

# 中华人民共和国卫生行业标准

## 尿中苯乙醛酸和苯乙醇酸的高效液相色谱测定方法

WS/T 54—1996

Urine—Determination of phenylglyoxylic acid  
and mandelic acid—High performance liquid  
chromatographic method

### 1 主题内容与适用范围

本标准规定了尿中苯乙醛酸和苯乙醇酸的高效液相色谱测定方法。

本法最低检测浓度为苯乙醛酸 1 mg/L, 苯乙醇酸 10 mg/L。

本标准适用于接触苯乙烯或乙苯的工人尿中苯乙醛酸和苯乙醇酸的测定。

### 2 原理

尿样加盐酸酸化后,用二氯甲烷与异丙醇的混合溶剂萃取,浓缩进样后,由高效液相反相  $C_{18}$  柱分离,紫外检测器于波长 225、254 nm 处检测。用保留时间定性,内标法峰面积比定量。

### 3 仪器

- 3.1 高效液相色谱仪,可变波长紫外检测器。
- 3.2 离心机,3 000 r/min。
- 3.3 旋涡混合器。
- 3.4 真空抽滤装置。
- 3.5 试管,15 mm×100 mm。
- 3.6 具塞离心管,5 mL。
- 3.7 容量瓶,50 mL。
- 3.8 微量注射器,10  $\mu$ L、50 $\mu$ L。
- 3.9 聚乙烯瓶,150 mL。
- 3.10 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。

- 4.1 实验用水:重蒸水。
- 4.2 盐酸, $\rho=1.19$  g/mL。
- 4.3 磷酸,85%(m/m)。
- 4.4 冰乙酸, $\rho=1.05$  g/mL。
- 4.5 二氯甲烷。
- 4.6 异丙醇。

- 4.7 甲醇。
- 4.8 苯乙醛酸(PGA)。
- 4.9 苯乙醇酸(MA)。
- 4.10 马尿酸(HA)。
- 4.11 4-羟基苯甲酸。
- 4.12 混合萃取溶剂:二氯甲烷+异丙醇,9+1。
- 4.13 流动相(混合酸水溶液):取冰乙酸、85%磷酸各 1.0 mL 稀释至 100 mL 置冰箱存放,用时取 10 mL 用水稀至 1 L,为 0.1%混合酸水溶液。
- 4.14 准确称取 PGA 0.200 0 g,MA 0.500 0 g,HA 0.100 0 g,用 1 mL 0.5 mol/L NaOH 溶解后,用水稀释至 50 mL 为标准贮备液。此溶液 1 mL 相当于 4.0 mg PGA,10.0 mg MA,2.0 mg HA。临用时用水稀释 10 倍,为标准应用液。此溶液 1 mL 相当于 0.4 mg PGA,1.0 mg MA,0.2 mg HA。
- 4.15 内标溶液:准确称取 0.200 0 g 4-羟基苯甲酸,用 1 mL 0.5 mol/L NaOH 溶解,用水稀释至 50 mL。
- 4.16 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

用聚乙烯瓶收集接触苯乙烯工人班后尿 80~100 mL,在低于 10℃ 下运输,测比重。于 4℃ 冰箱可保存一周,于 -20℃ 冰箱可保存二周。

## 6 分析步骤

### 6.1 仪器操作条件

色谱柱:柱长 15 cm,内径 4 mm,不锈钢柱。

柱填料:C 键合固定相,10 μm。

柱温:室温。

流动相:甲醇+混合酸水溶液=15+85(V/V)(4.13)。

流速:1.0 mL/min。

检测器波长:225 nm,254 nm。

### 6.2 空白试验

取 1 mL 非接触者混合尿与样品同时进行测定。

### 6.3 样品处理

6.3.1 取 1.0 mL 尿样于小试管(3.5)中。

6.3.2 加 0.1 mL 6 mol/L 盐酸,用微量注射器加 50 μL 内标溶液(4.15),以 4.0 mL 混合萃取溶剂(4.12)在旋涡混合器上萃取 1 min。离心 10 min,用真空泵将上层尿液抽尽,转移 0.5 mL 有机相至离心管(3.6)中,在 40℃ 水浴中用氮气将有机溶剂吹干。加 0.2 mL 流动相溶解残留物,取 5 μL 进 HPLC。

### 6.4 标准曲线绘制

6.4.1 取 6 支小试管(3.5),按表 1 配制标准管。

表1 PGA和MA标准管的配制

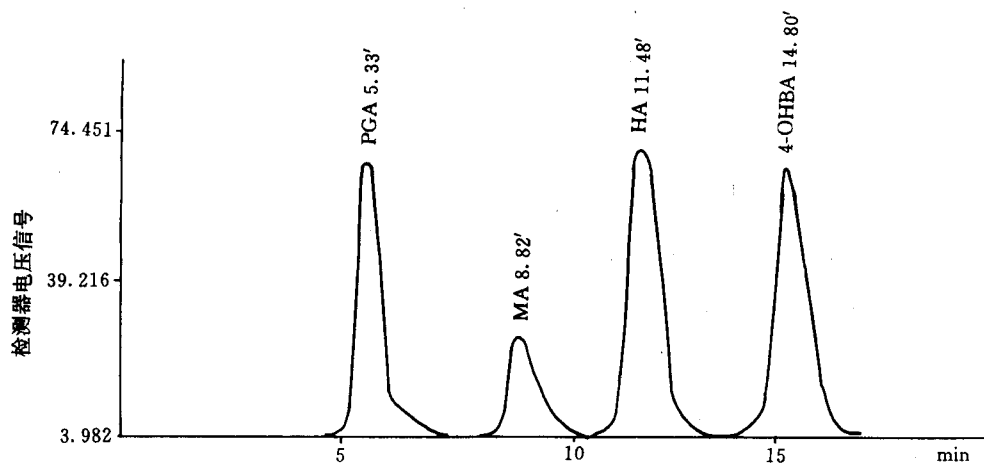
管号	0	1	2	3	4	5
标准应用液(4.14), mL	0	0.1	0.3	0.5	0.7	1.0
水, mL	1.0	0.9	0.7	0.5	0.3	0
PGA含量, mg	0	0.04	0.12	0.2	0.28	0.4
MA含量, mg	0	0.1	0.3	0.5	0.7	1.0

6.4.2 按6.3.2条操作。

6.4.3 重复进样三次。以被测物含量为横坐标,被测物与内标物峰面积比平均值为纵坐标,绘制标准曲线。

6.5 样品测定

6.5.1 在上述操作条件下(6.1),取5 μL 样品溶液(6.3.2)进HPLC。同时测定空白样品溶液(6.2)。用保留时间定性,用被测物与内标的峰面积比值在标准曲线上查出被测物的浓度。色谱图见下图。



PGA,MA,HA,4-OHBA 的色谱分离图

在测定前后及每分析10个样品后分析一个质控样。

## 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)计算尿中苯乙醛酸和苯乙醇酸的浓度。

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

式中:  $X$ ——尿中苯乙醛酸或苯乙醇酸的浓度, mg/L;

$c$ ——由标准曲线查得的苯乙醛酸或苯乙醇酸的浓度, mg/L。

## 8 说明

8.1 本法的各项性能指标见表2。

表 2

指 标	PGA	MA
检测限,ng	2	20
测量范围,mg/L	0~400	0~1 000
精密度 CV,%	1.5~6.3	2.1~7.4
准确度:加标回收率,%	106	103

8.2 采集尿样时,工人须脱离工作场所。尿量不少于 50 mL。

8.3 标准应用液置棕色试剂瓶于 4℃冰箱可存放二周。

8.4 二氯甲烷沸点低,易被氮气吹干,酸性条件下对尿中杂质萃取也较少,但它对 MA 的萃取率很低。MA 极易溶解在异丙醇中,但异丙醇沸点高,与水不能分层,集两种溶剂的优点为一体,组成混合萃取溶剂既提高了萃取率,又使杂质干扰大为减少。混合萃取溶剂在室温较高时容易挥发,故标准曲线应定期核对。

8.5 流动相中的磷酸能有效抑制 PGA 和 MA 的电离,改善峰形,有利于色谱分离,且比磷酸盐更容易冲洗色谱柱和管道。

8.6 质控样如使用加标的模拟尿时可考察准确度及精密度,加标的人尿或接触者尿只能考察精密度,但人尿不易保存,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。

本标准由上海医科大学负责起草。

本标准主要起草人倪莉珍。

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。