

生物 尿中 1-羟基芘的测定
高效液相色谱 (HPLC) 法

GB/T 16156—1996

Biomaterials—Determination of urinary 1-hydroxypyrene—
High performance liquid chromatography

本标准规定了测定尿中 1-羟基芘的高效液相色谱法。

1-羟基芘是芘的代谢产物,尿中 1-羟基芘的浓度可以反映人体接触环境中多环芳烃的水平,它不仅与环境空气中芘的浓度有良好的正相关,而且也与苯并(a)芘有很好的正相关,因此人尿中 1-羟基芘是多环芳烃的一个灵敏有效的生物监测指标。

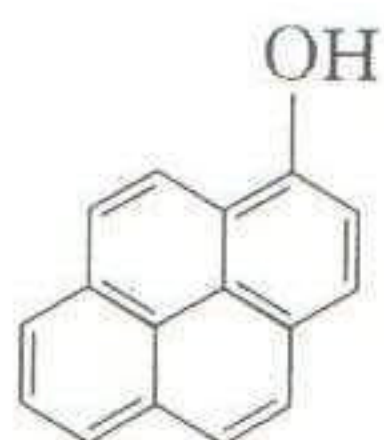
1 适用范围

本方法适用于尿中 1-羟基芘的测定。当尿样体积为 10 ml 时,方法检测限为 0.05 $\mu\text{g/L}$ 。

2 原理

用 β -葡萄糖苷酸酶将尿样中结合态的 1-羟基芘水解成游离态,通过 C_{12} 固相富集预分离小柱、甲醇洗脱、反相高效液相色谱柱分离、在激发波长 345 nm、发射波长 388 nm 处荧光检测测量峰面积,外标法定量。

3 试剂与材料



3.1 1-羟基芘 (1-Hydroxypyrene) 含量大于 96%。

3.2 1-羟基芘标准储备液 (100 $\mu\text{g/ml}$): 称量 1-羟基芘 (3.1) $10 \pm 0.1\text{mg}$, 溶解于 50~70 ml 甲醇 (3.4) 中,再以甲醇定容至 100 ml 于 4°C 冰箱中冷藏。

3.3 标准工作溶液: 根据仪器灵敏度及线性范围将 1-羟基芘标准储备液 (3.2), 用甲醇 (3.4) 稀释其浓度为 0.1~0.5 ng 的标准工作溶液。

3.4 甲醇: 分析纯,在测定条件下无干扰峰。

3.5 重蒸水: 用电渗析水或蒸馏水加高锰酸钾在碱性条件下重蒸。在测定条件下无干扰峰。

3.6 乙酸和乙酸钠缓冲溶液: 用等体积的 0.1 mol/L 乙酸和 0.1 mol/L 乙酸钠溶液混合而成 (pH5)。

3.7 β -葡萄糖苷酸酶: 反应条件为 pH5。

3.8 C_{12} 固相富集预分离小柱。

4 仪器

4.1 高效液相色谱仪: 带荧光检测器。

4.1.1 恒流梯度泵系统。

4.1.2 反相柱: 填料为 YWG-CH 5 μ ODS, 柱长 250 mm, 内径 4.6 mm。

4.1.3 荧光检测器：荧光分光光度检测器，具激发波长 345 nm，发射波长 388 nm。

4.1.4 色谱数据处理机或记录仪。

4.1.5 微量注射器：10、50 及 100 μl 。

4.2 恒温水浴。

4.3 K-D 浓缩装置。

4.4 磁力恒温搅拌器。

4.5 玻璃注射器：10 及 50 ml。

4.6 锥形瓶：100 ml。

4.7 移液管：1、2、5 及 10 ml。

4.8 容量瓶、烧杯、量筒、试剂瓶等。

4.9 采样瓶：60 ml 带盖塑料瓶。

4.10 冰箱。

5 样品

5.1 样品的性质。

5.1.1 样品名称：尿样。

5.1.2 样品状态：液体。

5.1.3 样品稳定性：需冰冻保存，可保持三个月。

5.2 尿样采集和储备方法：收集样品约 45 ml，于采样瓶（4.9）中立即送实验室冰箱中冰冻。

5.3 尿样的预处理

5.3.1 尿样的酶水解：用移液管准确吸取 10.0 ml 尿样于 100 ml 锥形瓶中，加入 5 ml 缓冲液（3.6）。根据产品（3.7）中的酶活性加入适量 β -葡萄糖苷酸酶，使此缓冲液中含有 2000 单位的 β -葡萄糖苷酸酶（含酶缓冲液用前临时配制）。在 37°C 水浴中放置 1 h。

5.3.2 预分离

5.3.2.1 C_{18} 固相富集予分离小柱的活化：用 10 ml 注射器（4.5）以 5 ml 甲醇（3.4）通过小柱（3.8），再用 10 ml 水（3.5）淋洗。

5.3.2.2 尿样中 1-羟基茚的富集：经酶水解的尿样（5.3.1）在 50 ml 注射器（4.5）中以大约 10 ml/min 的速度通过活化好的固相富集予分离小柱（5.3.2.1），再用 8 ml 甲醇（3.4）淋洗，收集甲醇淋洗液。

5.3.3 浓缩定容：甲醇淋洗液（5.3.2.2）在 K-D 浓缩瓶（4.3）中 60°C 以下减压浓缩，定容至 1.0（或 0.5）ml，供 HPLC 分析。

6 操作步骤

6.1 调整仪器：设置高效液相色谱仪参数，使其达到预期的分离效果，预运转至获得稳定的基线。

6.1.1 柱温：室温。

6.1.2 流动相组成：

A 液：水（3.5）+ 甲醇（3.4）（6+4）。

B 液：甲醇（3.4）。

6.1.3 洗脱：用梯度洗脱，前 5 min 用 90% A 液洗脱，至 10 min 时改变用 90% B 液洗脱，再保持 15 min。出峰完全后用 90% A 液洗脱，保持 15 min，使流动相组成恒定，为下一次进样准备好条件。

6.1.4 流动相流速：0.5 ml/min

6.1.5 荧光检测器条件： $\lambda_{\text{ex}}=345\text{ nm}$ $\lambda_{\text{em}}=388\text{ nm}$ ，激发波长的狭缝带宽为发射波长狭缝带宽的 4 倍。

6.1.6 色谱数据处理机或记录仪：根据样品中 1-羟基茚的含量调节放大挡和纸速，以获得满意的谱图。

6.2 校准

6.2.1 用外标法定量。

6.2.2 标准样品：

6.2.2.1 标准样品的制备：使用 1—羟基茈的标准工作溶液（3.3），依次递增配制标准工作溶液其最低浓度应稍高于最低检测限。

6.2.2.2 高效液相色谱法中使用标准样品的条件：

a) 标准样品与试样进样体积最好相同，两者的响应值也要相近。

b) 在工作范围内，相对标准偏差 $<10\%$ 。

c) 标准样品与试样应尽可能同时进行分析。

6.2.2.3 使用次数：每个工作日必须测定一种或几种浓度的标准溶液来检验校准曲线或响应因子。如响应值与预期值间的偏差大于 10% ，则必须用新的标准对该化合物绘制新的校准曲线或求出新的响应因子。

6.2.3 校准数据的表示：以响应值对进样量作校准曲线，可得一条通过原点的直线。响应值与进样量的比值为一常数，可用平均比值或响应因子代替标准曲线来计算测定结果。使用色谱数据处理机（4.1.4）时此项工作可由处理机根据输入数据自动完成。

6.3 测定

6.3.1 进样

6.3.1.1 进样方式：以注射器人工进样。

6.3.1.2 进样量：20~50 ml。

6.3.1.3 操作：取分离定容后的试样（5.3.5）润湿微量注射器（4.1.5）的针头及针筒，并洗涤三次。抽取样品，排出针筒中的气泡。迅速注射样品至 HPLC 的进样阀，进行 HPLC 分析。

6.3.2 记录

6.3.2.1 数据处理机记录：与进样时间同步启动。

6.3.2.2 若用普通记录仪时应记录下放大倍数及纸速。

6.4 色谱图的考察

6.4.1 色谱图

1-羟基茈的出峰时间约为 20 min，图 1 中给出 1-羟基茈标样（图 1·A），经酶水解后的尿样（图 1·B）和未经酶水解尿样（图 1·C）的色谱图，标样的浓度为 50 ng/ml，进样体积 40 ml。

6.4.2 定性分析

6.4.2.1 保留值：以试样的保留时间和标样的保留时间相比较来定性。

6.4.2.2 荧光光谱：当 1-羟基茈出峰时，停泵扫描。以 $\lambda_{em}410\text{ nm}$ ， λ_{ex} 由 200 nm 扫描； $\lambda_{ex}345\text{ nm}$ ， λ_{em} 由 350 nm 扫描为条件，测定该组分的荧光激发和发射谱图与对应标样的荧光图对比。

6.4.3 定量分析

6.4.3.1 色谱的测量

使用色谱处理机（4.1.4）可直接给出试样中 1-羟基茈的含量（ng/ml），也可根据指令给出 1-羟基茈的峰面积（或峰高）。

若无处理机时，可根据记录的色谱峰进行测量：

连接峰的起点与终点之间的直线作为峰底，以峰最大值到峰底的垂线为峰高。垂线在时间坐标上的对应值为保留时间。通过峰高的中点作平行峰底的直线，此直线与峰两侧相交，两点之间的距离为半高峰宽。峰与峰底之间的面积为峰面积，等于峰底乘半高峰宽。

6.4.3.2 计算（外标法）

$$X = \frac{A_s \cdot B_s \cdot V_i}{V_i \cdot V_s}$$

式中：X——试样中 1—OH—茈的含量，ng/ml；

A ——标样进样量对其峰高（或峰面积）的比值， ng/mm （或 ng/mm^2 ）；

B ——样品 1—OH—茈的峰高（或峰面积）， mm （或 mm^2 ）；

V_t ——甲醇洗脱液浓缩后的总体积， μl ；

V_i ——注射样品的体积， μl ；

V_s ——尿样体积， ml 。

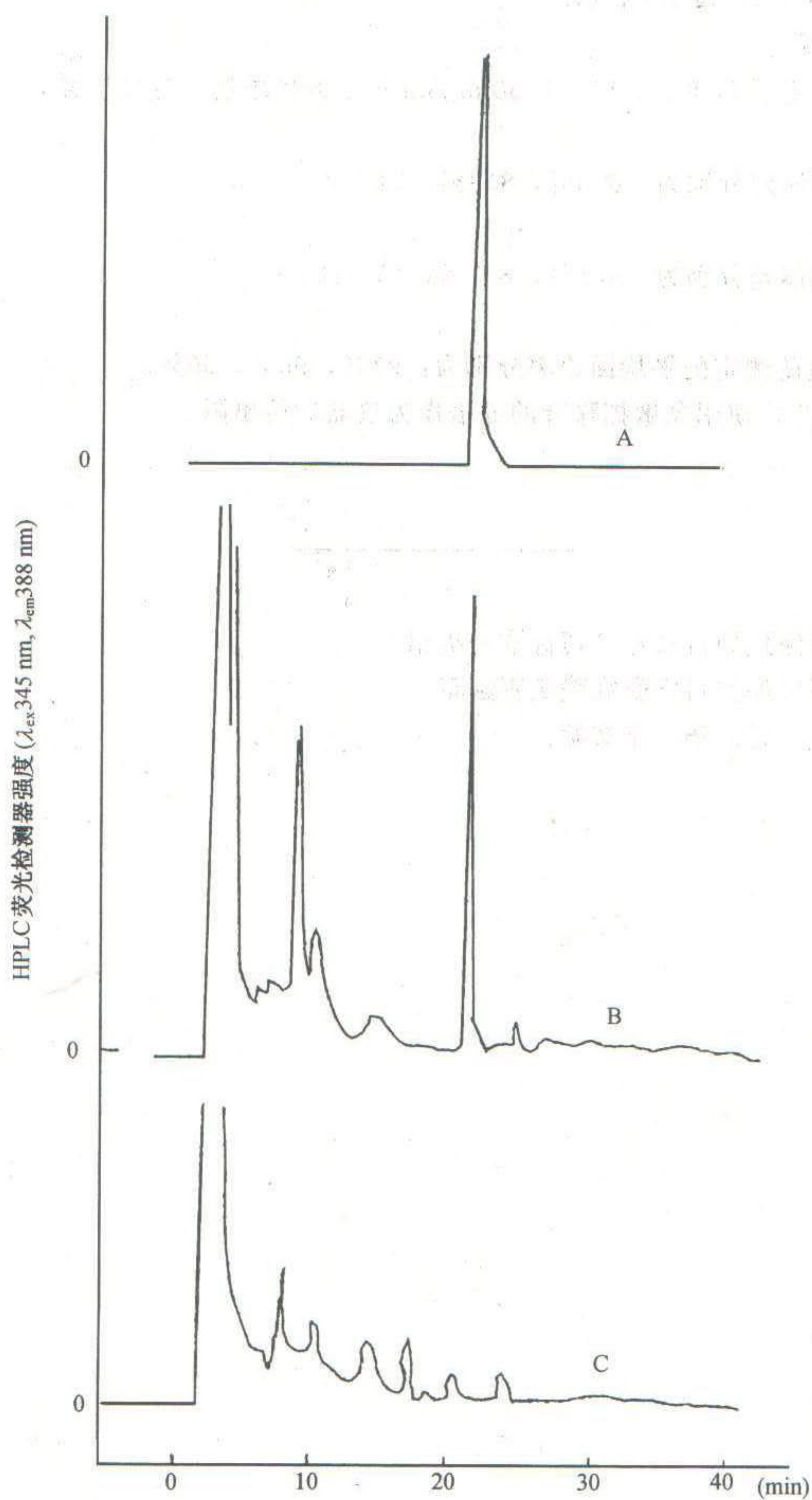


图 1 样品的 HPLC 色谱图

A: 1—OH—茈标样

B: 加酶水解样品

C: 不加酶水解样品

(37°C , 1 h)

进样量 $40\ \mu\text{l}$

7 结果的表示

7.1 定性结果

根据保留时间确定被测试样中 1-羟基芘的色谱峰。

7.2 定量结果

7.2.1 含量的表示方法：以 ng/ml 表示。

7.2.2 精密度与准确度

四个实验室分别测定了 5.00、2.00、0.50 ng/ml 三个浓度的统一分发尿样。

7.2.2.1 重复性

实验室内相对标准偏差分别为：6.8%，8.9%，14.5%。

7.2.2.2 再现性

实验室间相对标准偏差分别为：9.1%，8.1%，15.5%。

7.2.2.3 准确度

各实验室对 1-羟基芘测定的平均回收率分别为：97%，96%，96%。

7.2.3 检出限：以 HPLC 使用灵敏挡噪音的五倍作为仪器的检出限。

附加说明：

本标准由国家环境保护局科技标准司标准处提出。

本标准由北京市环境保护科学研究院负责起草。

本标准主要起草人：赵振华 全文熠。