

尿中2-硫代噻唑烷-4-羧酸的高效液相色谱法

WS / T 40-1996

1 原理 尿样经盐酸酸化后,用乙醚萃取2-硫代噻唑烷-4-羧酸(TTCA),浓缩后进液相色谱仪,于273nm波长处测定。以保留时间定性,峰高定量。

2 仪器

2.1 具盖聚乙烯塑料瓶, 500ml。

2.2 尿比重计。

2.3 具塞试管, 10ml。

2.4 液体快速混匀器。

2.5 电热恒温水浴。

2.6 微量注射器, 20 μ l。

2.7 移液管, 1ml, 5ml。

2.8 容量瓶, 100ml。

2.9 高效液相色谱仪, 具紫外检测器, 波长为273nm。仪器操作条件: 色谱柱; 反相C₁₈ 柱温: 室温; 流动相流速: 1.5ml/min。

3 试剂 实验用水为蒸馏水。

3.1 甲醇, 优级纯或分析纯试剂经重蒸馏后使用。

3.2 无水乙醚, 使用新的试剂, 否则临用前须经中性氧化铅柱除去过氧化物。

3.3 盐酸溶液, 2mol/L。

3.4 流动相: 甲醇+水+冰乙酸=14.5+84.5+1。

3.5 TTCA标准溶液: 准确称取40.0mgTTCA, 于100ml容量瓶中, 用水稀释至刻度。此溶液为400 μ g/ml TTCA标准贮备液。再用水稀释10倍, 浓度为40 μ g/ml TTCA标准溶液。置于4℃冰箱可保存2周。

4 样品的采集、运输和保存 用具盖聚乙烯塑料瓶采集班末尿, 尽快测定比重后, 于常温下运输。置于-8℃冰箱中可保存1周。

5 分析步骤

5.1 样品处理: 取1.0ml经离心后的尿样置于具塞试管中, 再加入0.1ml盐酸溶液及5ml乙醚, 于液体快速混匀器上混合2min。于3000r/min离心10min后, 将乙醚溶液全量转移至另一具塞试管中, 置于40℃水浴上吹氮至干。加入200 μ l甲醇溶解残渣。供测定。

5.2 标准曲线的绘制: 取6支具塞试管, 分别加入0、0.10、0.20、0.30、0.40、0.50ml标准溶液, 加水至0.50ml, 制备成0.0、4.0、8.0、12.0、16.0、20.0 μ g或0.0、0.16、0.32、0.48、0.64、0.80 μ g/20 μ l TTCA标准系列。参照仪器操作条件, 将高效液相色谱仪调节至最佳测定条件; 取标准管中溶液各20 μ l, 进样测定。以TTCA浓度(μ g/20 μ l)对相应的峰高绘制标准曲线。

5.4 样品测定: 用测定标准系列的操作条件, 测定样品溶液。由标准曲线得TTCA的浓度(μ g/20 μ l)。

6 计算 按下式计算尿中TTCA的浓度:

$$C=10 \times c \times k$$

式中: C——尿中TTCA的浓度, mg / L; c——由标准曲线得TTCA浓度, μ g/20 μ l; 10——1ml尿样处理得200 μ l待测液, 进样20 μ l测定的换算系数; k——尿样换算成标准比重下的浓度校正系数。

7 说明

7.1 本法的最低检测浓度为 $20\mu\text{g}/\text{L}$ (按取 1ml 尿样计);测定范围为 $0\sim 40\text{mg}/\text{L}$;相对标准偏差为 $0.52\%\sim 3.3\%$ (TTCA含量为 $0\sim 800\text{ng}$, $n=12$);现场样品加标回收率为 $78.0\%\sim 91.0\%$ (TTCA本底浓度为 $1.73\sim 2.84\text{mg}/\text{L}$,加标浓度为 $2\sim 16\text{mg}/\text{L}$, $n=2$)。

7.2 本法将离心的尿样经乙醚提取后再次离心,使乙醚层便于分离、转移,从而保证了分析的准确度。由于本法将国外方法的梯度洗脱条件改为等度洗脱,在色谱仪只有一个泵的情况下亦可使用,便于在国内推广。也可采用两种流动相切换洗脱(A液:甲醇+冰乙酸+水= $0.5+95+4.5$;B液:甲醇+冰乙酸+水= $95+0.5+4.5$)。洗脱顺序: $0\sim 3.5\text{min}$, A洗脱; $3.5\sim 6.5\text{min}$, B洗脱; $6.5\sim 10\text{min}$, A洗脱。切换洗脱可使尿中杂质较快流出,同时亦适于单泵操作。

7.3 色谱柱亦可采用径向加压柱Radial-PAK C_{18} ,分离效果良好。

7.4 TTCA制备方法:取碳酸钾 1.12g (8mmol)溶解在 6ml 水中,加入 0.96g (4mmol)L-胱氨酸,温热至全溶。冷却至室温后,加 1.2ml (16mmol)二硫化碳,室温($22\sim 25^\circ\text{C}$)下强烈搅拌 24h 。用硅胶G薄层控制反应终点。反应完全后,用盐酸酸化至 $\text{pH}=1$ 。以 100ml 乙醚分3次提取反应物。合并乙醚提取液,以 3ml 10% 盐酸溶液洗涤。分出乙醚层,用无水硫酸镁干燥。干燥后的乙醚提取液,在 40°C 左右回收乙醚,真空下蒸干,得到淡黄色松散的TTCA粉末 0.74g ,为粗品。此粗品用 6ml $1+1$ 盐酸溶液加热溶解,用少许活性炭脱色,趁热过滤。滤液冷却后,析出TTCA无色针状结晶,约 0.5g , mp $180^\circ\text{C}\sim 181^\circ\text{C}$ 。回收率为 76.6% 。

7.5 本法由中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所线引林和李晓立等同志研制。