

## 【化学测定方法】

## 高效液相色谱法测定尿中马尿酸的规范化研究

刘婕 梅勇\*, 王倩 江金凤 周倩

( 武汉科技大学医学院, 武汉 430065)

**[摘要]** 目的: 进一步完善和规范化甲苯接触者尿中马尿酸的高效液相色谱测定法。方法: 采用 ODS C18 柱, 流动相为甲醇-0.01 mol/L 磷酸(40+60), 流量为 1.0 ml/min, 检测波长 228 nm。结果: 马尿酸在 10 μg/ml ~ 500 μg/ml 范围内线性良好, 相关系数  $r$  为 0.9999, 平均加标回收率为 99%, 平均相对标准偏差  $RSD$  为 1.1%, 最低检测浓度 0.41 mg/L。结论: 该方法快速、准确、灵敏度高, 有良好的重现性和稳定性, 可用于职业接触甲苯人群尿中马尿酸的测定。

**[关键词]** 高效液相色谱法; 尿; 马尿酸

**[中图分类号]** O657.7+2

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1004-8685(2011)12-2840-03

## Standardized experimental study on the determination of hippuric acid in urine by HPLC

LIU Jie, MEI Yong\*, WANG Qian, JIANG Jin-feng, ZHOU Qian

( Medical College, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430065, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore a further research on the analytical method for the determination of hippuric acid in urine by HPLC. **Methods:** C<sub>18</sub> column was used to determine the hippuric acid. The mobile phase was used with Methanol-0.01 mol/L phosphoric acid (40:60) at 1.0 ml/min. The detection wavelength was at 228 nm. **Results:** Calibration curves of hippuric acid were linear in the range of 10 μg/ml ~ 500 μg/ml, with a correlation coefficient more than 0.9999. The average recovery was 99% and the average  $RSD$  was 1.1%. The minimum detectable concentration was 0.41 mg/L. **Conclusion:** The method is convenient and accurate with good reproducibility and stability, and can be used to determine hippuric acid in urine of toluene exposure workers.

**[Key words]** HPLC; Urine; Hippuric acid

目前甲苯作为世界范围内广泛使用的有机溶剂, 主要用于喷漆、染料、橡胶、印刷业等行业生产和化工原料的作业中<sup>[1]</sup>, 其危害性引起人们很大的关注。对甲苯职业暴露的工人进行生物监测是预防职业损伤的必要手段。生物接触限值作为一类卫生标准有着独特的优势, 它体现的是机体内暴露剂量, 较作业环境职业接触限值更能客观、准确反映作业工人实际接触情况<sup>[2]</sup>。对甲苯暴露工人的尿中代谢物的研究显示, 马尿酸是甲苯的主要代谢物<sup>[3]</sup>, 作为甲苯的接触生物标志物受到广泛应用, 美国和日本等许多国家以马尿酸作为甲苯环境暴露的评价指标。我国 1996 年就推荐了卫生标准 WS/T53-1996, 运用高效液相色谱法测定尿中马尿酸的方法<sup>[4]</sup>。有文献<sup>[5,6]</sup>报道按照该标准所提供条件难以达到分离要求, 且繁琐费时, 我们实验室也按照 WS/T53-1996 的方法进行了马尿酸的测定, 分离效果不甚理想, 有严重拖尾现象。因此, 本研究旨在开展职业接触甲苯尿中马尿酸测定方法的规范化研究, 按照我国职业卫生标准制定指南<sup>[7]</sup>的要求进行方法学逐项研究, 为我国制定尿中马尿酸的测定标准提供可靠、可行的参考依据。

**[作者简介]** 刘婕(1988-), 女, 硕士研究生, 主要从事卫生检验学方面研究。

\* 通讯联系人 E-mail: meiyong2006@163.com

## 1 材料与方法

## 1.1 仪器与试剂

LC-3000 高效液相色谱仪, 配紫外检测器(山东滕州鲁创分析仪器有限公司), KQ2200E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), H-6 数显控温水浴锅(国华电器有限公司), KF 系列溶剂过滤器(天津市欧科商贸中心), BS21S 万分之一电子天平(德国 Sartorius 公司), TDL80-2B 型高速离心机(上海安亭科学仪器厂), WH-3 型涡旋混合器(上海沪西分析仪器有限公司), 磷酸(分析纯, 金山化学试剂有限公司), 氯化钠(分析纯, 上海化学试剂有限公司), 乙酸乙酯(天津恒兴化学试剂制造有限公司), 盐酸(信阳市化学试剂厂), 马尿酸(CAS: 495-69-2, 纯度 ≥ 99%, 购自中国惠兴生化试剂有限公司), 甲醇(色谱纯, 科密欧公司), 超纯水(超纯水器发生); 实验用水均为去离子水; 甲醇及 0.01 mol/L 磷酸溶液临用前经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 并超声 30 min。

## 1.2 测定方法

1.2.1 色谱条件 色谱柱: venusil × BP C<sub>18</sub> (5 μm, 250 mm × 4.6 mm); 流动相: 甲醇 + 0.01 mol/L 磷酸(40+60); 紫外检测器: 228 nm, 流速: 1.0 ml/min, 进样量: 10 μl; 柱温: 室温。

1.2.2 工作曲线的绘制 马尿酸标准储备液: 准确称取马尿酸 50.0 mg, 用超纯水定容至 50 ml。此溶液的浓度为 1.0 mg/ml。马尿酸标准液: 取标准储备液配制成 0 μg/ml,

10 μg/ml 50 μg/ml 100 μg/ml 200 μg/ml 500 μg/ml 的马尿酸标准系列 按 1.2.3 样品处理方法进行处理后,以外标法进行定量测定。

1.2.3 样品处理 取 1.0 ml 样品于 10 ml 具塞离心管中,加入 0.1 ml 盐酸溶液、0.3 g 氯化钠和 4 ml 乙酸乙酯,于漩涡混合器上混合 1 min,以 2500 r/min 离心 5 min。取乙酸乙酯层 0.4 ml 于具塞试管中,在低于 70℃ 水浴中挥干。加 1.0 ml 水溶解残留物,混匀,进样测定。

1.2.4 样品测定 取制备好的样品溶液,在色谱条件下进行分析测定,保留时间定性,峰面积定量。

1.2.5 计算 按下式计算尿中马尿酸的浓度:

$$C = c \times k$$

式中: C - 尿中马尿酸的浓度, μg/L;

c - 由标准曲线得到的马尿酸浓度, μg/ml;

k - 换算成标准比重下的浓度校正系数。

## 2 结果与讨论

### 2.1 波长的选择

经紫外检测,马尿酸的最大吸收波长为 228 nm,与文献一致<sup>[5]</sup>。

### 2.2 样品提取方法的选择

实验采用了三种尿样预处理的方法:①将尿样直接稀释进样。②将 1.0 ml 尿样与 1.0 ml 甲醇混合后离心取上清液进行分析。③选择乙酸乙酯溶剂对尿中马尿酸进行液-液萃取后,将有机相挥干,定容后进样分析。结果显示用③乙酸乙酯进行液-液萃取的方法提取马尿酸的效果最好,样品加标回收率最高。

### 2.3 流动相的选择

实验尝试了 5 种不同的流动相组成:①60% 乙腈 + 40% 0.01 mol/L 磷酸, pH = 2.73; ②60% 甲醇 + 40% 0.01 mol/L 磷酸, pH = 3.17; ③40% 甲醇 + 60% 0.01 mol/L 磷酸, pH = 2.78; ④55% 甲醇 + 45% 0.01 mol/L 磷酸, pH = 3.03; ⑤30% 甲醇 + 70% (水 + 冰乙酸 80 + 0.01), pH = 3.7。结果表明,采用流动相③时,马尿酸的色谱峰形较好,响应值较高,出峰时间较合理。pH 可改变化学与固定相的解离-吸附程度,从而影响分离效果。而且许多 C<sub>18</sub> 柱子填料硅胶基质的键合相只能在 pH = 2 ~ 7.5 范围内使用。实验显示,流动相 pH = 2.78 时,马尿酸与其它物质达到最佳的分离效果。

### 2.4 标准曲线

将上述制备的标准系列溶液,在选定的色谱条件下进行分析,以马尿酸的浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。回归方程为  $y = 1420.4x - 667.74$ , 相关系数  $r = 0.9999$ , 表明马尿酸在 10 μg/ml ~ 500 μg/ml 范围内线性良好。

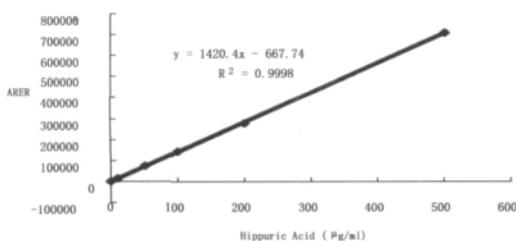


图 1 马尿酸标准曲线

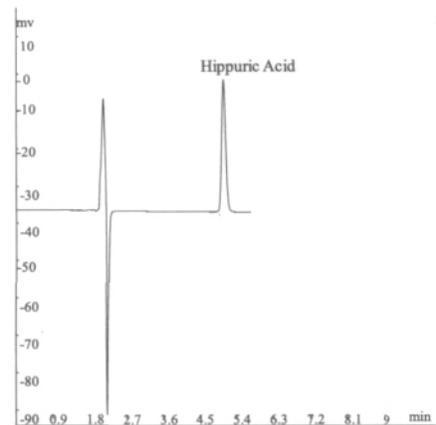


图 2 马尿酸标准溶液色谱图

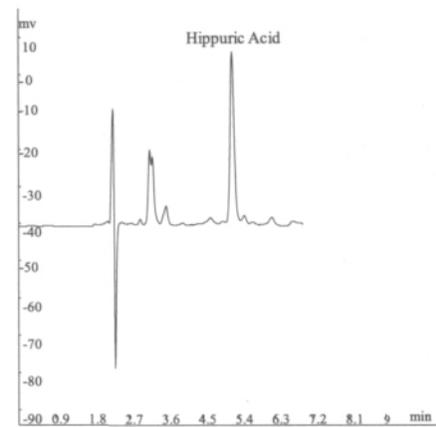


图 3 甲苯接触工人尿中马尿酸色谱图

### 2.5 最低检出浓度实验

将高效液相色谱仪调节至最佳测定状态,按研制的测定方法连续 10 次测定接近空白浓度的溶液,由测定值计算浓度平均值和标准差。实验中连续 10 次测定 10 μg/ml 的马尿酸标准溶液,计算浓度平均值和标准差,以 3 倍的标准差所对应的浓度为检出限,得到尿中马尿酸的最低检出浓度 0.41 mg/L。

### 2.6 准确度和精密度试验

取 3 份新鲜尿样,制成均匀的混合样品。然后分成 4 组,每组 6 个样品,一组为空白,其余三组经样品处理后分别加入高、中、低 3 个浓度的标准溶液,即 100 μg/ml, 200 μg/ml, 400 μg/ml 的马尿酸。各测定 3 次,取平均值,减去空白,计算精密度和平均加标回收率。结果见表 1。

表 1 准确度和精密度实验结果

加标量 (μg/ml)	RSD (%)	加标回收率 (%)
100	1.34	100.5
200	1.09	98
400	0.73	99.2

### 2.7 干扰实验

在工作场所中,苯系物(苯、甲苯、二甲苯)往往同时存在,其中苯的尿中代谢产物为苯酚,甲苯的尿中代谢产物为马尿酸,二甲苯的尿中代谢产物为甲基马尿酸。因此可能的干扰

物有苯酚和甲基马尿酸等,在马尿酸浓度 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的标准溶液中分别加入不同浓度的甲基马尿酸和苯酚,结果显示各个物质分离很好,不干扰测定。

### 2.8 样品稳定性试验

取 3 份新鲜尿样,制成均匀的混合样品,加马尿酸标准溶液,制成加标 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  HA 的尿样,分成四组,每组 6 个样品,按“1.2.3 样品预处理”操作后,置于 4℃ 冰箱保存。

表 2 样品稳定性试验结果

保存时间	HA( $\bar{x} \pm s$ ) $\mu\text{g}/\text{ml}$	下降率%
当天	291.61 $\pm$ 2.05	
第 3 天	291.23 $\pm$ 2.90	0.13%
第 7 天	281.37 $\pm$ 9.23	3.51%
第 14 天	272.83 $\pm$ 5.95	6.44%

分别于放入冰箱前的当天、第 3 天、第 7 天、第 14 天各测定一次。下降率 $\leq 10\%$ 的天数为稳定时间。结果如表 2 所示,马尿酸保存在 4℃ 时的稳定时间至少为 14 d。

### 3 结语

本方法采用流动相甲醇-0.01 mol/L 磷酸(40+60),能

使马尿酸得到很好的分离,马尿酸的色谱峰形好,对称,无拖尾现象,且各项指标均达到工作场所空气中化学物质测定方法的基本要求,可为我国更新马尿酸的检测方法标准提供可靠的制定依据。

### [参考文献]

- [1] 沈惠麒,顾祖维,吴宜群.生物监测和生物标志物-理论基础及应用[M].第2版.北京:北京大学医学出版社,2006:150.
- [2] 牛侨.职业卫生与职业医学[M].第2版.北京:中国协和医科大学出版社,2007:383-384.
- [3] Akgur A, Ozturk P, Kurtulmu Y, et al. Medicolegal aspects of blood - urine toluene and urinary ortho - cresol concentrations in toluene exposure[J]. Turk J Med Sci, 2001, 31: 415 - 419.
- [4] WS/T53 - 1996. 尿中马尿酸、甲基马尿酸的高效液相色谱测定法[S].
- [5] 管敏娅.高效液相色谱法测定尿中马尿酸的方法探讨[J].中国公共卫生,2003,19(9):112.
- [6] 卢丽明,黄诚.尿中马尿酸、甲基马尿酸的高效液相色谱测定法[J].职业与健康,2008,24(17):1777-1778.
- [7] GBZ/T210.5-2008.职业卫生标准制定指南第五部分:生物材料中化学物质测定方法[S].

(收稿日期:2011-07-21)

(上接第 2834 页)

本研究结果表明乙型肝炎患者血清 Hp 和 CP 在肝炎、肝硬化时降低,而肝癌时升高;血清 AFP 随着疾病的进展而逐渐升高。故临床上可根据三种血清蛋白质在相应疾病时的不同的变化特性(某种意义上有互补的作用)用于肝癌的筛选以及肝炎、肝硬化和肝癌的鉴别诊断。

为进一步明确上述三指标在临床上诊断 HCC 的价值大小,本文通过 ROC 曲线分析发现三者对 HCC 诊断均有一定价值(ROC 曲线下面积均为 0.7 左右),显然单项检测无法满足临床的需求。实际上,不同的指标对同一疾病各方面敏感性是不一样的,因此在对疾病做出诊断时必须充分利用这些指标的诊断信息。多指标联合诊断是目前使用较为广泛的方法之一,指标之间的联合诊断一般分为系列诊断实验(串联)和平行诊断实验(并联)。串联时因多个指标共同阳性才能确定诊断,因此提高了特异性,却降低了敏感性,并联时只需一个指标阳性诊断即可成立,因此提高了敏感性,却降低了特异性。故多个指标的联合诊断(串联或并联)不可能同时提升敏感性和特异性,也无法使用 ROC 曲线分析。为此,本文进一步采用 logistic 回归方式,对各指标进行一定的转换,创立了新的联合预测因子,并对其进行 ROC 曲线分析。分析结果表明,联合预测因子的诊断效能大大提高,ROC 曲线下面积显著高于单项指标( $P$  均  $< 0.05$ )。

总之,血清 Hp 和 CP 对 HBSAg 阳性原发性肝癌均有一定的诊断价值,通过与 AFP 的联合检测,可提高原发性肝癌早期诊断的准确性,更好地满足临床需求。

### [参考文献]

- [1] Cabibbo G, Craxi A. Epidemiology, risk factors and surveillance of hepatocellular carcinoma[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2010, 14(4):352-355.
- [2] 中华医学会肝病学会、感染病学分会.慢性乙型肝炎防治指南[J].中华肝脏病杂志,2005,13(12):881-891.
- [3] 中国抗癌协会肝癌专业委员会.原发性肝癌诊断标准[J].中华肝脏病杂志,2000,8(3):135.
- [4] 赵发林,候艳,李康.临床试验评价的 ROC 分析方法[J].中国卫生统计,2007,24(4):349-351.
- [5] Wong CH, Chan SK, Chan HL, et al. The molecular diagnosis of hepatitis B virus - associated hepato - cellular carcinoma[J]. Crit Rev Clin Lab Sci, 2006, 43(1):69-101.
- [6] 姜国强,徐爱芳,陈刚,等.肝癌血清标志物的研究进展[J].中国卫生检验杂志,2010,20(12):3564-3566.
- [7] Irene LA, Terence CWP. Study of serum haptoglobin and its glycoforms in the diagnosis of hepato - cellular carcinoma: A glyco - proteomic approach[J]. Journal of Proteome Research, 2006, 5(10):2691-2700.
- [8] 宫春勇.铜蓝蛋白及其临床应用[J].医学综述,2006,12(13):823-825.
- [9] Comunale MA, Mattu TS, Lowman MA, et al. Comparative proteomic analysis of de N glycosylated serum from hepatitis B carriers reveals polypeptides that correlate with disease status[J]. Proteomics, 2004, 4(3):826-838.

(收稿日期:2011-07-21)