
Liquid chromatography, first 1986.