

中华人民共和国国家职业卫生标准

GBZ/T 254—2014

尿中苯巯基尿酸的高效液相色谱测定方法

Determination of S-phenylmercapturic acid in urine by high performance
liquid chromatography

2014-07-23 发布

2014-12-15 实施

中 华 人 民 共 和 国
国家卫生和计划生育委员会 发 布

前 言

根据《中华人民共和国职业病防治法》制定本标准。

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准起草单位和主要起草人：

——本标准第 3 章尿中苯巯基尿酸的高效液相色谱方法：

主要起草单位：武汉科技大学医学院、湖北中医药大学、鄂州市疾病预防控制中心。

主要起草人：宋世震、梅勇、叶玉杰、胡霞敏、叶方立、陈斯琪、姚群峰、谢云、吴三明。

——本标准第 4 章尿中苯巯基尿酸的高效液相色谱-质谱方法：

主要起草单位：武汉科技大学医学院、武汉大学化学学院、湖北中医药大学。

主要起草人：宋世震、梅勇、叶玉杰、胡霞敏、叶方立、余琼卫、孙丹陵。

尿中苯巯基尿酸的高效液相色谱测定方法

1 范围

本标准规定了尿中苯巯基尿酸浓度的检测方法。

本标准适用于职业接触苯作业工人尿中苯巯基尿酸浓度的测定。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GBZ/T 173 职业卫生生物监测质量保证规范

GBZ/T 210.5 生物材料中化学物质的测定方法 第5部分:生物材料中化学物质的测定方法

WS/T 97 尿中肌酐分光光度测定方法

3 尿中苯巯基尿酸的高效液相色谱法

3.1 原理

尿中苯巯基尿酸(S-phenylmercapturic acid, SPMA)经萃取后,经十八烷基硅烷键合硅胶柱(Octadecylsilyl, ODS)柱分离,紫外检测器检测,以 SPMA 峰保留时间定性,峰高或峰面积定量。

3.2 仪器

3.2.1 高效液相色谱仪,紫外检测器。

仪器操作参考条件:

- a) 色谱柱:ODS(150 mm×4.6 mm, 5 μm);
- b) 保护柱:ODS(10 mm×4.6 mm, 5 μm);
- c) 流动相:A相:乙腈;B相:乙腈 100 mL,甲醇 24 mL,用 0.5%三乙胺水溶液(用磷酸调 pH=2.16)定容至 1 000 mL;梯度洗脱:0 min~34 min 用 100%B 相,34 min~41 min 用 A 相:B 相(10:90),41 min~49 min 用 100%B 相;流速:2.0 mL/min;
- d) 柱温:35℃;
- e) 进样量:20 μL;
- f) 检测波长:205 nm。

3.2.2 分光光度计。

3.2.3 聚氯乙烯塑料瓶:100 mL。

3.2.4 离心机:0 r/min~5 000 r/min。

3.2.5 具塞离心管:10 mL、15 mL。

3.2.6 微量注射器:25 μL。

3.3 试剂

3.3.1 肌酐测定试剂盒(苦味酸分光光度法)。

3.3.2 水,双蒸水。

3.3.3 磷酸,分析纯。

3.3.4 乙腈,色谱纯。

3.3.5 甲醇,色谱纯。

3.3.6 盐酸,分析纯。

3.3.7 硫酸溶液,50%(体积分数)。

3.3.8 氢氧化钾(分析纯)溶液,7.8 mol/L。

3.3.9 萃取液,氯仿:异丙醇=5:1(体积比)。

3.3.10 氮气($\geq 95\%$)。

3.3.11 标准溶液:精密称取 40 mg SPMA 标准品置于 100 mL 容量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,充分摇匀,此溶液为 400 mg/L SPMA 贮备液,于 4℃ 保存备用,可保存期限 30 d,临用前用甲醇稀释到所需浓度的标准溶液;或用国家认可的标准溶液配制。

3.4 样品的采集、运输和保存

用聚乙烯塑料瓶收集接触苯作业的工人班后尿 50 mL,按 100:1 的体积比例加入盐酸;另留取 5 mL 不加酸尿置于试管用作尿中肌酐测定。尿样采集后,最好在 48 h 内检测。若需保存尿样,在 4℃ 条件下可保存 2 周,在 -20℃ 冰箱冷冻可保存 4 个月。

3.5 分析步骤

3.5.1 按 WS/T 97 尽快测定尿中肌酐浓度。

3.5.2 样品处理:分析时将尿样从冰箱取出于室温下解冻,取约 5.0 mL 尿样于 10 mL 具塞离心管中,5 000 r/min 离心 15 min,取上清液 2.0 mL 于 15 mL 具塞离心管中,加入 2.0 mL 水,涡旋约 15 s,加 0.8 mL 硫酸溶液,涡旋约 30 s,10 min 内加入 0.8 mL 氢氧化钾溶液,涡旋约 30 s,加入 5.0 mL 萃取液,盖紧磨口盖,在涡旋混合器上涡旋约 50 s,4 000 r/min 离心 10 min,分层清晰后,保留有机相,将上层水相转移至另一 15 mL 离心管中,再加入 5.0 mL 萃取液进行第二次萃取,合并两次萃取液,水浴 50℃ 氮气流下挥干,残渣用 100 μ L 甲醇涡旋溶解,5 000 r/min 离心 10 min,取 20 μ L 甲醇上清液进样测定。

3.5.3 标准曲线绘制:用甲醇稀释标准溶液成 0.0 μ g/L~1 000 μ g/L 苯巯基尿酸标准系列。参照仪器操作条件,将液相色谱仪调节至最佳测定状态,进样 20 μ L,测定各标准系列。每个浓度重复测定 3 次。由测得的峰高或峰面积均值对相应的苯巯基尿酸浓度(μ g/L)绘制标准曲线或计算回归方程。

3.5.4 样品测定:用测定标准系列的操作条件测定处理好的样品和空白对照溶液,测得样品的峰高或峰面积值减去空白对照的峰高或峰面积值后,由标准曲线得苯巯基尿酸的浓度(μ g/L)。

3.6 计算

按式(1)计算尿中苯巯基尿酸的校正浓度:

$$c = \frac{c_1}{c_2} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

c ——尿中苯巯基尿酸浓度,单位为微克每克肌酐(μ g/g);

c_1 ——测得的尿样中苯巯基尿酸浓度,单位为微克每升($\mu\text{g/L}$);

c_2 ——尿中肌酐(Cr)浓度,单位为克每升(g/L)。

3.7 说明

3.7.1 本法按照 GBZ/T 210.5 的要求进行研制,方法指标符合要求,最低检出浓度为 $40 \mu\text{g/L}$ 。

3.7.2 本法批内精密度(相对标准偏差)为 $2.44\% \sim 9.58\%$,批间精密度(相对标准偏差)为 $3.75\% \sim 9.23\%$,加标回收率为 $92.64\% \sim 103.66\%$ 。

3.7.3 样品前处理,调节尿样 $\text{pH} < 2$ 时,SPMA 的提取回收率较高。

3.7.4 SPMA 保留时间为 31 min 左右。

3.7.5 检测过程中的质量控制按照 GBZ/T 173 执行。

4 尿中苯巯基尿酸的高效液相色谱-质谱法

4.1 原理

尿中苯巯基尿酸(S-phenylmercapturic acid, SPMA)经液-液萃取后,经 ODS 柱分离,质谱检测器检测,以 SPMA 分子离子峰的保留时间定性,峰高或峰面积定量。

4.2 仪器

4.2.1 分光光度计。

4.2.2 聚氯乙烯塑料瓶:100 mL。

4.2.3 离心机:0 r/min~10 000 r/min。

4.2.4 具塞离心管:10 mL,15 mL。

4.2.5 高效液相色谱-质谱仪。

仪器操作参考条件:

a) 色谱柱:ODS(150 mm $\times$ 2.0 mm, 4.6 μm);

b) 保护柱:ODS(50 mm $\times$ 2.0 mm, 4.6 μm);

c) 流动相:乙腈:0.3%甲酸=25:75;

d) 流量:0.2 mL/min;

e) 柱温:35 $^{\circ}\text{C}$;

f) 离子源为电喷雾离子源:负电模式;

g) 接口电压:4.5 kV;

h) 脱溶剂管电压:-15 V;

i) 模块加热器温度:200 $^{\circ}\text{C}$;

j) 脱溶剂管温度:230 $^{\circ}\text{C}$;

k) 雾化气流:1.5 L/min;

l) 定量测定时采用选择离子监控(SIR)模式: m/z 238。

4.3 试剂

4.3.1 肌酐测定试剂盒(苦味酸分光光度法);

4.3.2 水,双蒸水。

4.3.3 乙腈,色谱纯。

4.3.4 甲醇,色谱纯。

4.3.5 盐酸,分析纯。

4.3.6 硫酸(分析纯)溶液,50%(体积分数)。

4.3.7 氢氧化钾(分析纯)溶液,7.8 mol/L。

4.3.8 萃取液,氯仿:异丙醇=5:1(体积比)。

4.3.9 氮气($\geq 95\%$)。

4.3.10 标准溶液:精密称取 40 mg SPMA 标准品置于 100 mL 容量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,充分摇匀,此溶液为 400 mg/L SPMA 贮备液,于 4℃ 保存备用,可保存期限 30 d,临用前用甲醇稀释到所需浓度的标准溶液;或用国家认可的标准溶液配制。

4.4 样品的采集、运输和保存

用聚乙烯塑料瓶收集接触苯作业的工人班后尿 50 mL,按 100:1 的体积比例加入盐酸;另留取 5 mL 不加酸尿置于试管用作尿中肌酐测定。尿样采集后,最好在 48 h 内检测。若需保存尿样,在 4℃ 条件下可保存 2 周,在 -20℃ 冰箱冷冻可保存 4 个月。

4.5 分析步骤

4.5.1 按 WS/T 97 尽快测定尿中肌酐浓度。

4.5.2 样品处理:分析时将尿样从冰箱取出于室温下解冻,取约 5.0 mL 尿样于 10 mL 具塞离心管中,5 000 r/min 离心 15 min,取上清液 2.0 mL 于 15 mL 具塞离心管中,加入 2.0 mL 水,涡旋约 15 s,加 0.8 mL 硫酸溶液,涡旋约 30 s,10 min 内加入 0.8 mL 氢氧化钾溶液,涡旋约 30 s,加入 5.0 mL 萃取液,盖紧磨口盖,在涡旋混合器上涡旋约 50 s,4 000 r/min 离心 10 min,分层清晰后,保留有机相,将上层水相转移至另一 15 mL 离心管中,再加入 5.0 mL 萃取液进行第 2 次萃取,合并两次萃取液,水浴 50℃ 氮气流下挥干,残渣用 100 μ L 甲醇涡旋溶解,5 000 r/min 离心 10 min,取 5 μ L 甲醇上清液进样测定。

4.5.3 标准曲线绘制:用甲醇稀释标准溶液成 0.0 μ g/L~320.0 μ g/L 苯巯基尿酸标准系列。参照仪器操作条件,将高效液相色谱-质谱仪调节至最佳测定状态,进样 5 mL,测定各标准系列。每个浓度重复测定 3 次。由测得的峰高或峰面积均值对相应的苯巯基尿酸浓度(μ g/L)绘制标准曲线或计算回归方程。

4.5.4 样品测定:用测定标准系列的操作条件测定上述处理好的样品和空白对照溶液,测得样品的峰高或峰面积值减去空白对照的峰高或峰面积值后,由标准曲线得苯巯基尿酸的浓度(μ g/L)。

4.6 计算

按式(2)计算尿中苯巯基尿酸的校正浓度:

$$c = \frac{c_1}{c_2} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

c ——尿中苯巯基尿酸浓度,单位为微克每克肌酐(μ g/g);

c_1 ——测得的尿样中苯巯基尿酸浓度,单位为微克每升(μ g/L);

c_2 ——尿中肌酐(Cr)浓度,单位为克每升(g/L)。

4.7 说明

4.7.1 在信噪比 $S/N > 10$ 时,本法的最低检测浓度为 10 μ g/L;在信噪比 $S/N = 3$ 时,最低检出浓度为

5 $\mu\text{g/L}$ 。

4.7.2 本法批内精密度(相对标准偏差)为 1.97%~7.96%，批间精密度(相对标准偏差)为 2.72%~8.57%。加标回收率为 93.86%~104.33%。

4.7.3 样品前处理,调节尿样 $\text{pH}<2$ 时,SPMA 的提取回收率较高。

4.7.4 使用 0.3%甲酸流动相,SPMA 色谱峰出峰时间短,且附近没有杂质峰的干扰。

4.7.5 以 SPMA 分子离子峰的保留时间定性,本实验条件下,SPMA 的保留时间为 7.8 min 左右。

4.7.6 在接触低浓度苯时,使用高效液相色谱-质谱法检测尿中 SPMA。
