

中华人民共和国卫生行业标准

尿中五氯酚的高效液相色谱 测定方法

WS/T 61—1996

Urine—Determination of pentachlorophenol
—High performance liquid chromatographic method

1 主题内容与适用范围

本标准规定了尿中五氯酚的高效液相色谱测定方法。本法最低检测浓度为 0.3 mg/L。
本标准适用于接触五氯酚(PCP)的工人尿中五氯酚的测定。

2 原理

尿样加盐酸加热水解后,碱性下用二氯甲烷萃取,除去部分干扰物,然后在酸性下用乙醚萃取尿样中五氯酚,浓缩后进高效液相色谱仪测定。以保留时间或用 254 nm 与 313 nm 响应值比值定性,用峰面积定量。

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 全玻璃蒸馏器,2 000 mL。
- 3.4 消化瓶,带内衬聚四氟乙烯薄膜的塑料螺帽玻璃瓶,30 mL。
- 3.5 微量注射器,10 μ L。
- 3.6 梨形分液漏斗,25 mL。
- 3.7 容量瓶,10 mL。
- 3.8 量筒,25 mL 及 50 mL。
- 3.9 具塞刻度离心管,5 mL。
- 3.10 聚乙烯塑料瓶,50~100 mL。
- 3.11 尿比重计。

4 试剂

本标准所用试剂除另有说明者外,均为分析纯试剂。

- 4.1 实验用水,经全玻璃蒸馏器重蒸馏的水。
- 4.2 硫酸, $\rho_{20}=1.84$ g/mL。
- 4.3 盐酸, $\rho_{20}=1.19$ g/mL。
- 4.4 磷酸氢二铵。
- 4.5 二氯甲烷。
- 4.6 乙醚,优级纯。

WS/T 61—1996

4.7 甲醇,重蒸馏的。

4.8 磷酸氢二铵溶液, $c[1/2(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4]=0.015\text{ mol/L}$ 。

4.9 氢氧化钠溶液,5 mol/L。

4.10 氢氧化钠溶液,0.1 mol/L。

4.11 五氯酚钠,优级纯。

4.12 五氯酚标准溶液:准确称取 10.0 mg 的五氯酚或 10.9 mg 五氯酚钠于 25 mL 烧杯中,加 0.5 mL 氢氧化钠溶液(4.10),待溶解后加水稀释至 100 mL。此溶液 1 mL 相当于 100 μg 五氯酚。

4.13 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

用聚乙烯塑料瓶或硬质玻璃瓶收集接触五氯酚或五氯酚钠工人工作周最后一个班的班后尿,在低于 10℃ 下运输。尽快测定比重后,每 100 mL 尿样加 2~3 滴盐酸,4℃ 下保存,二周内分析完毕。

6 分析步骤

6.1 仪器操作条件

色谱柱:柱长 20 cm,内径 4 mm,不锈钢柱。

柱填料:反相 C_{18} 键合固定相,5 μm 。

柱温:室温。

流动相:甲醇+0.015 mol/L 磷酸氢二铵=50+50(V/V)。

流速:1.0 mL/min。

检测器波长:254 nm。

6.2 空白试验

取 2 mL 正常人混合尿与样品同时进行测定。

6.3 样品处理

取 2 mL 尿样于消化瓶中,加 0.5 mL 浓盐酸,摇匀,加盖。放在沸水浴中加热 1 h,取出冷至室温,定量转移至分液漏斗中,用 5 mol/L 氢氧化钠溶液调至碱性后,用 2 mL 二氯甲烷萃取出尿中部分干扰物质,再用硫酸调尿液至酸性,用乙醚萃取三次(3 mL,2 mL,2 mL),合并乙醚萃取液于 5 mL 离心管中,自然蒸发或在氮气流中浓缩乙醚溶液至小于 0.1 mL,加甲醇稀释至 2 mL。

6.4 标准曲线的绘制

取 6 个容量瓶(3.7),按下表配制标准管。

五氯酚标准管的制备

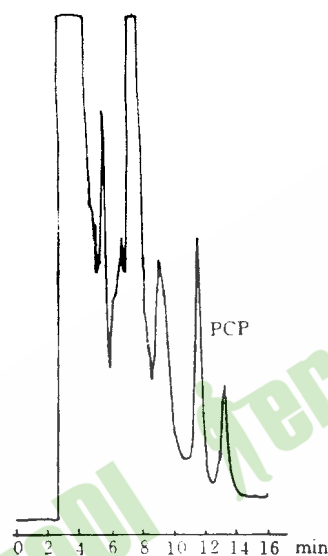
管 号	0	1	2	3	4	5
五氯酚标准溶液(4.12),mL	0	0.06	0.15	0.30	0.60	1.20
甲醇,mL	加至 10 mL					
五氯酚浓度, $\mu\text{g/mL}$	0	0.6	1.5	3.0	6.0	12.0

由以上 6 个溶液中各取 10 μL 进 HPLC,按 6.1 条操作条件,重复进样三次。以五氯酚浓度为横坐标,峰面积平均值为纵坐标,绘制标准曲线。

6.5 样品测定

将各管样品液(6.3)剧烈地上下摇动,使残渣充分溶解,离心 10 min,取上清液 10 μL 进 HPLC,用保留时间定性,峰面积定量。五氯酚色谱图见下图。在测定前后以及每测定 10 个样品后,测定一次质控样。

WS/T 61—1996



尿中五氯酚色谱图

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)。

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

7.2 按式(2)计算尿中五氯酚的浓度。

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

式中： X ——尿中五氯酚的浓度，mg/L；

c ——由标准曲线查得的五氯酚浓度，mg/L。

8 说明

8.1 本法的检测限为 3 ng(3 倍噪声)，线性范围为 0~12 mg/L，当尿中五氯酚浓度为 0.6, 1.5, 6.0 mg/L 时，变异系数分别为 4.6%，3.7% 及 1.5%；尿中五氯酚浓度为 1.0~3.0 mg/L 时，加标回收率平均为 85%。

8.2 采集尿样时，工人要脱离生产场所，换上工作服，洗净手、臂及面部，以防五氯酚的污染。采样后应尽早加酸低温保存。

8.3 测定尿中五氯酚总含量是有卫生学意义的，必须将结合态的五氯酚充分水解。尿样经酸化后于沸水浴中加热 1 h，使结合的 PCP 释放出来。用带螺帽的消化瓶进行水解，可减少五氯酚的挥发损失及尿液的飞溅。

8.4 加酸水解后的尿样基体中有大量极性化合物干扰测定。利用五氯酚在碱性条件下溶于水，用二氯甲烷萃取出尿液中大部分干扰物质，既改善了五氯酚的峰形，也保护了色谱柱，使其不受污染。

8.5 五氯酚是一个弱酸，在碱性溶液中以离子状态存在，测定时它在甲醇-水-磷酸氢二铵体系中比在常用的甲醇-水-乙酸中响应值大。但每次工作结束后，必须用水冲洗色谱柱，直到冲洗液呈中性，再用甲醇冲洗，以保护色谱柱，延长其使用寿命。

8.6 五氯酚有一定的挥发性，应在低于 35℃ 时自然蒸发乙醚萃取液，或在 35~40℃ 水浴中吹氮浓缩。残留的少量乙醚不干扰五氯酚的测定。

8.7 如有可变波长紫外检测器时，可用五氯酚的最大吸收波长 220 nm 进行检测，从而提高本方法的

灵敏度。

8.8 液相色谱柱可使用任何厂牌的反相 C_{18} 柱,但粒度以 $5\ \mu\text{m}$ 的填料分离效果较好, $10\ \mu\text{m}$ 的填料需要较长的柱子。流动相配比及流速可根据各自的仪器条件进行选择。

8.9 质控样用加标的模拟尿或加标的人尿时可考察准确度和精密度,用接触者尿时只能考察精密度。但人尿不能久存。模拟尿只含人尿大量成分。

附加说明:

本标准由卫生部卫生监督司提出。

本标准由中国预防医学科学院劳动卫生与职业病研究所负责起草。

本标准主要起草人虞爱如。

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。