

中华人民共和国卫生行业标准

尿中对氨基酚的高效液相色谱测定方法

WS/T 56—1996

Urine—Determination of p-aminophenol—High performance liquid chromatographic method

1 主题内容与适用范围

本标准规定了尿中对氨基酚(PAP)的高效液相色谱测定方法。本法最低检测浓度为 0.5 mg/L。本标准适用于接触苯胺的工人尿中对氨基酚的测定。

2 原理

尿样加盐酸加热水解后,酸性下用乙酸乙酯萃取,除去部分干扰物,然后在中性溶液中,用乙酸乙酯萃取尿样中对氨基酚,反相 C₁₈柱分离,在 254 nm 波长下测定。以保留时间定性,峰高定量。

3 仪器

- 3.1 高效液相色谱仪,紫外检测器。
- 3.2 恒温水浴。
- 3.3 全玻璃磨口蒸馏器,2 L。
- 3.4 微量注射器,10 μ L。
- 3.5 容量瓶,100mL。
- 3.6 具塞刻度试管,25 mL。
- 3.7 玻璃瓶,200~500 mL。
- 3.8 尿比重计。

4 试剂

本标准所用试剂,除另有说明者外,均为分析纯级试剂。

- 4.1 实验用水,为去离子水或经全玻璃蒸馏器重蒸馏的水。
- 4.2 盐酸,优级纯, $\rho_{20}=1.19$ g/mL。
- 4.3 磷酸氢二钾。
- 4.4 甲醇,重蒸的。
- 4.5 乙酸乙酯。
- 4.6 对氨基酚,升华精制,避光保存。
- 4.7 对氨基酚标准溶液:准确称取 8.0 mg 精制对氨基酚(4.6),加水溶解并加入 4 滴盐酸(4.2),加水稀释至 100 mL。此溶液 1 mL 相当于 80 μ g 对氨基酚。
- 4.8 质控样:用加标的模拟尿、接触者混合尿或加标的正常人混合尿作质控样。

5 采样、运输和保存

使用硬质玻璃瓶,收集接触苯胺工人的班末或班后 2 h 内的尿。尽快测定比重后,按 100 mL 尿样 4~5 滴的比例加入盐酸(4.2),4℃下可保存 4 天。

6 分析步骤

6.1 仪器操作条件

色谱柱:柱长 25 cm,内径 4.6 mm,不锈钢柱。

柱填料:反相 C₁₈键合固定相,5 μm。

柱温:50℃。

流动相:甲醇+水=30+70(V/V)。

流速:1.0 mL/min。

检测器波长:254 nm。

6.2 空白试验

取 2 mL 正常人混合尿样与样品同时测定。

6.3 样品处理

6.3.1 取 2 mL 尿样于 25 mL 试管中,加 1 mL 水,1 mL 盐酸(4.2),摇匀,加盖。

6.3.2 放在沸水浴中加热 1 h,取出冷至室温,加水补足体积至 4 mL。加 5 mL 乙酸乙酯萃取尿中部分干扰物质,再加 5 mL 乙酸乙酯重复萃取一次,弃掉有机相。于水相中加入 4 g 磷酸氢二钾,摇匀。加入 5 mL 乙酸乙酯萃取对氨基酚。静置分层,轻轻摇动,使萃取液中的棕色悬浮物下沉。上清液供分析用。

6.4 标准曲线的绘制

6.4.1 取 4 支 25 mL 试管,按下表配制标准管。

对氨基酚标准管的配制

管号	1	2	3	4
正常人混合尿, mL	2.0	2.0	2.0	2.0
对氨基酚标准溶液(4.7), mL	0	0.1	0.5	1.0
水, mL	1.0	0.9	0.5	0
相当于尿中对氨基酚浓度 μg/mL	0	4.0	20.0	40.0

6.4.2 以下操作按 6.3.2 条进行。

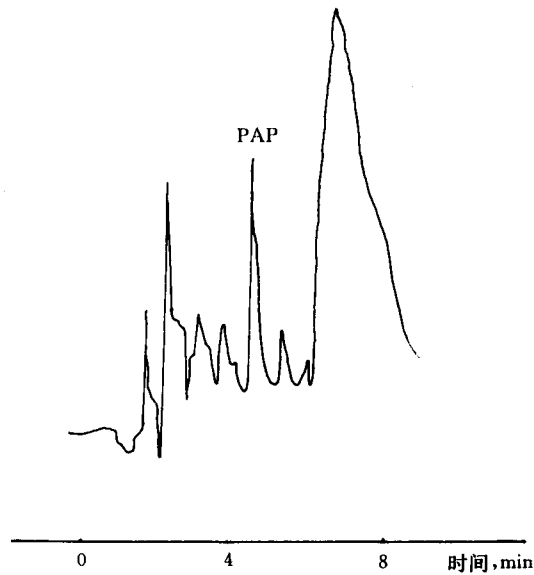
6.4.3 取 10 μL 萃取物上清液进高效液相色谱仪,按操作条件(6.1)测定。重复进样三次。

6.4.4 以对氨基酚浓度为横坐标,各浓度对应的峰高平均值为纵坐标,绘制标准曲线。

6.5 样品测定

6.5.1 取 10 μL 样品及空白样萃取物的上清液(6.3、6.2)分别注入高效液相色谱仪中,按操作条件(6.1)测定。

6.5.2 用保留时间定性,峰高定量。对氨基酚色谱图见下图。在测定前后以及每测定 10 个样品后,测定一次质控样。



尿中对氨基酚的液相色谱图

7 计算

7.1 按式(1)计算尿样换算成标准比重(1.020)下的浓度校正系数(k)。

$$k = \frac{1.020 - 1.000}{\text{实测比重} - 1.000} \dots\dots\dots (1)$$

7.2 按式(2)计算尿中对氨基酚的浓度。

$$X = c \cdot k \dots\dots\dots (2)$$

式中: X ——尿中对氨基酚的浓度,mg/L;
 c ——由标准曲线查得的对氨基酚的浓度,mg/L。

8 说明

- 8.1 本法的最低检测浓度为 0.5 mg/L(空白值的 3 倍标准差);测量范围为 0~20 mg/L(乙酸乙酯萃取后的浓度);当尿中对氨基酚浓度为 4.0~40.0 mg/L 时,变异系数分别为 $CV=3.7\% \sim 6.9\%$;尿中对氨基酚浓度为 3.0~10.7 mg/L 时,加标回收率为 95.0%~103.8%。
- 8.2 苯胺在体内的代谢速度快,所以要在班末或班后 2 h 内采样,以正确地反映接触剂量。采样后应尽早加酸,低温保存。
- 8.3 尿中对氨基酚部分以结合态存在,为测得对氨基酚总浓度,须将结合态对氨基酚水解。尿样加酸后,于沸水浴中加热 1 h,可完全水解。
- 8.4 水解后的尿样中有一未知组分,在中性条件下能与对氨基酚一起被萃取出来,干扰测定。因此必须先酸性条件下,用乙酸乙酯预萃取,除掉干扰物。然后再于中性条件下萃取对氨基酚。预萃取过程中对氨基酚基本无损失。
- 8.5 用碱溶液调节溶液 pH 值不易控制。而用固体磷酸氢二钾调节,操作简单。但加入量要足够,否则影响萃取率。
- 8.6 质控样用加标的模拟尿时可考察准确度和精密度。用接触者尿或加标的正常尿时,可考察精密度。但人尿不宜久存。模拟尿只含人尿的大量成分。

附加说明：

本标准由卫生部卫生监督司提出。

本标准由辽宁省劳动卫生研究所负责起草。

本标准主要起草人曲宁。

本标准由卫生部委托技术归口单位中国预防医学科学院劳动卫生与职业病研究所负责解释。