

ОПРЕДЕЛЕНИЕ N-МЕТИЛ-N,2,4,6-ТЕТРАНИТРОАНИЛИНА И ЕГО МЕТАБОЛИТОВ МЕТОДОМ ТСХ

В.К. Шорманов¹, Н.Г. Погосян¹, В.А. Омельченко²

¹ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет»

²Экспертно-криминалистический центр ГУ МВД России по Краснодарскому краю

Поступила в редакцию 01.04.2024 г.

Аннотация. Рассматриваемые в представленной работе N-метил-N,2,4,6-тетранитроанилин и его метаболиты – токсические соединения (ксенобиотики), способные вызывать патологические изменения в организме, определяющие симптоматику острых и хронических отравлений. Иногда вследствие острых отравлений N-метил-N,2,4,6-тетранитроанилином может наступать летальный исход.

Изучена возможность определения N-метил-N,2,4,6-тетранитроанилина и его основных метаболитов (2,4,6-тринитрофенола, 2-амино-4,6-динитрофенола и N-метил-2,4,6-тринитроанилина) методом нормально-фазовой тонкослойной хроматографии на пластинках Sorbfil ПТСХ-АФ-А-УФ при индивидуальном или совместном присутствии аналитов.

В работе при хроматографировании использовались одно-, двух-, а также трехкомпонентные подвижные фазы. Компонентами этих элюентов выступали: этилацетат, ацетон, пропанол-2, дихлорметан, тетрачлорметан, бензол, диэтиловый эфир, диоксан, гексан и толуол. При исследовании нами использовался вариант хроматографирования восходящим способом, искомые вещества детектировались под действием УФ-света и при наличии УФ-индикатора, введенного в сорбент.

Разделение рассматриваемых веществ обеспечивают подвижные фазы: бензол-ацетон (3:7); гексан-тетрахлорметан-диоксан (1:1:1) и гексан-диоксан-пропанол-2 (7,5:5:1). Наиболее оптимальной из них для химико-токсикологического анализа является система бензол-ацетон (3:7). При использовании этой подвижной фазы пятна рассматриваемых соединений равномерно распределяются по хроматограмме. При этом, самое сорбируемое вещество располагается заметно выше линии старта ($R_f = 0,4$), что позволяет обеспечивать очистку всей группы аналитов от эндогенных соединений биоматрицы.

Для подвижных фаз, обеспечивающих разделение аналитов, рассчитаны основные параметры хроматографической подвижности: абсолютный и относительный показатели хроматографической подвижности веществ (R_f и R_s), индекс полярности подвижной фазы, условное удерживание соединения, коэффициент емкости, число теоретических тарелок, высота, эквивалентная одной теоретической тарелке, степень разделения веществ.

Установлено, что хроматографическая подвижность N-метил-N,2,4,6-тетранитроанилина и его метаболитов, в целом, увеличивается в ряду 2-амино-4,6-динитрофенол < 2,4,6-тринитрофенол < N-метил-N,2,4,6-тетранитроанилин < N-метил-2,4,6-тринитроанилин. В некоторых случаях 2-амино-4,6-динитрофенол оказывался более хроматографически подвижным, чем 2,4,6-тринитрофенол.

Предложена методика предварительного определения данной группы веществ методом ТСХ при исследовании биологического материала, пригодная для целей химико-токсикологического анализа.

Ключевые слова: N-метил-N,2,4,6-тетранитроанилин, метаболиты N-метил-N,2,4,6-тетранитроанилина, ТСХ, определение, химико-токсикологический анализ.

N-метил-N,2,4,6-тетранитроанилин применяется в качестве взрывчатого вещества (для изготовления промежуточных детонаторов в различных боеприпасах и для их снаряжения) [1]. Некоторые из его метаболитов – 2-амино-4,6-динитрофенол и 2,4,6-тринитрофенол – используются самостоятельно как красители (например, в

красках для волос) [2] и лабораторные реактивы для синтеза [3] и химического анализа [4, 5].

N-метил-N,2,4,6-тетранитроанилин в токсических дозах может вызывать вялость, пилоэрекцию, потерю массы тела, тахипноэ, катаlepsию и другие эффекты [6, 7]. У отравленных данным соединением отмечается пожелтение кожи и волос, одышка, сужение дыхательных путей, химический гепатит и другие симптомы [8]. Потенциальная опасность

N-метил-N,2,4,6-тетранитроанилина стимулировала разработку биологически индифферентной формы путем абсорбции соединения на поверхности октаэдрических наноструктур $B_{12}N_{12}$ [9].

Нитроароматические соединения (в т.ч. некоторые рассматриваемые вещества) вызывают «окислительный стресс» [10], связанный с образованием нитрозо- и/или гидроксиламинопроизводных свободных радикалов [11]. По аналогичному механизму и с участием фермента DT-диафоразы происходит метаболизм N-метил-N,2,4,6-тетранитроанилина с образованием N-метил-2,4,6-тринитроанилина (N-денитрованного продукта) [12]. При окислении N-метил-N,2,4,6-тетранитроанилина в живых организмах образуется 2,4,6-тринитрофенол, который затем частично восстанавливается в 2-амино-4,6-динитрофенол. N-метил-2,4,6-тринитроанилин, 2,4,6-тринитрофенол и 2-амино-4,6-динитрофенол можно обнаружить в крови, моче и органах отравившихся N-метил-N,2,4,6-тетранитроанилином [13]. В трупном материале, находящемся в состоянии гнилостного разложения, N-метил-N,2,4,6-тетранитроанилин трансформируется в N-метил-2,4,6-тринитроанилин за счёт отщепления нитрогруппы от азота.

Установлено, что остатки не полностью седонировавшего вещества могут просачиваться через почву в грунтовые воды и, распространяясь по ближайшей местности, оказывать воздействие на людей [14].

Отмечается, что 2,4,6-тринитрофенол способен вызывать летальный исход вследствие ацидоза [15]. Также приводятся данные о развитии гемолитической анемии и значительном увеличении размеров печени и селезенки при ежедневном введении 100 мг этого вещества на 1 кг массы тела подопытного животного [15].

При вышеописанной опасности N-метил-N,2,4,6-тетранитроанилина, на данный момент недостаточно изучены способы его определения в целях химико-токсикологического анализа. Существуют исследования по разделению этого соединения с близкими по структуре веществами при помощи ТСХ [16, 17, 18]. Однако в них не учитываются основные метаболиты, которые имеют значение для судебно-химической экспертизы.

Целью этого исследования явилось изучение хроматографического поведения N-метил-N,2,4,6-тетранитроанилина и его метаболитов в тонком слое нормально-фазового сорбента, а также разработка методики для их определения в биоматериале методом ТСХ.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Объекты исследования: N-метил-N,2,4,6-тетранитроанилин (N-M-N,2,4,6-ТНА), стандарт Agilent ISO 17034 с содержанием вещества $\geq 99\%$; 2,4,6-тринитрофенол (2,4,6-ТНФ), ч., ТУ 6-09-08-317-80; 2-амино-4,6-динитрофенол (2-А-4,6-ДНФ), ч., ТУ 6-09-10-1269-77; N-метил-2,4,6-тринитроанилин (N-M-2,4,6-ТНА), РСО с содержанием вещества $\geq 98\%$. Структурные формулы данных веществ представлены на рис. 1.

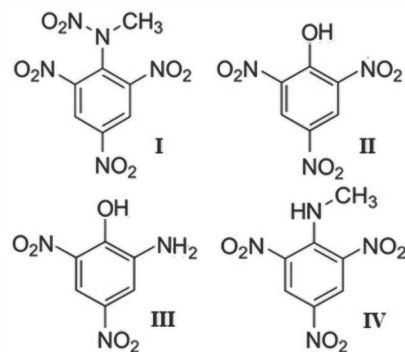


Рис. 1. Структурные формулы N-метил-N,2,4,6-тетранитроанилина (I); 2,4,6-тринитрофенола (II); 2-амино-4,6-динитрофенола (III); N-метил-2,4,6-тринитроанилина (IV)

Исследование проводилось методом нормально-фазовой тонкослойной хроматографии (ТСХ) с использованием пластинок Sorbfil ПТСХ-АФ-А-УФ 10×10 см (сорбент СТХ-1А).

Готовили 0,02% растворы стандартных образцов N-M-N,2,4,6-ТНА и его метаболитов в этаноле. На линии старта ТСХ-пластин наносили по 5-7 мкл этих растворов. Хроматографировали в стеклянных камерах объемом 700 см³, предварительно насыщенных парами подвижной фазы. Элюирование проводили восходящим способом.

Использовали одно-, двух- и трехкомпонентные подвижные фазы. В числе однокомпонентных применялись следующие растворители: этилацетат, диэтиловый эфир, тетрахлорметан, дихлорметан, гексан, толуол, бензол, диоксан и ацетон. Двухкомпонентные системы представлены смесью бензол-ацетон в соотношениях 2:8, 3:7, 5:5 и 7:3. А в качестве трехкомпонентных подвижных фаз рассматривались смеси состава гексан-тетрахлорметан-диоксан (в соотношениях 1:2:2; 4:2:2; 4:4:2; 1:1:1 и 5:4:4) и гексан-диоксан-пропанол-2 (в соотношениях 5:5:1; 7,5:5:1; 10:5:1; 15:5:1 и 20:5:1).

Вещества детектировали по флуоресценции пятна под УФ-облучением (254 нм). Проводили измерения пробега каждого вещества и пробега

фронта подвижной фазы. По полученным данным рассчитывали величины абсолютного (R_f) и относительного (R_s) показателей хроматографической подвижности. Значение R_s устанавливали по отношению к N-M-N,2,4,6-ТНА. Для оптимальных систем дополнительно рассчитывали индекс полярности (P') [19]. Также для них рассчитывали параметры хроматографирования по формулам, приведенным в аналогичном исследовании [21]. Измерение проводили в миллиметрах.

В таблицах 2 и 3 использовали следующие условные обозначения: B – условное удерживание; k' – коэффициент емкости; N – число теоретических тарелок; H – высота, эквивалентная 1 теоретической тарелке; i_{mex} – степень разделения двух веществ на хроматограмме [20, 21].

Для определения возможности анализа N-M-N,2,4,6-ТНА и его метаболитов в биологических матрицах использовали изолирующий агент (смесь ацетон-ацетонитрил (1:1)), который обеспечивал высокую степень извлечения рассматриваемых веществ. Исследование проводили на модельных смесях с измельченной тканью трупной печени, так как при летальных отравлениях исследование печени является обязательным для химико-токсикологического анализа.

Методика определения N-M-N,2,4,6-ТНА и его метаболитов в биоматериале (ткани печени): ткань печени (25 г) измельчали до частиц размером не более 5 мм и смешивали с 2,5 мг одного из рассматриваемых веществ. Параллельно проводили исследование модельных смесей, содержащих по 2,5 мг каждого вещества (N-M-N,2,4,6-ТНА, 2,4,6-ТНФ, 2-А-4,6-ДНФ и N-M-2,4,6-ТНА). Это позволило оценить методику для случаев, при которых вещества в исследуемом материале присутствуют индивидуально или совместно.

Для извлечения N-M-N,2,4,6-ТНА и его метаболитов, каждую модельную смесь 30 минут настаивали с системой ацетон-ацетонитрил (1:1) объемом 50 мл. После этого извлечения сливали, а к остаткам приливали вторые порции изолирующего агента и повторно настаивали по 30 минут. В дальнейшем оба экстракта объединяли и центрифугировали при 5000 оборотах в минуту (10 минут).

Жидкую фракцию (центрифугат) помещали в выпарительную чашку и упаривали досуха в вытяжном шкафу при температуре около 20°C. Сухой остаток растворяли в 10 мл ацетонитрила, а затем 50 мкл полученного раствора наносили на линию старта ТСХ-пластинки в виде полосы

3×0,6 см. Отдельно наносили пятна веществ-свидетелей в форме круглых пятен диаметром $\approx 0,3$ см. Далее хроматографировали в камере с выбранной подвижной фазой. Затем пластинку, после завершения процесса элюирования, высушивали в вытяжном шкафу при температуре около 20 °C и проводили детектирование пятен аналитов под воздействием УФ-света. По результатам эксперимента рассчитывали параметры хроматографирования N-M-N,2,4,6-ТНА и его метаболитов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Данные, полученные в процессе изучения особенностей хроматографической активности N-метил-N,2,4,6-тетранитроанилина и его основных метаболитов в тонком слое сорбента по показателям абсолютной и относительной хроматографической подвижности приведены в табл. 1. Согласно полученной совокупности данных, хроматографическая подвижность, в целом, увеличивается в ряду 2-А-4,6-ДНФ < 2,4,6-ТНФ < N-M-N,2,4,6-ТНА < N-M-2,4,6-ТНА.

Меньшая по сравнению с другими аналитами хроматографическая подвижность 2,4,6-ТНФ и 2-А-4,6-ДНФ может быть связана с наличием у них фенольной гидроксильной группы, электроноакцепторных радикалов (нитрогрупп) в положениях 4 и 6 и первичной аминогруппы у 2-А-4,6-ДНФ в положении 2. Такие структурные особенности определяют активное взаимодействие соединения с поверхностью силикагеля (сорбента), приводящее к преимущественному образованию водородных связей.

У молекул N-M-N,2,4,6-ТНА и N-M-2,4,6-ТНА нет фенольной ОН-группы, что заметно снижает их удерживание сорбентом и определяет заметно более высокую подвижность в тонком слое сорбента по сравнению с 2,4,6-ТНФ и 2-А-4,6-ДНФ. Отсутствие в структуре N-M-N,2,4,6-ТНА нитрогруппы у атома азота в положении 1 объясняет её меньшее удерживание силанольными группами силикагеля по сравнению с N-M-N,2,4,6-ТНА.

Из числа рассматриваемых подвижных фаз оптимальными оказались следующие двух- и трехкомпонентные системы: бензол–ацетон (3:7) ($P'=4,38$); гексан-диоксан-пропанол-2 (7,5:5:1) ($P'=2,11$) и гексан-тетрахлорметан-диоксан (1:1:1) ($P'=2,17$). Для этих систем были проведены расчеты семи параметров хроматографирования. Результаты представлены в табл. 2.

Согласно полученным результатам, все системы (и бензол-ацетон (3:7), и гексан-диоксан-пропанол-2 (7,5:5:1), и гексан-тетрахлорметан-диоксан

Таблица 1
Значения R_f и R_s стандартных образцов N-метил-N,2,4,6-тетранитроанилина (N-M-N,2,4,6-ТНА) и его метаболитов

Подвижная фаза (с указанием соотношений компонентов по объему)		2-А-4,6-ДНФ		2,4,6-ТНФ		N-M-N,2,4,6-ТНА		N-M-2,4,6-ТНА	
		R_f	R_s	R_f	R_s	R_f	R_s	R_f	R_s
Ацетон	1	0,80	0,88	0,90	0,99	0,91	1,00	0,99	1,08
Диэтиловый эфир	1	0,02	0,02	0,04	0,04	0,93	1,00	0,93	1,00
Этилацетат	1	0,13	0,15	0,68	0,76	0,89	1,00	0,97	1,09
Дихлорметан	1	0,03	0,04	0,01	0,01	0,75	1,00	0,90	1,20
Гексан	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	1,00	0,01	0,50
Бензол	1	0,02	0,04	0,00	0,00	0,49	1,00	0,61	1,23
Толуол	1	0,01	0,02	0,01	0,01	0,49	1,00	0,56	1,13
Тетрахлорметан	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	1,00	0,00	0,00
Диоксан	1	0,86	0,95	0,73	0,80	0,90	1,00	0,11	0,13
Гексан-тетрахлорметан-диоксан	1:2:2	0,56	0,79	0,04	0,05	0,71	1,00	0,77	1,09
	4:2:2	0,33	0,76	0,02	0,04	0,43	1,00	0,54	1,26
	4:4:2	0,21	0,59	0,01	0,03	0,36	1,00	0,48	1,31
	1:1:1	0,51	0,75	0,02	0,04	0,68	1,00	0,74	1,10
	5:4:4	0,43	0,82	0,02	0,03	0,52	1,00	0,62	1,18
Гексан-Диоксан-пропанол-2	5:5:1	0,76	0,86	0,43	0,49	0,88	1,00	0,89	1,01
	7,5:5:1	0,66	0,90	0,13	0,18	0,73	1,00	0,79	1,07
	10:5:1	0,46	0,83	0,05	0,10	0,55	1,00	0,63	1,13
	15:5:1	0,35	0,80	0,02	0,05	0,44	1,00	0,51	1,15
	20:5:1	0,18	0,72	0,02	0,07	0,26	1,00	0,34	1,33
Бензол-ацетон	2:8	0,55	0,61	0,85	0,93	0,90	1,00	0,99	1,09
	3:7	0,40	0,45	0,79	0,89	0,89	1,00	0,96	1,09
	5:5	0,14	0,16	0,52	0,60	0,87	1,00	0,88	1,01
	7:3	0,05	0,06	0,11	0,13	0,86	1,00	0,86	1,00

Таблица 2
Параметры хроматографирования N-метил-N,2,4,6-тетранитроанилина (N-M-N,2,4,6-ТНА) и его метаболитов при использовании оптимальных подвижных фаз

Вещество	R_f	R_s	B	k'	N	H , мм	$i_{мск}$
Гексан-диоксан-пропанол-2 (7,5:5:1) ($P'=2,11$)							
2,4,6-ТНФ	0,13	0,18	7,64	6,64	54	1,562	8,09 1,50 1,29
2-А-4,6-ДНФ	0,66	0,90	1,51	0,51	1971	0,043	
N-M-N,2,4,6-ТНА	0,73	1,00	1,37	0,37	6725	0,012	
N-M-2,4,6-ТНА	0,79	1,07	1,27	0,27	4356	0,019	
Гексан-тетрахлорметан-диоксан (1:1:1) ($P'=2,17$)							
2,4,6-ТНФ	0,02	0,04	42,00	41,00	4	21,000	11,57 4,14 1,22
2-А-4,6-ДНФ	0,51	0,75	1,98	0,98	3211	0,026	
N-M-N,2,4,6-ТНА	0,68	1,00	1,47	0,47	3249	0,026	
N-M-2,4,6-ТНА	0,74	1,10	1,34	0,34	2500	0,034	
Бензол-ацетон (3:7) ($P'=4,38$)							
2-А-4,6-ДНФ	0,40	0,45	2,51	1,51	367	0,229	5,91 2,43 1,86
2,4,6-ТНФ	0,79	0,89	1,27	0,27	4356	0,019	
N-M-N,2,4,6-ТНА	0,89	1,00	1,13	0,13	9867	0,009	
N-M-2,4,6-ТНА	0,96	1,09	1,04	0,04	6561	0,013	

(1:1:1)) позволяют добиться полного разделения пятен на хроматограммах, соответствующих N-M-N,2,4,6-ТНА и его метаболитам ($i_{\text{мск}} > 1$).

Ввиду специфики химико-токсикологического анализа, большая часть объектов исследования являются биологическими матрицами. По этой причине для дальнейших исследований была выбрана система бензол-ацетон (3:7). При использовании этой подвижной фазы пятна рассматриваемых соединений равномерно распределяются

по хроматограмме. При этом, самое сорбируемое вещество располагается значительно выше линии старта ($R_f = 0,4$), что позволяет очистить исследуемое извлечение от посторонних (в большей степени белковых) соединений, абсолютная хроматографическая активность большинства из которых составляет не более 0,2.

Далее, в соответствии с предложенной схемой, были получены результаты хроматографического определения N-M-N,2,4,6-ТНА и его метаболитов в

Таблица 3

Результаты хроматографирования N-метил-N,2,4,6-тетранитроанилина (N-M-N,2,4,6-ТНА) и его метаболитов, извлеченных из модельных смесей, при использовании подвижной фазы бензол-ацетон (3:7) ($P'=4,38$)

Вещество	R_f	R_s	B	k'	N	H , мм	$i_{\text{мех}}$
Исследование модельных смесей, содержащих индивидуальное вещество							
2-А-4,6-ДНФ	0,41	0,46	2,44	1,44	387	0,217	-
2,4,6-ТНФ	0,79	0,89	1,27	0,27	4356	0,019	-
N-M-N,2,4,6-ТНА	0,89	1,00	1,13	0,13	9867	0,009	-
N-M-2,4,6-ТНА	0,96	1,09	1,04	0,04	6561	0,013	-
Исследование модельных смесей, содержащих сумму веществ							
2-А-4,6-ДНФ	0,41	0,47	2,44	1,44	387	0,217	5,80 2,29 2,00
2,4,6-ТНФ	0,79	0,91	1,27	0,27	4404	0,019	
N-M-N,2,4,6-ТНА	0,88	1,00	1,14	0,14	9735	0,009	
N-M-2,4,6-ТНА	0,95	1,09	1,05	0,05	6368	0,013	

биологической матрице (модельных смесях измельченной ткани печени с рассматриваемыми соединениями). Эти результаты представлены в табл. 3.

Данные, составляющие табл. 3, показывают, что характеристики хроматографической активности аналитов, перешедших в извлечения из биоматриц (табл. 3), в значительной степени совпадают с параметрами хроматографирования стандартных образцов этих веществ (табл. 2). Во всех представленных случаях наблюдается полное разделение N-M-N,2,4,6-ТНА и его метаболитов ($i_{\text{мех}} > 1$), а значит подвижная фаза бензол-ацетон (3:7) может быть рекомендована для исследования извлечений из плотных биоматриц (модель – ткань печени). При этом определение в предлагаемых условиях одинаково эффективно как при содержании веществ в индивидуальном виде, так и при их совместном присутствии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследован характер хроматографической активности N-метил-N,2,4,6-тетранитроанилина и трёх его метаболитов в условиях применения метода нормально-фазовой тонкослойной хроматографии (сорбент СТХ-1А). Установлено, что для целей химико-токсикологического анализа наиболее оптимальным является хроматографирование с использованием подвижной фазы бензол-ацетон (3:7), при использовании которой достигается полное разделение рассматриваемых веществ. На основе полученных результатов предложена методика предварительного определения изучаемых веществ в биологических матрицах при проведении исследований химико-токсикологического характера.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ляшенко В.Н. Общая характеристика взрывчатых веществ / В.Н. Ляшенко, М.К. Бичахчан // Актуальные вопросы совершенствования специальной подготовки курсантов и слушателей

образовательных учреждений системы МВД России: материалы всероссийской научно-практической конференции; под общей редакцией Д.В. Карабаша. – Краснодар: Краснодарский университет МВД России, 2014. – С. 143-151.

2. IMAP Group Assessment Report Picramic acid and sodium picramate: Human health tier II assessment. Режим доступа: https://www.industrialchemicals.gov.au/sites/default/files/Picramic%20acid%20and%20sodium%20picramate_Human%20health%20tier%20II%20assessment.pdf (дата обращения 11.11.2023).

3. Керемов А.Ф. Азометины на основе пикриновой кислоты и замещенных бензальдегидов / А.Ф. Керемов // Вестник Дагестанского государственного университета. Серия 1: Естественные науки. – 2017. – №4. – С. 84-90.

4. Шишмарева Т.М. Применение пикриновой кислоты для количественного анализа хамазулена в цветках *Matricaria chamomilla* / Т.М. Шишмарева // Химия растительного сырья. – 2016. – №3. – С. 95-101.

5. Звягин А.А. Метод фотокolorиметрического определения углеводов в растительном сырье с помощью пикриновой кислоты / А.А. Звягин, Е.В. Андросова, А.С. Ураева // Технологии и товароведение сельскохозяйственной продукции. – 2019. – № 1. – С. 178-181.

6. Adams V.H. Chapter 10 - Wildlife Toxicity Assessment for N-Methyl-N-2,4,6-Tetranitroaniline (Tetryl) / V.H. Adams // Wildlife Toxicity Assessments for Chemicals of Military Concern. – 2015. – P. 205-216.

7. Fitzgerald G.B. Acute toxicity evaluation of nitroaromatic compounds / G.B. Fitzgerald, F. Austin, N. DiGuilio // Toxikon Corp., Woburn, WA, USA. – 1991. – Vol. 199. – 70 p.

8. Alfaraj W.A. Tetryl exposure: forgotten hazards of antique munitions / W.A. Alfaraj, B. McMillan, A.M. Ducatman, C.L. Werntz III // Annals

of Occupational and Environmental Medicine. – 2016. – Vol. 28. – Article number 20.

9. Jalali Sarvestani M.R. Adsorption of Tetryl on the Surface of B12N12: A Comprehensive DFT Study / M.R. Jalali Sarvestani, R. Ahmadi // Chemical Methodologies. – 2020. – Vol. 4. – P. 40-54.

10. Kovacic P. Nitroaromatic compounds: Environmental toxicity, carcinogenicity, mutagenicity, therapy and mechanism / P. Kovacic, R. Somanathan // Journal of Applied Toxicology. – 2014. – Vol. 34. – № 8. – P. 810-824.

11. Penning T.M. Nitroreduction: A critical metabolic pathway for drugs, environmental pollutants, and explosives / T.M. Penning, A.L. Su, K. El-Bayoumy // Chemical Res Toxicol. – 2022. – Vol. 35. – № 10. – P. 1747-1765.

12. Anusevicius Z. DT-diaphorase catalyzes N-denitration and redox cycling of tetryl / Z. Anusevicius, J. Sarlauskas, H. Nivinskas, J. Segura-Aguilar, N. Cenas // FEBS Letters. – 1998. – Vol. 436. – №2. – P. 144-148.

13. Myers S.R. Metabolism, tissue distribution, and pharmacokinetics of N-methyl-N-2,4,6-tetranitroaniline (tetryl) / S.R. Myers, J.A. Spinnato // Environ Toxicol Pharmacol. – 2007. – Vol. 24. – No. 3. – P. 206-211.

14. Kayser E.G. Migration of explosives in soil: analysis of rdx, tnt, and tetryl from a 14c lysimeter study / E.G. Kayser, N.E. Burlinson // Journal of Energetic Materials. – 1988. – Vol. 6. – № 1-2. – P. 45-71.

15. Hebert R.M. Chapter 15 - Wildlife toxicity assessment for picric acid (2,4,6-trinitrophenol) / R.M. Hebert, A.M. Jackovitz // Wildlife toxicity assessments for chemicals of military concern. –

2015. – P. 271-277.

16. Yasuda S.K. Separation and identification of tetryl and related compounds by two-dimensional thin-layer chromatography / S. K. Yasuda // Journal of Chromatography A. – 1970. – Vol. 50. – P. 453-457.

17. Satcher J.H. Portable Thin Layer Chromatography (TLC) for Field Detection of Explosives / J.H. Satcher, J.L. Maienschein, P.F. Pagoria, A. Racoveanu, M.L. Carman, R.E. Whipple // Chemical, Biological, Radiological, Nuclear, and Explosives (CBRNE) Sensing XIII. – 2012. – Vol. 8358. – P. 251-260.

18. Pietrangelo J.C. Detection of seven explosive standards using high-performance thin layer chromatography (HPTLC): A thesis for the degree of Master of Science / Julia C. Pietrangelo; Cedar Crest College. – Allentown, 2022. – 331p.

19. Отто М. Современные методы аналитической химии. В 2-х томах. Том 1-2 / М. Отто – М.: Техносфера, 2003. – 684 с.

20. Сумина Е.Г. Тонкослойная хроматография. Теоретические основы и практическое применение / Е.Г. Сумина, С.Н. Штыков, В.З. Углова, Н.В. Кулакова – Саратов: Издательство Саратовского государственного университета, 2012. – 128 с.

21. Шорманов В.К. Определение моногидроксиаренов методом ТСХ / В.К. Шорманов, А.П. Асташкина, О.В. Тарасова, Ю.А. Сухомлинов, О.И. Пугачёва, Л.О. Орехова // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2017. – Т. 17. – № 4. – С. 648-656.

Курский государственный медицинский университет

Шорманов Владимир Камбулатович, доктор фармацевтических наук, профессор кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии

E-mail: r-wladimir@yandex.ru

**Погосян Норайр Гургенович, аспирант кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии*

E-mail: nullal@ya.ru

ГУ МВД России по Краснодарскому краю

Омельченко Владимир Александрович, кандидат фармацевтических наук, начальник экспертно-криминалистического центра

E-mail: eku_adis@krn.mvd.ru

Kursk State Medical University

Shormanov Vladimir K. PhD., DSci., Full Professor, Department of Pharmaceutical, Toxicological and Analytical Chemistry

E-mail: r-wladimir@yandex.ru

Pogosyan Norayr G, postgraduate student, Department of Pharmaceutical, Toxicological and Analytical Chemistry

E-mail: nullal@ya.ru

Ministry of Internal Affairs of Russia for the Krasnodar

Omelchenko Vladimir A., PhD., Forensic Expert Center of the Main Directorate of the Territory, Krasnodar

E-mail: eku_adis@krn.mvd.ru

DETERMINATION OF N-METHYL-N,2,4,6-TETRANITROANILINE AND ITS METABOLITES BY TLC

V.K. Shormanov¹, N.G. Pogosyan¹, V.A. Omelchenko²

¹Kursk State Medical University

²Forensic Expert Center of the Main Directorate of the Ministry of Internal Affairs of Russia for the Krasnodar Territory

Abstract. N-methyl-N,2,4,6-tetranitroaniline and its metabolites considered in this work are toxic compounds (xenobiotics) that can cause pathological changes in the body that determine the symptoms of acute and chronic poisoning. Sometimes, due to acute poisoning with N-methyl-N,2,4,6-tetranitroaniline, death can occur.

The possibility of determining N-methyl-N,2,4,6-tetranitroaniline and its main metabolites (2,4,6-trinitrophenol, 2-amino-4,6-dinitrophenol and N-methyl-2,4,6-trinitroaniline) was studied by normal-phase thin-layer chromatography on Sorbfil plates (TLC-A-UV on aluminum sheets) in the individual or joint presence of analytes.

In the chromatography work, one-, two-, and three-component mobile phases were used. The components of these eluents were: ethyl acetate, acetone, 2-propanol, dichloromethane, carbon tetrachloride, benzene, diethyl ether, dioxane, hexane and toluene. In our study, we used a variant of ascending chromatography; the sought substances were detected under the UV light and in the presence of a UV indicator introduced into the sorbent.

The separation of the substances under consideration is ensured by the following mobile phases: benzene-acetone (3:7); hexane-carbon tetrachloride-dioxane (1:1:1) and hexane-dioxane-propanol-2 (7.5:5:1). The most optimal of them for chemical-toxicological analysis is the benzene-acetone system (3:7). When using this mobile phase, the spots of the compounds in question are evenly distributed throughout the chromatogram. At the same time, the most sorbed substance is located noticeably above the starting line ($R_f = 0,4$), which makes it possible to ensure the purification of the entire group of analytes from endogenous compounds of the biomatrix.

For mobile phases providing separation of analytes, the main parameters of chromatographic mobility were calculated: absolute and relative indicators of chromatographic mobility of substances (R_f and R_s), polarity index of the mobile phase, conditional retention of the compound, capacity coefficient, number of theoretical plates, height equivalent to one theoretical plate, degree of separation of substances.

It has been established that the chromatographic mobility of N-methyl-N,2,4,6-tetranitroaniline and its metabolites, in general, increases in the series 2-amino-4,6-dinitrophenol < 2,4,6-trinitrophenol < N-methyl N,2,4,6-tetranitroaniline < N-methyl-2,4,6-trinitroaniline. In some cases, 2-amino-4,6-dinitrophenol was found to be more chromatographically mobile than 2,4,6-trinitrophenol.

A technique has been proposed for the preliminary determination of this group of substances by TLC in the study of biological material, suitable for the purposes of chemical and toxicological analysis.

Keywords: N-methyl-N,2,4,6-tetranitroaniline, metabolites of N-methyl-N,2,4,6-tetranitroaniline, TLC, determination, chemical toxicological analysis.

REFERENCES

1. Lyashenko V.N. Obshchaya kharakteristika vzryvchatykh veshchestv / V.N. Lyashenko, M.K. Bichakhchyan // Aktual'nye voprosy sovershenstvovaniya spetsial'noi podgotovki kursantov i slushatelei obrazovatel'nykh uchrezhdenii sistemy MVD Rossii: materialy vserossiiskoi nauchno-prakticheskoi konferentsii; pod obshchei redaktsiei D.V. Karabasha. – Krasnodar: Krasnodarskii universitet MVD Rossii, 2014. – P. 143-151.
2. IMAP Group Assessment Report Picramic acid and sodium picramate: Human health tier II assessment. Available at: https://www.industrialchemicals.gov.au/sites/default/files/Picramic%20acid%20and%20sodium%20picramate_Human%20health%20tier%20II%20assessment.pdf (accessed 11 November 2023).
3. Keremov A.F. Azomethins on the basis of picramic acid and the replaced benzole aldehyde / A.F. Keremov // Vestnik Dagestanskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya 1: Estestvennye nauki. – 2017. – №4. – P. 84-90.
4. Shishmareva T.M. Primenenie pikrinovoi kisloty dlya kolichestvennogo analiza khamazulena v

tsvetkakh *Matricaria chamomilla* / T.M. Shishmareva // Chemistry of plant raw material. – 2016. – №3. – P. 95-101.

5. Zvyagin A.A. Metod fotokolorimetriceskogo opredeleniya uglevodov v rastitel'nom syr'e s pomoshch'yu pikrinovoi kisloty / A.A. Zvyagin, E.V. Androsova, A.S. Uraeva // Tekhnologii i tovarovedenie sel'skokhozyaistvennoi produktsii. – 2019. – № 1. – P. 178-181.

6. Adams V.H. Chapter 10 - Wildlife Toxicity Assessment for N-Methyl-N-2,4,6-Tetranitroaniline (Tetryl) / V.H. Adams // Wildlife Toxicity Assessments for Chemicals of Military Concern. – 2015. – P. 205-216.

7. Fitzgerald G.B. Acute toxicity evaluation of nitroaromatic compounds / G.B. Fitzgerald, F. Austin, N. DiGuilio // Toxikon Corp., Woburn, WA, USA. – 1991. – Vol. 199. – 70 p.

8. Alfaraj W.A. Tetryl exposure: forgotten hazards of antique munitions / W.A. Alfaraj, B. McMillan, A.M. Ducatman, C.L. Werntz III // Annals of Occupational and Environmental Medicine. – 2016. – Vol. 28. – Article number 20.

9. Jalali Sarvestani M.R. Adsorption of Tetryl on the Surface of B12N12: A Comprehensive DFT Study / M.R. Jalali Sarvestani, R. Ahmadi // Chemical Methodologies. – 2020. – Vol. 4. – P. 40-54.

10. Kovacic P. Nitroaromatic compounds: Environmental toxicity, carcinogenicity, mutagenicity, therapy and mechanism / P. Kovacic, R. Somanathan // Journal of Applied Toxicology. – 2014. – Vol. 34. – № 8. – P. 810-824.

11. Penning T.M. Nitroreduction: A critical metabolic pathway for drugs, environmental pollutants, and explosives / T.M. Penning, A.L. Su, K. El-Bayoumy // Chemical Res Toxicol. – 2022. – Vol. 35. – № 10. – P. 1747-1765.

12. Anusevicius Z. DT-diaphorase catalyzes N-denitration and redox cycling of tetryl / Z. Anusevicius, J. Sarlauskas, H. Nivinskas, J. Segura-Aguilar, N. Cenas // FEBS Letters. – 1998. – Vol. 436. – №2. – P. 144-148.

13. Myers S.R. Metabolism, tissue distribution, and pharmacokinetics of N-methyl-N-2,4,6-tetranitroaniline (tetryl) / S.R. Myers, J.A. Spinnato //

Environ Toxicol Pharmacol. – 2007. – Vol. 24. – No. 3. – P. 206-211.

14. Kayser E.G. Migration of explosives in soil: analysis of rdx, tnt, and tetryl from a 14c lysimeter study / E.G. Kayser, N.E. Burlinson // Journal of Energetic Materials. – 1988. – Vol. 6. – № 1-2. – P. 45-71.

15. Hebert R.M. Chapter 15 - Wildlife toxicity assessment for picric acid (2,4,6-trinitrophenol) / R.M. Hebert, A.M. Jackovitz // Wildlife toxicity assessments for chemicals of military concern. – 2015. – P. 271-277.

16. Yasuda S.K. Separation and identification of tetryl and related compounds by two-dimensional thin-layer chromatography / S. K. Yasuda // Journal of Chromatography A. – 1970. – Vol. 50. – P. 453-457.

17. Satcher J.H. Portable Thin Layer Chromatography (TLC) for Field Detection of Explosives / J.H. Satcher, J.L. Maienschein, P.F. Pagoria, A. Racoveanu, M.L. Carman, R.E. Whipple // Chemical, Biological, Radiological, Nuclear, and Explosives (CBRNE) Sensing XIII. – 2012. – Vol. 8358. – P. 251-260.

18. Pietrangelo J.C. Detection of seven explosive standards using high-performance thin layer chromatography (HPTLC): A thesis for the degree of Master of Science / Julia C. Pietrangelo; Cedar Crest College. – Allentown, 2022. – 331 p.

19. Otto M. Sovremennye metody analiticheskoi khimii. V 2-kh tomakh. Tom 1-2 / M. Otto – M.: Tekhnosfera, 2003. – 684 p.

20. Sumina E.G. Tonkosloinaya khromatografiya. Teoreticheskie osnovy i prakticheskoe primenenie / E.G. Sumina, S.N. Shtykov, V.Z. Uglova, N.V. Kulakova – Saratov: Izdatel'stvo Saratovskogo gosudarstvennogo universiteta, 2012. – 128 p.

21. Shormanov V.K. Identification monohydroxylated in biological material using the method normalizovat TLC / V.K. Shormanov, A.P. Astashkina, O.V. Tarasova, Yu.A. Sukhomlinov, O.I. Pugacheva, L.O. Orekhova // Sorption and Chromatographic Processes. – 2017. – T. 17. – № 4. – P. 648-656.