

中华人民共和国卫生行业标准

尿中马尿酸、甲基马尿酸的 高效液相色谱测定方法

WS/T 53—1996

Urine—Determination of hippuric acid and methylhippuric
acid—High performance liquid chromatographic method

1 主题内容与适用范围

本标准规定了尿中马尿酸、甲基马尿酸的高效液相色谱测定方法。本法最低检测浓度为马尿酸 0.015 mg/L, 甲基马尿酸 0.03 mg/L。

本标准适用于正常人和接触甲苯、二甲苯工人尿中马尿酸、甲基马尿酸的测定。

2 原理

尿液经酸化后用乙酸乙酯萃取其中的马尿酸(HA)和甲基马尿酸(MHA), 反相 C_{18} 液相色谱柱分离, 紫外检测器检测, 以保留时间定性, 峰面积定量。

3 仪器

3.1 高效液相色谱仪, 紫外检测器。

3.2 离心机, 3 000 r/min。

3.3 恒温水浴锅。

3.4 旋涡混合器。

3.5 具塞离心管, 10 mL

3.6 具塞试管, 5 mL

3.7 微量取样器, 10 μ L。

3.8 聚乙烯塑料瓶, 100 mL。

3.9 尿比重计。

4 试剂

本标准所用试剂除另有说明外, 均为分析纯试剂。

4.1 实验用水, 蒸馏水或同等纯度的去离子水。

4.2 盐酸, $\rho_{20}=1.19$ g/mL。

4.3 冰乙酸, $\rho_{20}=1.05$ g/mL。

4.4 氯化钠。

4.5 甲醇。

4.6 乙酸乙酯。

4.7 盐酸溶液, 1+1。

4.8 马尿酸, 色谱纯。

WS/T 53—1996

4.9 甲基马尿酸,色谱纯。

4.10 HA 和 MHA 标准溶液:称取 HA 和 MHA 各 50.00 mg,加水溶解,移入 50 mL 容量瓶中,加水至刻度。此溶液 1 mL=1 mgHA 或 MHA,4℃保存备用。

4.11 质控样 加标的模拟尿、接触者混合尿或加标的正常人混合尿。

5 采样、运输和保存

用聚乙烯塑料瓶收集接触甲苯或二甲苯工人的班末尿,尽快测量比重,按 0.1%(V/V)的比例加入盐酸(4.2),室温下运输。于 4℃冰箱中可保存两周,也可将样品提取、蒸干,于常温保存。

6 分析步骤

6.1 仪器操作条件

色谱柱:150 mm,内径 4.6mm,不锈钢柱。

柱填料: C_{18} 键合多孔硅胶,5 μm ;

柱温:35℃。

流动相:甲醇+水+冰乙酸=20+80+0.01;

流速:1 mL/min。

紫外检测器:波长 254 nm,灵敏度 0.08AUFS。

6.2 样品处理

6.2.1 取 1.0 mL 尿样于离心管中。

6.2.2 加入 0.1 mL 盐酸溶液(4.7),0.3 g 氯化钠,4 mL 乙酸乙酯。于旋涡混合器上混合 1 min,以 1 000r/min 速度离心 5 min。取 0.4 mL 乙酸乙酯于具塞试管中,置于低于 70℃水浴挥发至干。加 1 mL 水溶解残留物。

6.3 标准曲线的绘制

6.3.1 取 4 支离心管,按下表配制标准管。

HA 和 MHA 标准管的配制

管 号	0	1	2	3
标准溶液(4.10),mL	0	0.10	0.20	0.50
水,mL	1.0	0.90	0.80	0.50
HA 含量,mg	0	0.1	0.2	0.5
MHA 含量,mg	0	0.1	0.2	0.5

6.3.2 以下操作按 6.2.2 条进行。

6.3.3 取 10 μL 溶解的残留物(6.3.2)注入色谱仪,按 6.1 条的仪器操作条件测定。以保留时间定性,峰面积定量。每个浓度重复测定 3 次,取峰面积的均值。以 HA 或 MHA 的峰面积为纵坐标,HA 或 MHA 的含量(按上述条件操作,最后进样 10 μL ,相当于 0,0.1,0.2,0.5 μg)为横坐标,绘制标准曲线。

6.4 样品测定

6.4.1 取 10 μL 处理好的样品(6.2)注入色谱仪,按 6.1 条的仪器操作条件测定,以保留时间定性,峰面积定量。

6.4.2 在测定前后以及每测定 10 个样品后,测定一次质控样。

6.4.3 从标准曲线上查出 HA 或 MHA 的含量。

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)。

WS/T 53—1996

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

7.2 按式(2)计算尿中 HA 或 MHA 的浓度。

$$X = \frac{m \times 1\,000}{V} \cdot k \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中: X ——尿中 HA 或 MHA 的浓度, mg/L;

m ——由标准曲线上查得的 HA 或 MHA 的含量, μg ;

V ——进样体积, μL 。

8 说明

8.1 本法的检测下限 HA 为 0.015 mg/L, MHA 为 0.03 mg/L。精密度: 当 HA 和 MHA 的浓度为 0.1, 0.2, 0.5 μg 时 HA 的变异系数分别为 1.5%, 2.4% 和 1.1%。MHA 的变异系数分别为 1.5%, 3.7% 和 1.7%。接触者尿加标平均回收率 HA 为 99.05%, MHA 为 104.3%。

8.2 尿样中按 0.1%(V/V) 比例加入盐酸, 也可以按 0.1%(m/m) 的比例加入百里酚, 于 4℃ 保存, 至少可以稳定 15 天。尿样酸化, 用乙酸乙酯提取, 提取液蒸干保存, 至少可以稳定半年。

8.3 质控样如用加标的模拟尿时可以考察准确度和精密度。用接触者尿和正常尿时可考察精密度。但人尿不易久存, 模拟尿只含人尿中大量成分。

附加说明:

本标准由卫生部卫生监督司提出。

本标准由湖北省卫生防疫站负责起草。

本标准主要起草人: 张国祥、梁禄。

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。